

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2024-500945

(P2024-500945A)

(43)公表日 令和6年1月10日(2024.1.10)

| (51)国際特許分類        |                                    | F I     |                        | テーマコード (参考) |                   |
|-------------------|------------------------------------|---------|------------------------|-------------|-------------------|
| A 6 1 K           | 39/395 (2006.01)                   | A 6 1 K | 39/395                 | N           | 4 C 0 8 5         |
| A 6 1 P           | 35/00 (2006.01)                    | A 6 1 P | 35/00                  |             | 4 H 0 4 5         |
| A 6 1 P           | 37/08 (2006.01)                    | A 6 1 P | 37/08                  |             |                   |
| A 6 1 P           | 37/02 (2006.01)                    | A 6 1 P | 37/02                  |             |                   |
| A 6 1 P           | 29/00 (2006.01)                    | A 6 1 P | 29/00                  |             |                   |
|                   |                                    | 審査請求    | 未請求                    | 予備審査請求      | 未請求 (全79頁) 最終頁に続く |
| (21)出願番号          | 特願2023-538766(P2023-538766)        | (71)出願人 | 510332958              |             |                   |
| (86)(22)出願日       | 令和3年12月22日(2021.12.22)             |         | マクファーレン バーネット インスティ    |             |                   |
| (85)翻訳文提出日        | 令和5年8月1日(2023.8.1)                 |         | テュート フォー メディカル リサーチ    |             |                   |
| (86)国際出願番号        | PCT/AU2021/051548                  |         | アンド パブリック ヘルス リミテッド    |             |                   |
| (87)国際公開番号        | WO2022/133543                      |         | MACFARLANE BURNET I    |             |                   |
| (87)国際公開日         | 令和4年6月30日(2022.6.30)               |         | NSTITUTE FOR MEDICA    |             |                   |
| (31)優先権主張番号       | 2020904823                         |         | L RESEARCH AND PUBL    |             |                   |
| (32)優先日           | 令和2年12月23日(2020.12.23)             |         | IC HEALTH LTD          |             |                   |
| (33)優先権主張国・地域又は機関 | オーストラリア(AU)                        |         | オーストラリア国 3 0 0 4 ビクトリア |             |                   |
| (81)指定国・地域        | AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA      | (71)出願人 | 517240322              |             |                   |
|                   | ,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(   |         | ジェンマブ エー／エス            |             |                   |
|                   | AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A   |         | GENMAB A／S             |             |                   |
|                   | T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR |         | デンマーク王国 1 5 6 0 コペンハーゲ |             |                   |
|                   | ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, |         | ン ヴィ カルヴボー プリュッゲ 4 3   |             |                   |
|                   | 最終頁に続く                             |         | 最終頁に続く                 |             |                   |

(54)【発明の名称】 F c ガンマ R I I b に対する親和性を有する修飾免疫グロブリン及びその使用方法

(57)【要約】

I g G 2 抗体に由来する少なくとも1つの重鎖ポリペプチドを含む免疫療法用タンパク質が開示されており、重鎖ポリペプチドは、少なくとも定常重ドメイン2及び3 (C H 2 及び C H 3) と、下部ヒンジと、を含み、下部ヒンジの配列は、免疫療法用タンパク質が F c γ R I I b に結合するかつ／又は F c γ R I I b を活性化させることを可能にする変異を含む。免疫療法用タンパク質は、例えば、F c γ R I I b の活性化 (すなわち、F c γ R I I b の阻害機能の動員のため) が有益である疾患又は状態、例えばアレルギー性疾患の治療方法における使用に好適である。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

対象における疾患又は状態を治療する方法であって、FcγRIIbへの結合及び／又はFcγRIIbの活性化が、前記疾患又は状態の前記治療又は予防に有益であり、前記方法が、IgG2抗体に由来する少なくとも1つの重鎖ポリペプチドを含む有効量の免疫療法用タンパク質を前記対象に投与することを含み、前記重鎖ポリペプチドが、少なくとも定常重ドメイン2及び3（CH2及びCH3）と、下部ヒンジと、を含み、前記下部ヒンジの配列が、前記免疫療法用タンパク質がFcγRIIbに結合するかつ／又はFcγRIIbを活性化させることを可能にする変異を含む、方法。

## 【請求項 2】

10

前記重鎖ポリペプチドが、Fc断片の重鎖成分である、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記免疫療法用タンパク質が、変異型IgG2抗体である、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記変異が、233～236位（EU番号付け）での、前記下部ヒンジ配列の置換、又は前記下部ヒンジ配列内の1つ以上のアミノ酸の置換を含む、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記下部ヒンジ配列が、以下のアミノ酸配列を含み、

$X^1 X^2 X^3 - G - X^5$  又は

20

式中、

$X^1$  が、プロリン（P）及びグルタミン酸（E）から選択され、

$X^2$  が、バリン（V）、ロイシン（L）、及びフェニルアラニン（F）から選択され、

$X^3$  が、ロイシン（L）、アラニン（A）、及びグルタミン酸（E）から選択され、 $X^5$  が、グリシン（G）及びプロリン（P）から選択されるか、又は存在せず、

ただし、前記下部ヒンジが野生型IgG2下部ヒンジ配列からなるものではない、請求項1又は2に記載の方法。

## 【請求項 6】

前記下部ヒンジ配列が、ELLGG、EFLGG、EFLGP、及びEFE GGからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

30

## 【請求項 7】

前記免疫療法用タンパク質が、FcγRIIbに結合し、かつFcγRIIbを活性化させて、FcγRIIb阻害機能を動員する、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記免疫療法用タンパク質が、FcγRIIbに結合して、FcγRIIb媒介性エンドサイトーシス／内在化（「スイーピング」）を誘導する、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記免疫療法用タンパク質が、FcγRIIbに結合して、FcγRIIb媒介性足場形成を誘導する、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。

40

## 【請求項 10】

前記免疫療法用タンパク質が、前記重鎖ポリペプチドのうちの前記少なくとも1つのCH2領域内のS267E及び／又はL328Fアミノ酸置換（EU番号付け）を更に含む、請求項1～9のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 11】

前記下部ヒンジ配列が、前記アミノ酸配列EFLGGを含む、請求項1～9のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 12】

前記下部ヒンジ配列が、前記アミノ酸配列EFE GGを含む、前記免疫療法用タンパク

50

質が、前記少なくとも1つの重鎖ポリペプチドの前記C H 2領域内のS 2 6 7 E及び／又はL 3 2 8 Fアミノ酸置換（E U番号付け）を更に含む、請求項1～9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】

前記免疫療法用タンパク質が、前記重鎖ポリペプチドの定常重領域内に更なる変異を含まない、請求項1～9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項14】

前記対象が、FcγRIIa-H<sup>131</sup>に対してホモ接合性である、請求項10又は12に記載の方法。

【請求項15】

前記免疫療法用タンパク質が、ヒト又はヒト化モノクローナル抗体（mAb）である、請求項1～14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項16】

治療される前記疾患又は状態が、アレルギー性疾患、自己免疫疾患及び状態、他の炎症性疾患、感染性疾患、並びに増殖性疾患から選択される、請求項1～15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項17】

前記治療される疾患又は状態が、アレルギー性疾患であり、前記免疫療法用タンパク質が、アレルゲンに特異的に結合する抗原結合領域を含む、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

前記免疫療法用タンパク質が、IgEによるアレルギー性好塩基球活性化のFcγRIIb依存性阻害を媒介する、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

前記治療される疾患又は状態が、自己免疫疾患であり、前記免疫療法用タンパク質が、自己抗原に特異的に結合する抗原結合領域を含む、請求項17に記載の方法。

【請求項20】

前記自己免疫疾患が、全身性エリテマトーデス（SLE）又は多発性硬化症（MS）である、請求項19に記載の方法。

【請求項21】

前記治療される疾患又は状態が、がんであり、前記免疫療法用タンパク質が、がん抗原に特異的に結合する抗原結合領域を含む、請求項1～16のいずれか一項に記載の方法。

【請求項22】

前記免疫療法用タンパク質が、

（a）抗原、

（b）活性化受容体に結合した抗体、

（c）活性化受容体の抗体（リガンド）結合ドメイン、

（d）活性化受容体のサブユニット、

（e）BCR複合体の免疫グロブリン成分に結合した抗原、又は

（f）BCR複合体のサブユニット若しくは関連するIg-α若しくはβ鎖、に特異的に結合する抗原結合領域を含む、請求項1～16のいずれか一項に記載の方法。

【請求項23】

FcγRIIbへの結合及び／又はFcγRIIbの活性化が有益である疾患又は状態を治療するための、請求項1～22のいずれか一項に記載の免疫療法用タンパク質の使用。

【請求項24】

FcγRIIbへの結合及び／又はFcγRIIbの活性化が有益である疾患又は状態を治療するための医薬品の製造における、請求項1～22のいずれか一項に記載の免疫療法用タンパク質の使用。

【請求項25】

請求項1～22のいずれか一項に記載の免疫療法用タンパク質と、薬学的に許容される

10

20

30

40

50

担体、希釈剤、及び／又は賦形剤と、を含む、薬学的組成物又は医薬品。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、疾患又は状態を治療する方法において使用するための修飾免疫グロブリン分子（すなわち、抗体）を含む免疫療法用タンパク質に関する。より具体的には、本開示は、ヒト阻害性受容体FcγRIIbに対して改善された結合特異性及び親和性を示す変異型IgG2抗体を記載する。これらの抗体は、例えば、FcγRIIbの活性化が有益である疾患、例えばアレルギー性疾患を治療するために使用され得る。

【0002】

優先権書類

本出願は、「修飾免疫グロブリン及びその使用方法（1）」と題され、2020年12月23日に提出されたオーストラリア特許出願第2020/904823号からの優先権を主張し、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0003】

モノクローナル抗体（mAb）は、がん及び自己免疫疾患などの炎症性疾患の治療に革命をもたらす、最も重要かつ成功したタイプの療法のうちの1つになっている。IgG抗体クラスの骨格上で操作された多くのmAbは、それらの可変Fabドメインを介して標的抗原と、定常Fc断片を含むそれらの重鎖を介してFcγ受容体（FcγR）の両方に係合することによって、免疫系の強力なエフェクター機能の特異的に利用する。炎症性疾患において、操作されたmAbは、炎症性メディエーターを中和することによって、それらの受容体を中和することによって、又は免疫調節受容体に係合することによって、潜在的に作用し得る。本発明との関連で特に関心のある1つの事項は、アレルギー反応における炎症誘発性応答を中和する可能性であり、その主要なメディエーターは、その高い親和性受容体であるFcεRIのアレルゲン特異的IgE活性化である。

【0004】

アレルギー性疾患の治療における使用について承認された、操作されたmAbの例は、IgG1ベースのmAbであるオマリズマブである。このmAbは、IgEとFcεRIとの相互作用を中和することによって、IgE/FcεRI経路を標的とし、それによって、IgE依存性アレルギー反応における重要な炎症細胞である好塩基球の活性化を防止する（Gericke J et al., JEADV 29（9）：1832-1836, 2014）。ヒト好塩基球は、FcεRI並びにその調節因子である阻害性受容体FcγRIIbの両方を発現する（Kepley CL et al, J Allergy Clin Immunol 106（2）：337-348, 2000）。FcγRIIbは、抗体依存性炎症細胞活性化を調節する強力なチェックポイントである。FcγRIIbは、FcεRIの免疫受容体チロシン活性化モチーフ（ITAM）依存性シグナル伝達経路、並びに活性化型IgG及びIgA Fc受容体、すなわち、FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIb及びFcαRIを調節する免疫受容体チロシン阻害モチーフ（ITIM）を介して作用する。FcγRIIbはまた、B細胞抗原受容体（BCR）によるB細胞活性化を調節する。FcγRIIbなどの免疫チェックポイントの標的化は、疾患における白血球応答を調節するための戦略として浮上している（Kaplon H and JM Reichert, Mabs 11（2）：219-238, 2019、Chenoweth AM et al., Immunol Cell Biol 98（4）：287-304, 2020）。しかしながら、T細胞機能のチェックポイント（例えば、PD-1、PD-L1）のmAb標的化とは異なり、FcγRIIbは、mAb治療薬のFc断片に対するその特異性のために、mAb治療薬との関連で特異的であり、その阻害作用を発揮するために、FcγRIIbは、ITAM含有活性化受容体、例えば、活性化型FcR複合体、又はB細胞抗原受容体若しくはBCRとしても知られるB細胞の抗原受容体複合体との共架橋を必要とするので（Getahun A and JC

10

20

30

40

50

Cambier, Immunol Reviews 268 (1): 66-73, 2015、Chenoweth AM et al., 2020 (前掲)、アレルギー反応において (FcεRI と共凝集するか、又は B 細胞抗原受容体 BCR と共凝集しつつ) FcγRIIb の正常な生理学的阻害の役割を利用できる特定の免疫抑制抗体を使用する戦略は、高親和性 IgE 受容体、FcεRI、若しくは BCR などの活性化受容体を標的とする潜在的に有用な方法を提供する。

【0005】

本開示に至る研究において、本発明者らは、IgG2 抗体が低親和性活性化型 FcγRIIa の 1 つの対立遺伝子形態 (すなわち、「His131 形態」、FcγRIIa-His<sup>131</sup>; Bredius RGM et al., J Immunol 151: 1463-1472, 1993) にのみ結合する非常に制限された FcγR 特異性を有し、エフェクター機能を制限し、かつ補体を固定できないことを鑑みて、「IgG2 骨格」は「機能的に不活性」であると考えられており、これは、操作された IgG2 抗体 (すなわち、変異型 IgG2 抗体) が、炎症細胞からの FcγR 依存性サイトカイン放出、キラー細胞からの細胞毒性、又は潜在的に「サイトカインストーム」として知られている生命を脅かす炎症応答 (例えば、IgG4 ベースの抗 CD28 モノクローナル抗体である TGN1412 で観察されているように; Suntharalingam G et al., N Engl J Med 355 (10): 1018-1028, 2006) などの望ましくない炎症誘発性エフェクター応答を含む望ましくない活動 (すなわち「副作用」) を引き起こす傾向が低い可能性があることを意味することから、アレルギー反応の治療又は予防のための IgG2 ベースの免疫グロブリン分子の使用を調査することを選択した。しかしながら、IgG2 抗体は、上記の FcγRIIa の 1 つの対立遺伝子形態を除いて、FcγRIIb 又は他の FcγR に結合しないことが知られているが (Bruhns P et al, Blood 113 (16): 3716-3725, 2009、及び以下の図 1A)、それにもかかわらず、本発明者らは、驚くべきことに、FcγRIIb 特異性、親和性、及び阻害効力を向上させるように IgG2 骨格を操作することができた。採用されたアプローチは、新規の強力な抗炎症療法用 mAb 及び分子を含む免疫療法用タンパク質の生成に対してより広い意味を有すると考えられる。

【発明の概要】

【0006】

したがって、第 1 の態様では、本開示は、対象における疾患又は状態を治療する方法であって、FcγRIIb への結合及び／又は FcγRIIb の活性化が、当該疾患又は状態の治療又は予防に有益であり、当該方法が、IgG2 抗体に由来する少なくとも 1 つの重鎖ポリペプチドを含む有効量の免疫療法用タンパク質を当該対象に投与することを含み、当該重鎖ポリペプチドが、少なくとも定常重ドメイン 2 及び 3 (すなわち、CH2 及び CH3) と、下部ヒンジと、を含み、下部ヒンジの配列が、免疫療法用タンパク質が FcγRIIb に結合するか／又は FcγRIIb を活性化させることを可能にする変異を含む、方法を提供する。

【0007】

いくつかの特定の好ましい実施形態では、免疫療法用タンパク質の下部ヒンジ配列は、ELLGG (配列番号 1)、EFLGG (配列番号 2) 及び EFE GG (配列番号 3) から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0008】

第 2 の態様では、本開示は、例えば、アレルギー性疾患、自己免疫疾患及び状態、感染性疾患、並びに増殖性疾患を含む、FcγRIIb への結合及び／又は FcγRIIb の活性化が有益である疾患又は状態を治療するための、第 1 の態様で定義される免疫療法用タンパク質の使用を提供する。

【0009】

第 3 の態様では、本開示は、例えば、アレルギー性疾患、自己免疫疾患及び状態、他の炎症性疾患、感染性疾患、並びに増殖性疾患を含む、FcγRIIb への結合及び／又は

FcγRIIbの活性化が有益である疾患又は状態を治療するための医薬品の製造における、第1の態様で定義される免疫療法用タンパク質の使用を提供する。

【0010】

第4の態様では、本開示は、第1の態様で定義される免疫療法用タンパク質と、薬学的に許容される担体、希釈剤、及び／又は賦形剤と、を含む、薬学的組成物又は医薬品を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】IgG1、IgG2、IgG4、及び変異型IgG4抗体と比較した、本開示による変異型IgG2抗体のヒトFcγRとの結合プロファイルを示す。

【図2】本開示による変異型IgG2抗体を使用するアレルギー患者からの、生理学的レベルのIgGを欠く、洗浄した血液中の蜂毒Apm1アレルギー依存性好塩基球活性化の阻害を示す。

【図3】本開示による変異型IgG2抗体を使用した好塩基球活性化試験(BAT)アッセイの結果を提供し、アレルギー患者からの生理学的レベルのIgGを含有する全血中の蜂毒Apm1アレルギー依存性好塩基球活性化の阻害を示す。

【図4】SELF変異を含む変異型IgG2抗体がFcγRIIb及びFcγRIIa-R<sup>131</sup>に対する結合親和性の向上を示すかどうかを判定するために実施したアッセイの結果を示す：(A) TNP-BSA上で捕捉されたrsFcγRIIbの単量体抗TNP IgG1、IgG2及び示された変異体又はIgG2への結合のBLI分析(平均±SEM)、(B) TNP-BSA上で捕捉されたrsFcγRIIa-R<sup>131</sup>の単量体抗TNP IgG1-SELF、IgG2-SELF、IgG2-FLGG-SELF及びIgG2-FEGG-SELFへの結合のBLI分析(平均±SD)。

【図5】本開示による変異型IgG2抗体が、ヒトFcγR結合プロファイルを変更したことを実証する結果を提供する。ヒトFcγRを発現する細胞を使用して、複合化IgGの低親和性ヒトFcγRへの結合力又は非複合化単量体IgGのFcγRIへの親和性を、フローサイトメトリーによって決定した：(A) FcγRIIb、(B) FcγRIIa-R<sup>131</sup>、(C) FcγRIIa-H<sup>131</sup>、(D) FcγRIIa-F<sup>158</sup>、(E) FcγRIIa-V<sup>158</sup>、及び(F) FcγRI。IgG変異体と関連するIgG WT骨格との間で統計的比較を行った。\* (p<0.5)、\*\* (p<0.1)、\*\*\* (p<0.01)、\*\*\*\* (p<0.0001)、n.s (有意でない)。

【図6】本開示による変異型IgG2抗体の単量体のFcγR結合特異性の結果を示す。変異型IgG2抗体の一部は、SELF変異を含んでいた。

【図7】本開示による変異型IgG2抗体(SELF変異を有するものもある)を使用したBATアッセイの結果を提供し、健康なドナーからの全血におけるIgG変異体による(IgE依存性刺激として抗IgE-TNPを使用する)抗IgE依存性好塩基球活性化の阻害を示す。

【図8】FcγRIIb発現及びFcγRIIb特異的FcεRI活性化の阻害を評価する実験の結果を提供する：(A) 緩衝液バックグラウンド(Bkg)と比較した、FcγRIIb特異的mAbであるH2B6のF(ab')<sub>2</sub>断片を使用したIgE陽性好塩基球上のFcγRIIbのフローサイトメトリー検出、(B) FcγRIIbのH2B6 F(ab')<sub>2</sub>遮断は、全血BAT中のIgG2-FLGG(7.5 μg/ml)による好塩基球活性化の阻害を防止する、(C) FcεRI(αβγ)複合体及び阻害性FcγRIIbを共発現するIIA1.6細胞におけるIgE/FcεRI依存性誘導カルシウム動員のmAb抑制。細胞をIgEで一晩前処理し、TNPコンジュゲートF(ab')<sub>2</sub>抗hIgEと予め複合化された抗TNP抗体で刺激した。細胞を抗IgE-TNP(F(ab')<sub>2</sub>)(20 μg/ml)及びmAb(35 μg/ml)で刺激した。カルシウムフラックス(340/380 nm)を経時的に測定し、変異型IgG2抗体によるカルシウムフラックスの阻害を、FcγRIIbに結合しない親の野生型IgG2と比較した。非刺激ベースライン対照は、緩衝液単独である(n=3)。

10

20

30

40

50

【図 9】 B 細胞抗原受容体複合体を検出する I g G m A b による B 細胞の抗原刺激の抑制を示す実験の結果を提供する。I g G 4 骨格又は I g G 2 骨格を有するオマリズマブの可変ドメインを有する抗 I g E m A b は、ヒト F c γ R I I b 1 を共発現する B 細胞における N I P 特異的 h u - I g E B C R 誘発カルシウムフラックスの N I P ( 2 2 ) B S A 刺激を抑制する。I g E B C R の調節は、これらの I g G フォーマットの F c γ R I I b 結合活性のランクと相関する I g G 1 ( オマリズマブ ) ~ I g G 4 > I g G 2 の階層を有した。

【図 10】 B 細胞抗原受容体複合体に結合する ( 本開示による ) I g G 2 変異型 m A b による B 細胞の抗原刺激の抑制を示す実験の結果を提供する。本開示による I g G 2 変異型抗体として提供されるオマリズマブの可変ドメインを有する抗 I g E m A b は、ヒト F c γ R I I b 1 を共発現する B 細胞における N P 特異的 h u - I g E B C R 誘発カルシウムフラックスの抗原 ( すなわち、N I P ( 2 2 ) B S A ) 刺激を抑制する。I g G 2 変異型 m A b による I g E B C R の調節に対する変異の影響は、F L G G - S E L F > F L G G ~ F E G G - S E L F > F E G G > I g G 2 の階層を有し、これは、I g G 2 フォーマットにおけるこれらの変異の F c γ R I I b 結合活性のランクと広く相関していた。

10

【発明を実施するための形態】

【0012】

本発明者らは、機能的に不活性な I g G 2 骨格を、下部ヒンジ配列の変異 ( 例えば、下部ヒンジを I g G 4 の下部ヒンジ配列に効果的に置き換える ) 及び他の変異を組み込むための足場として使用して、ヒト阻害性受容体である F c γ R I I b ( 当業者に周知の m R N A スプライスバリエーションのうちのいずれか又は全て、すなわち、F c γ R I I b 1、F c γ R I I b 2 及び F c γ R I I b 3 を含む、に対する結合特異性及び親和性を改善し得ることを見出した ( G e t a h u n A a n d J C C a m b i e r , 2 0 1 5 ( 前掲 ) 、及び C h e n o w e t h A M e t a l . , 2 0 2 0 ( 前掲 ) 、A n a n i a J C e t a l . , F r o n t I m m u n o l 9 : 1 8 0 9 , 2 0 1 8 ) ) 。得られる変異型 I g G 2 抗体は、例えば、治療効果のために F c γ R の「足場形成」が必要とされる m A b の増強されたアゴニスト機能を潜在的に提供することができる。これらはまた、F c γ R I I b の正常な生理学的阻害機能、又は F c γ R I I b によって媒介される抗原若しくは免疫複合体クリアランス ( 例えば、エンドサイトーシス / 内在化又は「スウィーピング」によって ) を利用することが望ましい状況において、非アゴニスト療法用抗体の開発に有用であり得る。

20

30

【0013】

したがって、第 1 の態様では、本開示は、対象における疾患又は状態を治療する方法であって、F c γ R I I b への結合及び / 又は F c γ R I I b の活性化が、当該疾患又は状態の治療又は予防に有益であり、当該方法が、I g G 2 抗体に由来する少なくとも 1 つの重鎖ポリペプチドを含む有効量の免疫療法用タンパク質を当該対象に投与することを含み、当該重鎖ポリペプチドが、少なくとも定常重ドメイン 2 及び 3 ( すなわち、C H 2 及び C H 3 ) と、下部ヒンジと、を含み、下部ヒンジの配列が、免疫療法用タンパク質が F c γ R I I b に結合するか / 又は F c γ R I I b を活性化させることを可能にする変異を含む、方法を提供する。

40

【0014】

免疫療法用タンパク質の少なくとも 1 つの重鎖ポリペプチドは、例えば、重鎖ポリペプチドの C H 2 及び C H 3 ドメインが、野生型 ( W T ) I g G 2 抗体の C H 2 / C H 3 ドメインの配列、又はより好ましくは、W i n e s B D e t a l . , J I m m u n o l 1 9 7 ( 4 ) : 1 5 0 7 - 1 5 1 6 , 2 0 1 6 及び G e n B a n k 受託番号 : A H 0 0 5 2 7 3 . 2 ) によって提供されるもののような W T ヒト I g G 2 抗体の C H 2 / C H 3 ドメインの配列に対して少なくとも 9 5 % 、好ましくは少なくとも 9 8 % の同一性を示すアミノ酸配列を含むという理由により、当業者が I g G 2 抗体に由来すると認識する任意の重鎖ポリペプチドであってもよい。

【0015】

50

当業者は、IgG2抗体に由来する重鎖ポリペプチドが、例えば、完全長重鎖ポリペプチド（すなわち、定常重鎖領域（CH）及び可変重（VH）領域を含む）を含み得るか、又は少なくともCH2、CH3及び下部ヒンジを含むその断片を含み得ることを容易に理解するであろう。このような断片の1つの好ましい例は、抗体のパパイン消化（上部ヒンジ配列内のポリペプチドを切断して、各々がCH2、CH3並びに下部及びコアヒンジ配列を含む2つの重鎖架橋断片を含むFc断片を生成する）によって生成される断片の重鎖成分のうちの1つに対応するFc断片である。同様の重鎖ポリペプチドは、「Fc断片」を生成するものとしても当業者に知られている、プラスミン及びヒト好中球エラスターゼ（NHE）を用いた抗体の消化によって調製されてもよく、そのような重鎖ポリペプチドは、第1の態様の方法の免疫療法用タンパク質を好適に含んでもよい。好適な重鎖ポリペプチドの更なる例は、CH2、CH3及び下部ヒンジに加えて、IgG2抗体の定常重ドメイン1（CH1）の全て若しくは一部、並びに／又はコアヒンジ及び／若しくは上部ヒンジ配列を含み得る。

10

#### 【0016】

いくつかの実施形態では、免疫療法用タンパク質は、融合タンパク質又はタンパク質コンジュゲートの形態で提供される重鎖ポリペプチドを含んでもよい。当業者であれば、融合タンパク質では、重鎖ポリペプチドが、融合パートナーのN末端又はC末端のペプチド結合又は短いペプチドリンカー配列を介して、ポリペプチド又はペプチドパートナー（すなわち、融合パートナー）に共有結合（すなわち、「融合」）されることを理解し、一方、タンパク質コンジュゲートでは、重鎖ポリペプチドが、ジスルフィド結合などの化学連結、又はスベリン酸ジスクシンイミジル（DSS）（例えば、スベリン酸ビス（スルホスクシンイミジル）（BS<sup>3</sup>）、ThermoFisher Scientific、Waltham, MA, United States of America）若しくは酒石酸ジスクシンイミジル（disuccinimidyl tartrate、DST）などのホモ二官能性架橋剤などの架橋剤化合物を介して、コンジュゲートパートナー（ポリペプチド、ペプチド、又は他の化学物質であり得る）に共有結合又は非共有結合されて、アミン基、又はm-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル（MDS）及びN-（ε-マレイミドカプロロキシ）スクシンイミドエステル（EMCS）などのヘテロ二官能性架橋剤を連結するか、あるいは水素結合などの他の非共有結合によってコンジュゲートパートナーに共有結合又は非共有結合されることを理解すべきである。コンジュゲートパートナーがポリペプチドである場合、タンパク質コンジュゲートは、そうでなければ、架橋タンパク質とみなされ得る。コンジュゲートパートナーは、N末端又はC末端の重鎖ポリペプチドにコンジュゲートされてもよいが、そうでなければ、重鎖ポリペプチド上の任意の他の好適な部位（例えば、重鎖ポリペプチドに含まれる場合、CH1又は上部ヒンジ配列内）でコンジュゲートされてもよい。当業者は、融合パートナー又はコンジュゲートパートナーが1つ以上の有用な活性又は機能を提供し得ることを認識するであろう。例えば、融合パートナーは、タンパク質回収又は発現（例えば、ヒト血清アルブミン（HSA）、及びグルタチオンSトランスフェラーゼ（GST））を改善し、ポリヒスチジンタグ（Hisタグ）若しくはFLAGタグなどの様々な親和性タグ、又は目的の抗原に結合する更なる能力を提供し得る。融合パートナー又はコンジュゲートパートナーの他の例としては、受容体（例えば、インターロイキンの受容体（例えば、IL-1受容体）若しくはTGF-βスーパーファミリーのサイトカインの受容体などのサイトカイン受容体）、又は細胞表面分子及び免疫チェックポイント（例えば、CTLA4又はPD1）が挙げられる。

20

30

40

#### 【0017】

いくつかの他の実施形態では、免疫療法用タンパク質は、二量体又は多量体形態で提供される少なくとも1つの重鎖ポリペプチドを含んでもよい。例えば、重鎖ポリペプチドは、特にヒンジ配列（特にコアヒンジ配列）内に位置する場合に、1つ以上のシステイン（C）残基を通して共有結合二量体を形成する天然の傾向を有し得る（Yoo EM et al., J Immunol 170:3134-3138, 2003）。多量体形態の

50

重鎖ポリペプチド（例えば、重鎖ポリペプチドの3つ、4つ、5つ、6つなどのコピーを含む）を産生するのに好適な技術が記載されており、当業者に周知である（例えば、ヒトIgG2又はイソロイシンジッパー（ILZ）のヒンジ領域からマウスIgG2aのN末端又はC末端までの連結した多量体化ドメイン（MD）配列を含むFc多量体形態（stradomers（商標））；Fitzpatrick EA et al., Front Immunol 11, article 496, 2020）。重鎖ポリペプチドのそのような二量体又は多量体形態は、好ましくは可溶性である（すなわち、生理食塩水に）。

#### 【0018】

更にいくつかの他の実施形態では、免疫療法用タンパク質は、2つの軽鎖ポリペプチドを有する2つの完全長重鎖ポリペプチドを含むIgG2抗体、特に、2つの重鎖ポリペプチドのうちの少なくとも1つが、IgG2抗体がFcγRIIbに結合するかつ／又はFcγRIIbを活性化させることを可能にする変異を下部ヒンジ配列内に含む変異型IgG2抗体を含む。

#### 【0019】

野生型（WT）ヒトIgG2抗体は、FcγRIIbへの結合を示さないか、又は事実上検出できない（図1Aを参照）。対照的に、本開示の方法は、IgG2抗体がFcγRIIbに結合するかつ／又はFcγRIIbを活性化させることを可能にする変異型ヒトIgG2抗体（すなわち、少なくとも1つの重鎖ポリペプチドの下部ヒンジ配列における変異を含むIgG2抗体）を利用し得る。IgG2下部ヒンジ配列における変異は、配列の置換、又は配列内の1つ以上のアミノ酸の置換を233～236位（EU番号付けシステム、Edelman GM et al., Proc Natl Acad Sci U S A 63:78-85, 1969及びKabata EA, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5<sup>th</sup> ed., DIANE Publishing, PA, USA, 1991；しかし、疑義を避けるために、本明細書で言及されるIgG2下部ヒンジ配列は、IgG1の下部ヒンジ配列のアミノ酸と同等の位置にアミノ酸を含む）に含み得、この配列は、ヒトIgG2抗体におけるPVAG（配列番号14）である。IgG2下部ヒンジ配列における変異は、アミノ酸の挿入又は付加を更に含み得、例えば、変異したヒトIgG2下部ヒンジ（PVAG：配列番号14）配列は、変異型IgG2抗体における5個のアミノ酸配列であってもよい。

#### 【0020】

好ましくは、免疫療法用タンパク質において、下部ヒンジ配列は、以下のアミノ酸配列を含み、

$X^1 X^2 X^3 - G - X^5$ （配列番号4）

式中、

$X^1$ は、プロリン（P）及びグルタミン酸（E）から選択され、

$X^2$ は、バリン（V）、ロイシン（L）、及びフェニルアラニン（F）から選択され、

$X^3$ は、ロイシン（L）、アラニン（A）、及びグルタミン酸（E）から選択され、

$X^5$ は、グリシン（G）及びプロリン（P）から選択されるか、又は存在せず（すなわち、配列が $X^1 X^2 X^3 - G$ ：配列番号31であるように）、

ただし、下部ヒンジは野生型IgG2下部ヒンジ配列（例えば、ヒトIgG2抗体のPVAG（配列番号14））からなるものではない。

#### 【0021】

いくつかの特定の好ましい実施形態では、変異型IgG2抗体の下部ヒンジ配列は、ELLGG（ヒトIgG1に由来、配列番号1）、EFLGG（ヒトIgG4に由来、配列番号2）、EFLGP（配列番号5）及びEFE GG（配列番号3）から選択されるアミノ酸配列を含む。

#### 【0022】

上述のように、本開示の免疫療法用タンパク質（例えば、変異型IgG2抗体）は、F

10

20

30

40

50

c γ R I I b に結合し得るか／又は F c γ R I I b を活性化させ得る。免疫療法用タンパク質が F c γ R I I b に結合し、かつ F c γ R I I b を活性化させる場合、免疫療法用タンパク質は、F c γ R I I b 阻害機能を誘発するように作用し得る。したがって、いくつかの実施形態では、本開示の方法は、F c γ R I I b の阻害効果が有益である疾患又は状態の治療又は予防に特に適している。したがって、いくつかの好ましい実施形態では、本開示の方法は、特に、例えば、アレルギー性疾患の治療又は予防を対象とし、免疫療法用タンパク質による F c γ R I I b の結合及び活性化は、I g E によるアレルギー性好塩基球活性化の F c γ R I I b 依存性阻害を媒介する。

#### 【0023】

本開示の方法は、アレルギー反応の治療又は予防のために実施され、免疫療法用タンパク質は、好ましくは、変異型下部ヒンジ配列 E F L G G (配列番号 2) 又は E L L G G (配列番号 1) を含むタンパク質であり、以下に記載される実施例において、「I g G 2 - F L G G (配列番号 6)」m A b 及び「I g G 2 - L L G G (配列番号 7)」m A b とし示される変異型 I g G 2 抗体は、F c γ R I I b に対する親和性が比較的低いにもかかわらず、試験された変異型 I g G 2 抗体の I g E / F c ε R I 塩基親和性活性化の最も強力な阻害剤である（注：それらは免疫複合体としてのみ結合した）ことが見出された。

#### 【0024】

いくつかの好ましい実施形態では、免疫療法用タンパク質は、重鎖ポリペプチド内（又は少なくとも、重鎖ポリペプチドの定常重領域内）に更なる変異を含まないが、いくつかの他の実施形態では、少なくとも 1 つの重鎖ポリペプチドのうちの 1 つ以上の更なる変異を更に含むことが有利であり得る。例えば、免疫療法用タンパク質（例えば、変異型 I g G 2 抗体）は、重鎖ポリペプチドのうちの少なくとも 1 つ、及びより好ましくはその両方、の C H 2 ドメインにおける 2 6 7 位及び／又は 3 2 8 位（E U 番号付け）にアミノ酸置換、例えば、それぞれいわゆる「S E L F」変異と呼ばれる S 2 6 7 E 及び L 3 2 8 F 置換を更に含み得る。以下に説明する実施例では、E F E G G (配列番号 3) 変異型下部ヒンジ配列及び S E L F 変異を有する変異型 I g G 2 抗体（例えば、「I g G 2 - F E G G (配列番号 8) - S E L F」m A b）が、試験された変異型 I g G 2 抗体の最も特異的な方法で F c γ R I I b に結合し、阻害効力を保持したことが見出された。

#### 【0025】

しかしながら、S E L F 変異は、変異型 I g G 2 抗体と F c γ R I I b との相互作用を増強したが、インビボでは、対象におけるそのような変異型 I g G 2 抗体の特異性は、F c γ R I I a の高／低レスポンド多型の存在によって決定されてもよく、その理由は、S E L F 変異を含む抗体は、F c γ R I I b 及び活性化受容体型 F c γ R I I a (「A r g 1 3 1 形態」のみであって、「H i s 1 3 1 形態」ではない) との高い親和性相互作用を有することが見出されているからである。したがって、本方法が S E L F 変異を含む変異型 I g G 2 抗体の投与を伴ういくつかの実施形態では、本方法は、好ましくは、F c γ R I I a - H <sup>1 3 1</sup> に対してホモ接合性の対象（注：F c γ R I I a - H <sup>1 3 1</sup> に対してホモ接合性の対象は、集団の約 3 0 % に相当する；v a n d e r P o l W L a n d J v a n d e W i n k e l , I m m u n o g e n e t i c s 4 8 : 2 2 2 - 2 3 2 , 1 9 9 8）とともに使用することを意図され得る。そのような実施形態では、本方法は、F c γ R I I a の高／低レスポンド多型について遺伝子型決定することによって対象を選択するステップを更に含み得る。すなわち、いくつかの実施形態では、F c γ R I I a - H <sup>1 3 1</sup> に対してホモ接合性であると判定された対象は、S E L F 変異を含む変異型 I g G 2 抗体を投与することによる治療のために選択されてもよい。

#### 【0026】

免疫療法用タンパク質が変異型 I g G 2 抗体を含む場合、変異型 I g G 2 抗体は典型的にはモノクローナル抗体 (m A b) を含み、好ましくはヒト m A b 又はヒト化 m A b である。そのような抗体は、当業者に既知の標準的な方法論のうちのいずれかに従って産生され得る。例えば、当業者は、標準的な分子生物学技術を使用して構築物を生成することによって、本開示の方法において使用するのに好適な変異型 I g G 2 抗体を容易に調製する

10

20

30

40

50

ことができ、この構築物は、好適な抗体（例えば、目的の抗原に結合する抗原結合領域を含むもの）の可変重（VH）及び軽（VL）領域配列並びにIgG2抗体（例えば、Wines BD et al., 2016（前掲）に記載されているような）からの定常重（CH）領域をコードするポリヌクレオチド配列を含み、部位特異的変異誘発などの標準的な分子生物学技術、上記の下部ヒンジ配列変異（及び所望する場合にはSELF変異）をコードするポリヌクレオチド配列変化によって、CH領域をコードするポリヌクレオチド配列に組み込まれる。構築物は、好適な宿主細胞（例えば、ヒト腎臓（HEK）宿主細胞）に導入され、標準的な培養プロトコルに従って培養され、発現された変異型IgG2抗体は、例えば精製のための既知の好適な方法論（例えば、アフィニティークロマトグラフィー）のうちのいずれかを使用して培養上清から精製される。

10

#### 【0027】

FcγRIIbの活性化による疾患の治療

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、対象における疾患又は状態を治療するために使用されてもよく、FcγRIIbの活性化（すなわち、阻害作用の動員のため）は、当該疾患又は状態の治療又は予防に有益である。

#### 【0028】

そのような実施形態のいくつかの例では、免疫療法用タンパク質は、例えば、（a）抗原（例えば、受容体に結合したIgG、IgE若しくはIgAなどの抗体に結合したアレルゲン又は自己抗原）、（b）活性化受容体に結合した抗体、（c）活性化受容体の抗体（リガンド）結合ドメイン、又は（d）活性化受容体のサブユニット（例えば、Fc受容体共通γ鎖）などの潜在的なシグナル伝達複合体の成分を認識する抗原結合領域（例えば、Fab領域）などの結合ドメインを含むことによって、ITAMシグナル伝達受容体複合体を標的としてもよく、一方、他の例では、免疫療法用タンパク質は、例えば、（a）BCR複合体の免疫グロブリン成分に結合した抗原（例えば、アレルゲン、自己抗原、細菌若しくはウイルス病原体の抗原などの感染性因子の抗原、又は移植された組織若しくは臓器からの抗原）、又は（b）BCR複合体のサブユニット（例えば、IgM、IgD、IgG、IgE、若しくはIgAなどのBCR複合体の膜免疫グロブリン）若しくは関連するIg-α若しくはβ鎖（例えば、CD79a若しくはCD79b、又はCD19、CD21若しくはCD81）を含むB細胞抗原受容体（BCR）複合体の成分を標的としてもよい。

20

30

#### 【0029】

そのような実施例の全てにおいて、免疫療法用タンパク質は、ITAM含有活性化受容体と阻害性受容体FcγRIIbとの必要な共架橋をもたらし、FcγRIIbの阻害作用を動員し、上記の考察から理解されるように、これは、免疫療法用タンパク質の標的がかなり変化するいくつかの異なる方法で達成され得、したがって、幅広い範囲の異なる疾患又は状態の治療又は予防のためのそれらの潜在的な使用を可能にする。

#### 【0030】

より具体的には、免疫療法用タンパク質が、FcγRIIbへの結合及びFcγRIIbの活性化による疾患又は状態の治療又は予防のために使用されることが意図されるいくつかの例では、免疫療法用タンパク質は、免疫グロブリンのFc部分を介してFcεRIに結合した免疫複合体（すなわち、抗原がIgE、IgG又はIgAと複合化されている）、又は活性化型FcγR（例えば、FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIc、及びFcγRIIIa若しくはFcγRIIIb、それぞれ別名CD64、CD32a、CD32c、CD16a、及びCD16bとして知られている）、又は活性化型受容体FcαRI（CD89）中に存在する目的の抗原に標的化された抗原結合領域などの結合ドメインを含んでもよい。したがって、目的の抗原は、例えば、アレルギー性疾患の治療又は予防のための免疫療法用タンパク質の使用のためのアレルゲン（例えば、蜂毒）、自己免疫疾患の治療又は予防のための免疫療法用タンパク質の使用のための自己抗原（例えば、全身性エリテマトーデス（SLE）又は多発性硬化症（MS）に関連する自己抗原）、免疫複合体血管炎などの他の炎症性疾患に関連する抗原、抗体媒介性移植拒絶の治療又は予

40

50

防のための免疫療法用タンパク質の使用を可能にする、移植された組織又は器官からの抗原、及び細菌又はウイルス病原体の抗原（SARS-CoV-2又はデングウイルスの抗原）などの感染性因子の抗原から選択され得る。

#### 【0031】

あるいは、免疫療法用タンパク質が、FcγRIIbへの結合及びFcγRIIbの活性化による疾患又は状態の治療又は予防のために使用されることが意図されるいくつかの例では、免疫療法用タンパク質は、免疫グロブリンのFc部分を介してFcεRIに結合した免疫複合体、又は活性化型FcγR（例えば、FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIc、及びFcγRIIIa若しくはFcγRIIIb）、又は活性化型受容体FcαRI中に存在する免疫グロブリンを標的とする抗原結合領域などの結合ドメインを含んでもよい。すなわち、抗原がIgE、IgG又はIgAと複合化される場合、免疫療法用タンパク質は、IgE、IgG又はIgAの重鎖又は軽鎖に標的化されて、FcγRIIbと活性化Fc受容体との共架橋をもたらし得る。したがって、このように標的化された免疫療法用タンパク質はまた、アレルギー性疾患（例えば、アレルゲンが標的化された免疫グロブリンと複合化されている場合）、SLE及びMSなどの自己免疫疾患（例えば、自己抗原が免疫療法用タンパク質によって標的化された免疫グロブリンと複合化されている場合）、免疫複合体血管炎などの他の炎症性疾患（例えば、関連する抗原が標的化された免疫グロブリンと複合化されている場合）、抗体媒介性移植拒絶（例えば、移植された組織又は器官からの抗原が標的化された免疫グロブリンと複合化されている場合）、並びに感染性疾患（例えば、感染性因子の抗原が標的化された免疫グロブリンと複合化されている場合）、更には増殖性疾患（例えば、がん抗原が、療法用タンパク質によって標的化された免疫グロブリンと複合化されている場合）の治療又は予防のためにも使用することができる。

#### 【0032】

更に、免疫療法用タンパク質がFcγRIIbへの結合及びFcγRIIbの活性化による疾患又は状態の治療又は予防のために使用されることが意図されるいくつかの例では、免疫療法用タンパク質は、免疫複合体が活性化Fc受容体（又は1つ以上のサブユニット）に結合しているかどうかにかかわらず、免疫グロブリンFc結合サブユニット又は発現及び／若しくはシグナル伝達に必要な関連サブユニットなどの活性化Fc受容体又はその1つ以上のサブユニットに標的化された抗原結合領域などの結合ドメインを含んでもよい（例えば、結合ドメインは、リガンド結合鎖FcεRIαサブユニット、並びに関連するFcεRIβ及びγサブユニットから構成されるFcεRIのサブユニットのうちのいずれかに標的化され得る）。したがって、このように標的化された免疫療法用タンパク質は、アレルギー性疾患（例えば、アレルゲンを含む免疫複合体が活性化FcRに結合している場合）、SLE及びMSなどの自己免疫疾患（例えば、自己抗原を含む免疫複合体が活性化FcRに結合している場合）、免疫複合体血管炎などの他の炎症性疾患（例えば、関連する抗原を含む免疫複合体が活性化FcRに結合している場合）、抗体媒介性移植拒絶（例えば、移植された組織又は器官からの抗原を含む免疫複合体が活性化FcRに結合している場合）、並びに感染症（例えば、感染性因子の抗原を含む免疫複合体が活性化FcRに結合している場合）の治療又は予防のためにも使用することができる。

#### 【0033】

更に、免疫療法用タンパク質が、FcγRIIbへの結合及びFcγRIIbの活性化による疾患又は状態の治療又は予防のために使用されることが意図されるいくつかの例では、免疫療法用タンパク質は、B細胞受容体複合体（BCR）（すなわち、抗原がB細胞の表面上の膜IgE、IgG又はIgAに結合している）に結合している目的の抗原に標的化された抗原結合領域などの結合ドメインを含んでもよい。したがって、このように標的化された免疫療法用タンパク質は、結合した抗原を含むBCRへのFcγRIIbの共架橋がFcγRIIbの活性化をもたらし、それによって、抗体産生（及び／又はB細胞増殖）を停止するFcγRIIb阻害作用を動員するように、アレルギー性疾患（例えば、免疫療法用タンパク質がBCRの膜免疫グロブリンに結合した抗原に結合する場合）の

治療又は予防のために使用することができる。同様に、そのような免疫療法用タンパク質は、SLE及びMSなどの自己免疫疾患、免疫複合体血管炎などの他の炎症性疾患、抗体媒介性移植拒絶、及び感染性疾患の治療又は予防のために使用することができる。

#### 【0034】

更に、免疫療法用タンパク質が、FcγRIIbへの結合及びFcγRIIbの活性化による疾患又は状態の治療又は予防のために使用されることが意図されるいくつかの例では、免疫療法用タンパク質は、B細胞抗原受容体(BCR)複合体などのFc受容体以外の活性化受容体に標的化される抗原結合領域などの結合ドメインを含んでもよい。例えば、免疫療法用タンパク質は、例えば、膜免疫グロブリンの可変ドメイン(例えば、免疫療法用タンパク質は、抗イディオタイプIgG2抗体であり得る)を標的とすることによって、BCR複合体の膜免疫グロブリン(例えば、B細胞の表面上の膜IgE、IgG又はIgA)に標的化されてもよい。標的化BCRの膜免疫グロブリンは、結合抗原を含んでも、含まなくてもよい。したがって、このように標的化された免疫療法用タンパク質は、FcγRIIbのBCRへの共架橋がFcγRIIbの活性化をもたらし、それによって抗体産生(及び／又はB細胞増殖)を停止するFcγRIIb阻害作用を動員するように、アレルギー性疾患(例えば、免疫療法用タンパク質が結合アレルゲンの有無にかかわらず、BCR複合体の膜免疫グロブリンに結合する場合)の治療又は予防のために使用することができる。同様に、そのような免疫療法用タンパク質は、SLE及びMSなどの自己免疫疾患、免疫複合体血管炎などの他の炎症性疾患、抗体媒介性移植拒絶、及び感染性疾患の治療又は予防のために使用することができる。加えて、BCRなどの非Fc型活性化受容体に標的化される免疫療法用タンパク質は、白血病(例えば、急性リンパ芽球性白血病(ALL)及び慢性リンパ性白血病(CLL))、リンパ腫(例えば、B細胞リンパ腫及びT細胞リンパ腫)、及びX連鎖性増殖性疾患などの増殖性疾患、特にリンパ増殖性疾患(LPD)の治療又は予防のためにも使用することができ、FcγRIIbのBCRへの共架橋をもたらす免疫療法用タンパク質の能力は、次に、FcγRIIbの活性化を引き起こし、それによって、FcγRIIb阻害作用を動員して、がん性細胞の増殖を停止させることができる。

#### 【0035】

更に、免疫療法用タンパク質がFcγRIIbへの結合及びFcγRIIbの活性化による疾患又は状態の治療又は予防のために使用されることが意図されるいくつかの例では、免疫療法用タンパク質は、B細胞抗原受容体(BCR)複合体又はその1つ以上のサブユニット、例えば、発現及び／又はシグナル伝達に必要な膜免疫グロブリン又は関連サブユニットに標的化された抗原結合領域などの結合ドメインを含んでもよい(例えば、結合ドメインは、抗原結合膜免疫グロブリン(例えば、IgM、IgD、IgG、IgE若しくはIgA)、並びに関連するIg-α若しくはβ鎖(例えば、CD79a若しくはCD79b)又は他の関連タンパク質(例えば、CD19、CD21若しくはCD81)から構成されるBCR複合体のサブユニットのうちのいずれかに標的化され得る。標的化BCRの膜免疫グロブリンは、結合抗原を含んでも、含まなくてもよい。したがって、このように標的化された免疫療法用タンパク質はまた、アレルギー性疾患(例えば、アレルゲンがBCR複合体に結合していても、していなくてもよい場合)、SLE及びMSなどの自己免疫疾患(例えば、自己抗原がBCR複合体に結合している場合)、免疫複合体血管炎等の他の炎症性疾患(例えば、関連抗原がBCR複合体に結合している場合)、抗体媒介性移植拒絶(例えば、移植された組織又は器官からの関連抗原がBCR複合体に結合している場合)、及び感染性疾患(例えば、感染性因子の関連抗原がBCR複合体に結合している場合)の治療又は予防のために使用することができる。

#### 【0036】

##### アレルギー性疾患

肥満細胞及び好塩基球は、アレルギー性疾患の病因における2つの重要なエフェクター細胞であり、いずれも高親和性IgE受容体であるFcεRIを発現する。しかしながら、それらは、IgG受容体FcγR、FcεRIのシグナル伝達を阻害し、好塩基球の活性

10

20

30

40

50

化を減少させることができる、阻害性受容体 FcγRIIb を発現する好塩基球の発現プロファイルの点で異なる。変異型 IgG2 抗体などの本開示の免疫療法用タンパク質は、（好塩基球表面上の活性化 FcR に結合した免疫複合体内で）アレルゲンに結合し、FcγRIIb にも結合して活性化 FcR への共架橋をもたらし、それによって FcγRIIb を活性化させる（すなわち、FcγRIIb 阻害機能を動員する、より具体的には、変異型 IgG2 抗体の FcγRIIb への結合が、IgE によるアレルギー性好塩基球活性化の FcγRIIb 依存性阻害を媒介する）ように標的化され得るため、本開示の方法は、重度の花粉症、アトピー性皮膚炎、ピーナッツアレルギーなどの食物アレルギー、及び毒素（例えば、蜂毒）に対するアレルギーのようなアレルギー性疾患及び状態の治療又は予防を可能にする。FcγRIIb を発現するヒト肥満細胞のサブセットはまた、ヒト肥満細胞細胞のサブセット上でのその発現を介して（Burton OT et al., Front Immunol 9:1244, doi: 10.3389/fimmu.2018）、アレルギー性疾患及び状態を調節するように作用し得る（例えば、food allergy, Burton OT et al., J Allergy Clin Immunol 141(1):189-201.e3, 2018）。したがって、変異型 IgG2 抗体などの本開示の免疫療法用タンパク質は、肥満細胞上で FcγRIIb 阻害機能を動員し得る。望ましくは、変異型 IgG2 抗体はまた、望ましくない肥満細胞活性化を回避するために、FcγRI（強力な肥満細胞活性化を誘導することができる）への結合能を示さない、又はわずかに示し得る。

10

20

【0037】

自己免疫疾患及び状態

例えば、自己抗原を含む結合免疫複合体を介して FcγRIIb を活性化型 FcR に共架橋することによって、罹患した対象内に存在する FcγRIIb 受容体の活性化を促進することによって、本開示の方法は、上記のようなものなどの自己免疫疾患及び状態の有益な治療及び／又は予防を可能にする。しかしながら、対象における FcγRIIb の発現及び／又はシグナル伝達活性の低下（例えば、受容体発現及びシグナル伝達に影響を及ぼす FcγRIIb のプロモーター及び膜貫通ドメインにおける多型に起因する）は、全身性エリテマトーデス（SLE）、グッドパスチャー症候群、免疫性血小板減少症（ITP）及び関節リウマチ（RA）を含む自己免疫疾患及び状態に対する感受性の増加と関連している（Floto RA et al., Nat Med 11:1056-1058, 2005、Li X et al., Arthritis Rheum 48:3242-3252, 2003、及び Radstake TR et al., Arthritis Rheum 54:3828-3837, 2006）。したがって、本開示の方法が自己免疫疾患又は状態に罹患しているか、又はその傾向がある対象との使用を意図されているいくつかの実施形態では、本方法は、FcγRIIb のプロモーター及び膜貫通ドメインにおける関連する多型（例えば、FCGR2B のプロモーター領域における多型（Su K et al., J Immunol 172:7186-7191, 2004、及び Blank MC et al., Hum Genet 117:220-227, 2005）、及び FcγRIIb の膜貫通ドメインにおける I232T 多型（Kyogoku C et al., Arthritis Rheum 46:1242-1254, 2002））について遺伝子型決定することによって対象を選択するステップを更に含み得る。

30

40

【0038】

感染性疾患

本開示による変異型 IgG2 抗体などの免疫療法用タンパク質を使用して、例えば、Bリンパ球上の BCR の ITAM 受容体ベースのシグナル伝達の調節（すなわち、FcγRIIb（ITIM 受容体）を共発現する細胞上の ITAM 受容体を標的とすることによる）を標的とすることができる。すなわち、B細胞において、BCR の FcγRIIb 阻害は、抗体産生を調節するための重要な免疫チェックポイントであり（Lehmann B et al., Expert Rev Clin Immunol 8:243-254

50

、2012）、おそらくは体細胞過剰変異中の自己反応性B細胞のアポトーシスによる除去によって（Pearse RN et al., *Immunity* 10:753-760, 1999）、体液性免疫系の選択的抗原特異性を制限し、B細胞の産生を適切な抗体レパートリーに向ける。これは、もちろん、細菌病原体（例えば、*Neisseria meningitides*、*Streptococcus pneumoniae*、*Haemophilus influenzae*及びメチシリン耐性*Staphylococcus aureus*（「黄金ブドウ球菌（Golden Staph）」））又はウイルス（例えば、C型肝炎（HCV）、及びヒト免疫不全ウイルス-1（HIV-1））による感染と「戦う」上で有益であり得る。

【0039】

#### 増殖性疾患

Bリンパ球のBCRは、様々なB細胞由来のリンパ系がんの発病に関与することが示されており、ますます多くの証拠によって、BCRの抗原非依存的な自己会合が、慢性リンパ球性白血病（CLL）、重鎖疾患（HCD）、及び活性化B細胞様亜型びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（ABC DLBCL）などの多くのB細胞腫瘍型における重要な特徴であることが示唆されている（Duhren-von Minden M et al., *Nature* 463 (7415):309-312, 2012、Corcos D et al., *Current Biology* 5 (10):1140-1148, 1995、及びDavis RE et al., *Nature* 463 (7277):88-92, 2010）。したがって、本開示の方法はまた、増殖性疾患、特にB細胞由来のリンパ系がんの予防及び／又は治療に適用されてもよく、変異型IgG2抗体を使用して、例えば、BCR又はBCRのサブユニットに複合化された（すなわち、変異型IgG2抗体によって標的化された）関連抗原を介してFcγRIIbをBCRに共架橋することによって、B細胞上のFcγRIIbを活性化させて、BCRシグナル伝達の阻害をもたらすことができる。

【0040】

FcγRIIb媒介性エンドサイトーシス／内在化（「スイーピング」）による疾患の治療

いくつかの他の実施形態では、本開示の方法は、対象における疾患又は状態の治療のために使用されてもよく、白血球及びいくつかの他の非造血細胞型（例えば、肝類洞内皮細胞（LSEC））の表面上に存在するFcγRIIbによる循環からの免疫複合体（例えば、オプソナイズドウイルス、タンパク質（例えば、サイトカイン）及び毒素を含む「小さな」可溶性複合体；Iwayanagi Y et al., *J Immunol* 195:3198-3205, 2015、及びMates JM et al., *Front Immunol* 8:35, 2017）のクリアランスは、当該疾患又は状態の治療又は予防に有益である。Fc受容体型及び貪食細胞（例えば、FcγRIII）を活性化させることによって実行され、例えば、細菌、寄生虫及びがん性細胞などの大きなものを含む大きな免疫複合体を除去する貪食とは機構的に異なり、この現象を中心とした新しい治療薬の開発にはかなりの関心がある（例えば、Iwayanagi Y et al., 2015（前掲）、及びChenoweth AM et al., 2020（前掲）を参照されたい）。したがって、そのような実施形態のいくつかの例では、変異型IgG2抗体などの免疫療法用タンパク質は、例えば、抗原（例えば、ウイルス抗原）、又は免疫グロブリン、ホルモン、代謝物、サイトカイン若しくは毒素などの他のタンパク質若しくはは化学物質に標的化されて、小さな可溶性免疫複合体の形成を可能にし得る。次に、LSECのFcγRIIb受容体への免疫療法用タンパク質の結合は、循環からの免疫複合体のスイーピングクリアランスを媒介し得る。したがって、そのような免疫療法用タンパク質は、例えば、感染性疾患（例えば、SARS-CoV-2ウイルス感染症などのウイルス感染症、又は内毒素などの毒素の産生を特徴とする感染症）、及びクッシング症候群などの内分泌障害（Buliman et al., *J Med Life* 9:12-18, 2016）、並びに、例えばサイトカインの過剰発現を特徴とする炎症性疾患（疾患の

10

20

30

40

50

再燃中の循環単球からのIL-1 $\beta$ の過剰発現を特徴とするTNF受容体関連周期症候群 (TRAPS) (Bachetti T et al., Ann Rheum Dis 72:1044-1052, 2013)、IL-17又はIL-23の産生を特徴とする乾癬、TNF又はIL-1 $\beta$ などのサイトカインの産生を特徴とする関節リウマチ、自己抗体の産生を特徴とする自己免疫疾患、及びIgEの産生を特徴とするアレルギー疾患など)の治療又は予防のために使用することができる。

#### 【0041】

Fc $\gamma$ RIIb媒介性足場形成による疾患の治療

いくつかの他の実施形態では、本開示の方法は、対象における疾患又は状態を治療するために使用され得、免疫療法用タンパク質の増強されたアゴニスト機能は、Fc $\gamma$ RIIb「足場形成」によって達成され得、エフェクター細胞内ではシグナルは生成されないが、1つの細胞上のFc $\gamma$ RIIbによるオプソナイジング抗体(例えば、本開示の変異型IgG2抗体)の「超架橋」が、例えば、細胞のアゴニスト的増殖におけるアポトーシス若しくは活性化の誘導及び／又はそれらのサイトカイン分泌などの有益な治療効果をもたらし得るコンジュゲート標的細胞内でシグナルを生成する(Chenoweth AM et al., 2020(前掲))。したがって、そのような実施形態のいくつかの例では、変異型IgG2抗体等の免疫療法用タンパク質は、例えば、がん性細胞(例えば、CD20)の表面上に存在するがん抗原、又は免疫細胞(例えば、T細胞)上に存在する細胞表面抗原(例えば、CTLA4)に標的化されてもよい。したがって、そのような免疫療法用タンパク質は、例えば、増殖性疾患及び自己免疫疾患の治療又は予防のために使用できる。

10

20

#### 【0042】

上記から、本開示の免疫療法用タンパク質、好ましくは変異型IgG2抗体は、典型的には、目的の抗原などの標的又は活性化Fc受容体、BCR複合体の免疫グロブリン、又は活性化Fc受容体複合体若しくはBCR複合体のサブユニットなどに結合した抗体などの免疫グロブリンに特異的に結合する抗原結合領域を含むことが明らかとなるであろう。したがって、例えば、本開示の方法がアレルギー性疾患に罹患している対象との使用を意図されている場合、本開示による変異型IgG2抗体の抗原結合領域は、アレルゲンである抗原(例えば、蜂毒アレルゲンApm1、並びにピーナッツアレルゲンArah1、Arah2、Arah3及びArah6)に特異的に結合し得る。同様に、自己免疫疾患又は状態に罹患しているか、又はその傾向がある対象とともに使用することを意図された本開示の方法との関連において、変異型IgG2抗体の抗原結合領域は、自己抗原である抗原(例えば、SLEの一般的な抗Sm/RNP、抗Ro/La、及び抗dsDNA自己抗原のうちの1つ)に特異的に結合し得る。更に、本方法が感染性疾患の治療での使用を意図されている場合、変異型IgG2抗体の抗原結合領域は、病原性抗原(例えば、BCR複体内に結合した)に特異的に結合し得るか、又はそうでなければ、病原性抗原を含むBCR複体の膜免疫グロブリンに特異的に結合し得る。同様に、増殖性疾患の治療での使用を意図された変異型IgG2抗体の抗原結合領域は、BCR複体に結合したがん抗原に特異的に結合し得るか、又は代替的に、Fc $\gamma$ RIIb媒介性足場形成を含む方法において、変異型IgG2抗体の抗原結合領域は、がん性細胞の表面上に存在するがん性抗原(例えば、CLL細胞の表面上に見出されるCD20及びCD52抗原、並びに一部の乳がん及び膵臓がんにおいて過剰発現されるムチン(例えばMUC-1)などのがん細胞に差次的に発現される及び／又は存在する細胞表面抗原、に特異的に結合して、がん性細胞のアポトーシスをもたらし得る。

30

40

#### 【0043】

いくつかの実施形態では、本開示の方法での使用に好適な変異型IgG2抗体は、免疫コンジュゲートとして提供されてもよく、この抗体は、例えば、目的の抗原に結合する追加の能力を提供する分子(例えば、第1の結合特異性を有する抗原結合領域を含み、第2の結合特異性を有する別の分子に連結されている二重特異性IgG2抗体)又は他の機能性を提供する分子(例えば、染料などの検出可能な分子又は相補性薬物分子などの治療上

50

重要な分子)などの別の分子にコンジュゲートされる。

【0044】

いくつかの他の実施形態では、本開示の方法での使用に好適な変異型IgG2抗体は、二量体又は多量体形態(例えば、変異型IgG2抗体の3つ、4つ、5つ、6つ(六量体)などのコピー)で提供され得る。二量体及び多量体形態の抗体(例えば、stradomers(商標)、又は隣接する抗体分子のFc領域の自己会合による)を産生するための標準的な方法論は、当業者に周知である(例えば、Diebold et al., Science 343(6176):1260-1263, 2014を参照されたい)。

【0045】

本開示の方法は、典型的には、ヒト対象における疾患又は状態の治療に適用されるであろう。しかしながら、対象はまた、例えば、家畜動物(例えば、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ及びヤギ)、同伴動物(例えば、イヌ及びネコ)、及びエキゾチック動物(例えば、非ヒト霊長類、トラ、ゾウなど)から選択され得る。

【0046】

第2の態様では、本開示は、例えば、アレルギー性疾患、自己免疫疾患及び状態、感染性疾患、並びに増殖性疾患を含む、FcγRIIbへの結合及び/又はFcγRIIbの活性化が有益である疾患又は状態を治療するための、第1の態様で定義される免疫療法用タンパク質の使用を提供する。

【0047】

第3の態様では、本開示は、例えば、アレルギー性疾患、自己免疫疾患及び状態、他の炎症性疾患、感染性疾患、並びに増殖性疾患を含む、FcγRIIbの活性化が有益である疾患又は状態を治療するための医薬品の製造における、第1の態様で定義される免疫療法用タンパク質の使用を提供する。

【0048】

第4の態様では、本開示は、第1の態様で定義される免疫療法用タンパク質と、薬学的に許容される担体、希釈剤、及び/又は賦形剤と、を含む、薬学的組成物又は医薬品を提供する。

【0049】

本明細書では、当業者によく知られているいくつかの用語が用いられる。それにもかかわらず、明確にするために、これらの用語のいくつかを以下に定義する。

【0050】

本明細書で使用する場合、「IgG2抗体」という用語は、IgG2定常重(CH)領域(すなわち、CH1、CH2及びCH3ドメインが、IgG2 CH1、CH2及びCH3ドメインであり、各ドメインが、独立して、例えば、Wines BD et al., 2016(前掲)において以前に詳細に記載されている野生型ヒト配列としての野生型配列と同一であるか、又は野生型配列に対して少なくとも95%、好ましくは少なくとも98%の同一性を示すアミノ酸配列を含む)を含む任意の重鎖ポリペプチドであって、抗体が、IgG2 Fcドメインを含む「IgG2骨格」を含み、例えば、可変重鎖(VH)領域がIgG2 CH領域と同じ種に由来しても、しなくてもよい別の免疫グロブリンクラス又はサブクラス(例えば、IgA、IgE、IgG1など)の抗体に由来するキメラ重鎖ポリペプチドを含む抗体を含むような、任意の重鎖ポリペプチドを指す(例えば、IgG2抗体は、ヒトIgG2 CH領域及びマウスIgE VH領域を含む重鎖ポリペプチドを含み得る)。更に、「IgG2抗体」は、IgG2又は任意の他の免疫グロブリンクラス若しくはサブクラスに由来する定常軽(CL)領域及び/又は可変軽(VL)領域を含む軽鎖ポリペプチドを含んでもよく、又は軽鎖ポリペプチドがキメラであり、当該領域の一方は、1つの免疫グロブリンクラス又はサブクラスからの抗体に由来し、当該領域の他方は、別の免疫グロブリンクラス又はサブクラスからの抗体に由来することが理解されるべきである(例えば、IgG2抗体は、ヒトIgκ CL領域と、IgE由来のVL領域と、を含む軽鎖ポリペプチドを含み得る)。

10

20

30

40

50

## 【0051】

「標的」という用語、並びに「標的化された (targeted)」及び「標的とする (targeting)」などのその派生語は、用語が使用される文脈により当業者によって十分に理解されるであろう。例えば、「標的」は、作用又はプロセスが対象とする何かを指すものとして理解されるであろう。例えば、抗体の特徴／活性の文脈で本明細書で使用される場合、「標的抗原」は、その抗体が結合する抗原を指すものとして理解され、同様に、何かを「標的とする」ことは、抗体（又は他の免疫療法用分子）が、その何か（例えば、抗原、免疫チェックポイント、受容体など）に結合するように調製されることであることが理解されるであろう。

## 【0052】

本明細書で使用される場合、2つのアミノ酸配列間の「% 同一性」という用語は、Karlin S and SF Altschul, Proc Natl Acad Sci U S A 87:2264-2268, 1990に記載され、Karlin S and SF Altschul, Proc Natl Acad Sci U S A 90:5873-5877, 1993におけるように修正されたようなものなどの数学的アルゴリズムを使用して計算されたと理解される配列同一性パーセンテージを指す。そのようなアルゴリズムは、Altschul SF et al., J Mol Biol 215:403-410, 1990のNBLAST及びXBLASTプログラムに組み込まれる。BLASTタンパク質検索は、デフォルトパラメータを使用してXBLASTプログラムで実行できる (ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/を参照されたい)。2つのアミノ酸配列間の配列同一性パーセンテージを決定するために、数学的アルゴリズムは、最適な比較目的のために配列をアラインメントし、配列が共有する同一位置の数の関数として、配列間のパーセント同一性を計算し得る（すなわち、パーセント同一性 = 同一位置の数 / 位置（例えば、重複位置）の総数 × 100）。

## 【0053】

本明細書で使用される場合、「治療する (treating)」という用語は、疾患又は状態の確立された症状の予防及び緩和を含む。したがって、疾患又は状態を「治療する」という行為は、(1) 疾患又は状態に罹患しているか、又はその傾向がある対象において発症する疾患又は状態の臨床症状の出現を予防するか、又は遅延させること、(2) 疾患又は状態を阻害すること（すなわち、維持治療の場合には疾患若しくは状態又はその再発、又は少なくとも1つのその臨床的若しくは無臨床的症状の発症を阻止するか、低減するか、又は遅延させること）、並びに(3) 疾患又は状態を軽減又は減弱させること（すなわち、疾患若しくは状態又はその臨床的若しくは無臨床的症状のうちの少なくとも1つの退行を引き起こすこと）を含む。

## 【0054】

本明細書で使用される場合、「医薬品の製造」という語句は、第1の態様で直接医薬品として定義されるような、又は第1の態様で定義されるような1つ以上の免疫療法用タンパク質を含む医薬品の製造の任意の段階での、1つ以上の免疫療法用タンパク質の使用を含む。

## 【0055】

「有効量」という用語は、有益な又は所望の臨床結果をもたらすのに十分な量である。有効量は、1回以上の投与で投与することができる。典型的には、有効量は、疾患若しくは状態を治療するのに十分であるか、又はそうでなければ、疾患若しくは状態を緩和するか、改善するか、安定化させるか、逆転させるか、遅延させるか、又はその進行を遅らせるのに十分である。例としてのみ、変異型IgG2抗体などの免疫療法用タンパク質の有効量は、1日当たり約0.1～約250mg/kg体重、より好ましくは1日当たり約0.1～約100mg/kg体重、更により好ましくは1日当たり約0.1～約25mg/kg体重を含み得る。しかしながら、上記にかかわらず、有効量は変化し得、治療される対象の年齢、体重、性別、及び／又は健康、特定のタンパク質の活性、特定のタンパク質の代謝安定性及び作用時間、特定のタンパク質の投与経路及び時間、特定のタンパク質の

10

20

30

40

50

排泄速度、並びに例えば、治療される疾患又は状態の重症度を含む、様々な要因に依存してもよいことが、当業者によって理解されるであろう。

【0056】

免疫療法用タンパク質は、治療される特定の疾患又は状態の治療のための1つ以上の追加の薬剤と組み合わせて投与されてもよい。例えば、免疫療法用タンパク質は、アレルギー性疾患を治療するための他の薬剤（例えば、抗ヒスタミン薬（静脈内に（i v）投与されるもの、コルチゾン及び／又はアルブテロールなどのベータ-アゴニスト薬を含む））と併用されてもよく、又は増殖性疾患の治療との関連では、免疫療法用タンパク質は、がんを治療するための他の薬剤（例えば、シスプラチン、ゲムシタビン、シトシンアラビノシド、ドキシルビシン、エピルビシン、タキソールを含むタキソイド、エトポシドなどのトポイソメラーゼ阻害剤、タモキシフェンなどの細胞増殖抑制剤、アロマターゼ阻害剤（例えば、アナストロゾール）、及び成長因子機能の阻害剤（例えば、抗e r b B 2抗体トラスツズマブ（H e r c e p t i n（商標））などの抗体）などの抗腫瘍性薬を含む）と併用されてもよい。

10

【0057】

他の薬剤と併用される場合、免疫療法用タンパク質は、同じ薬学的組成物で、又は別個の薬学的組成物で投与され得る。別個の薬学的組成物で投与される場合、免疫療法用タンパク質及び他の薬剤は、同時に、又は任意の順序で連続的に（例えば、数秒以内、又は数分以内、又は数時間（例えば、2～48時間）以内）投与されてもよい。

【0058】

免疫療法用タンパク質は、薬学的に許容される担体、希釈剤、及び／又は賦形剤とともに、薬学的組成物に製剤化され得る。好適な担体及び希釈剤の例は、当業者には周知であり、例えば、Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Co., Easton, PA 1995に記載されている。本明細書に記載の様々な異なる形態の薬学的組成物に好適な賦形剤の例は、the Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2<sup>nd</sup> Edition, (1994), Edited by A Wade and P J Wellerに見出され得る。好適な担体の例としては、ラクトース、デンプン、グルコース、メチルセルロース、ステアリン酸マグネシウム、マンニトール、ソルビトールなどが挙げられる。好適な希釈剤の例としては、エタノール、グリセロール、及び水が挙げられる。担体、希釈剤、及び／又は賦形剤の選択は、意図される投与経路及び標準的な医薬的慣習に関して行われ得る。

20

30

【0059】

第1の態様で定義される免疫療法用タンパク質を含む薬学的組成物は、任意の好適な結合剤、潤滑剤、懸濁化剤、コーティング剤、及び可溶化剤を更に含んでもよい。好適な結合剤の例としては、デンプン、ゼラチン、グルコース等の天然糖、無水ラクトース、遊離ラクトース、ベータ-ラクトース、トウモロコシ甘味料、アカシア、トラガカント又はアルギン酸ナトリウムなどの天然及び合成ガム、カルボキシメチルセルロース及びポリエチレングリコールが挙げられる。好適な潤滑剤の例としては、オレイン酸ナトリウム、ステアリン酸ナトリウム、ステアリン酸マグネシウム、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウムなどが挙げられる。防腐剤、安定剤、及び更には染料を薬学的組成物中に提供してもよい。防腐剤の例としては、安息香酸ナトリウム、ソルビン酸、及びp-ヒドロキシ安息香酸のエステルが挙げられる。酸化防止剤及び懸濁剤も使用してもよい。

40

【0060】

第1の態様で定義される免疫療法用タンパク質を含む薬学的組成物は、典型的には、静脈内又は皮下投与に適合される。したがって、薬学的組成物は、対象に注入してもよく、滅菌又は滅菌可能な溶液から調製される溶液又はエマルジョンを含み得る。薬学的組成物は、単位投薬形態（すなわち、単位用量、又は単位用量の複数ユニット若しくはサブユニットを含む別個の部分の形態）で製剤化され得る。

【0061】

50

本開示の方法、使用、及び薬学的組成物は、以下の非限定的な例を参照して、以下で更に説明される。

#### 【実施例】

##### 【0062】

#### 実施例 1

##### 方法及び材料

##### 抗体及び試薬

ウサギ抗ヒトIgE (Dako Agilent, Santa Clara, CA<United States of America) のF(ab')<sub>2</sub>断片を、Current Protocols in Immunology, Andrew SM and JA Titus, Chapter 2: Unit 2.8, 2001に記載されているように、ペプシン消化物によって産生した。簡単に述べると、ウサギ抗体を消化緩衝液 (0.2 M NaOAc, pH 4.0) に対して透析し、次に、消化緩衝液中の等容量のペプシン (0.1 mg/ml) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, United States of America) を添加して37℃で一晩インキュベートした。2 MのTris塩基 (pH 8.0) 10% (v/v) を添加することによって消化を停止し、次に消化物をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH 8.0) に対して透析した。ハプテン2, 4, 6-トリニトロフェニル (TNP) を、水中10% 2, 4, 6-トリニトロベンゼンスルホン酸 (Sigma-Aldrich) とともにインキュベートすることによって、ウサギ抗ヒトIgE (抗IgE-TNP)、蜂毒アレルゲン (Apm 1-TNP) のF(ab')<sub>2</sub>断片に、又はウシ血清アルブミン (BSA-TNP) にコンジュゲートし、室温で90分間0.1 Mホウ酸塩 (pH 7.0) で1/20に希釈し、次いでPBS (pH 7.0) に対して透析した。

##### 【0063】

##### ヒトドナー

健康なドナー及びアレルギー患者を動員し、血液試料を採取した。蜜蜂毒アレルギーを呈した患者を、ImmunoCAP (Phadia, Uppsala, Sweden) によって関連するアレルゲンに対するIgE反応性について試験した。

##### 【0064】

##### 細胞表面FcγRの発現

ヒトFcγRを、内因性マウスFc受容体を欠くマウスB細胞株IIA1.6中で発現させた。ヒトFcγRIIIa-H<sup>131</sup>、FcγRIIIa-R<sup>131</sup>及びFcγRIIbを発現する細胞は、以前に記載されている (例えば、Powell MS et al., J Immunol 176 (12): 7489-7494, 2006、Ramsland PA et al., J Immunol 187 (6): 3208-3217, 2011、及びTrist HM et al., J Immunol 192 (2): 792-803, 2014)。ヒトFcγRIIIa (GenBank: 受託NP\_001121065) 対立遺伝子形態V<sup>158</sup>及びF<sup>158</sup>並びにヒトFcγRI (Allen JM and B Seed, Science 243 (4889): 378-381, 1989) を発現する細胞株を、FcγRIIIaについて記載されるように生成した (Powell et al., 2006 (前掲))。簡潔に述べると、受容体cDNAを、標準的な分子生物学技術を使用してGatewayエントリープラスミドpENTR1A (Invitrogen Corporation, Waltham, MA, United States of America) に別々にクローニングし、続いてGateway LRをネオマイシン耐性カセットを含有するGateway適合pMXI発現ベクターにクローニングした (Wines B et al., J Biol Chem 279 (25): 26339-26345, 2004)。レトロウイルスをPhoenixパッケージング細胞株 (Powell et al., 2006 (前掲)) を使用して生成し、IIA1.6細胞株を形質導入してFcγRIIIa又はFcγRIの発現するために使用した。次いで、ヒトFcγ鎖を既に発現しているIIA1.6細胞 (Wine

10

20

30

40

50

s e t a l. , 2 0 0 4 ( 前 掲 ) ) を F c γ R I 又 は F c γ R I I I レトロウイルスのいずれかで形質導入して、F c R γ / F c γ R I 又 は F c R γ / F c γ R I I I を共発現する細胞株を作製した。形質導入細胞集団上での受容体の発現を、受容体特異的抗体のビオチン化 F a b 又 は F ( a b ' )<sub>2</sub> 断片及びストレプトアビジン-APC ( 1 / 5 0 0 ) を使用して評価した。使用された抗 F c 受容体抗体は、F c γ R I I a ( I V - 3 F a b - ビオチン断片)、F c γ R I I b ( H 2 B 6 F ( a b ' )<sub>2</sub> - ビオチン)、F c γ R I ( 3 2 . 2 F ( a b ' )<sub>2</sub> - ビオチン)、F c γ R I I I a ( 3 G 8 F ( a b ' )<sub>2</sub> - ビオチン)、及び F c R γ - E G F P ( 緑色蛍光タンパク質) であり、F I T C チャンネル内で検出した。

【 0 0 6 5 】

抗 T N P ヒト I g G 及び変異型抗 T N P ヒト I g G プラスミド構築物の産生 マウス抗トリニトロフェニル ( 抗 T N P ) 抗体 T I B 1 4 2 の可変重 ( V H ) 及び軽 ( V L ) 領域配列と、ヒト I g G サブクラスからの定常重 ( C H ) 領域からの配列と、からなるキメラ抗 T N P ヒト I g G 抗体構築物については、以前に詳細に説明されている - I g G 1 ( P a t e l D e t a l. , J I m m u n o l 1 8 4 ( 1 1 ) : 6 2 8 3 - 6 2 9 2 , 2 0 1 0 ) 、 h I g G 2 及び h I g G 4 ( W i n e s B D e t a l. , 2 0 1 6 ( 前 掲 ) ) 。これには、正常な I g G 4 の C P S C 配列を C P P C に変換することによる、I g G 4 ベースの変異体のコアヒンジの安定化が含まれ、これは、半分子交換を防止する。全てのキメラ抗体配列を p C R 3 ベクターにサブクローニングした。変異を、標準的な分子生物学技術を使用して、I g G 定常重鎖 ( C H ) c D N A 配列内に作製し、表 1

【 表 1 】

表 1 I g G 変異体の概要

| 番 号  | 名 称            | 変異部位 *    |           |          |          | 備 考            |
|------|----------------|-----------|-----------|----------|----------|----------------|
|      |                | 226 - 229 | 232 - 237 | 267      | 328      |                |
| IgG1 | IgG1-WT        | CPPC      | PELLGG    | S        | L        |                |
|      | IgG1-SELF      | CPPC      | PELLGG    | <u>E</u> | <u>F</u> |                |
| IgG2 | IgG2-WT        | CPPC      | PPVAG     | S        | L        |                |
|      | IgG2-LLGG      | CPPC      | PELLGG    | S        | L        | I g G 1 様下部ヒンジ |
|      | IgG2-FEGG      | CPPC      | PEFEGG    | S        | L        |                |
|      | IgG2-FEGG-SELF | CPPC      | PEFEGG    | <u>E</u> | <u>F</u> |                |
|      | IgG2-FLGG      | CPPC      | PEFLGG    | S        | L        | I g G 4 様下部ヒンジ |
| IgG4 | IgG2-FLGG-SELF | CPPC      | PEFLGG    | <u>E</u> | <u>F</u> | I g G 4 様下部ヒンジ |
|      | IgG4-WT        | CPSC      | PEFLGG    | S        | L        |                |
|      | IgG4-LLGG      | CPPC      | PELLGG    | S        | L        | I g G 1 様下部ヒンジ |
|      | IgG4-SELF      | CPSC      | PEFLGG    | <u>E</u> | <u>F</u> |                |
|      | IgG4-FEGG      | CPPC      | PEFEGG    | S        | L        |                |
|      | IgG4-FEGG-SELF | CPPC      | PEFEGG    | <u>E</u> | <u>F</u> |                |

\* 配列番号付けは、ヒト I g G 1 E u 番号に基づく。変異は太字で下線が引かれている。下部ヒンジ配列 ( 2 3 2 ~ 2 3 7 ) はイタリックで記載している。配列表番号は以下の通りである : C P P C ( 配列番号 : 配列番号 9 ) 、 P E L L G G ( 配列番号 1 0 ) 、 P P V A G ( 配列番号 1 1 ) 、 P E F E G G ( 配列番号 1 2 ) 、 及び P E F L G G ( 配列番号 1 3 ) 。

【 0 0 6 6 】

I g G 2 - F E G G - S E L F 及び I g G 2 - F L G G - S E L F についての I g G 重鎖ポリペプチド ( C H ) の定常領域をコードする c D N A 配列を表 2 に提供し、これらは、可変重 ( V H ) 領域についての c D N A 配列にライゲーションして示している。マウス ( 抗 T N P ) 抗体の可変軽 ( V L ) 領域についての c D N A 配列も提供される。

【表 2】

〔表2-1〕

表 2

|                                                                                                                                                                             | cDNA配列及びアミノ酸翻訳                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| IgG2-FEGG-SELF変異体としてフォーマットされた抗TNP mAb<br>太字及び下線のアミノ酸配列は、表1に開示されるように、コアヒンジ配列(Eu番号付け規則によるaa残基226~229)、下部ヒンジ配列の一部(aa残基232~237)、並びに変異S267E及びL328Fに対応する。c末端配列LGKは、サブクローニングから生じる。 | <div>1 AAG CTT ACC ATG GTG CTT AGT TTG CTG TAT</div> <div>M V L S L L Y</div> <div>31 CTG CTC ACC GCC CTG CCT GGA ATC CTG AGC</div> <div>L L T A L P G I L S</div> <div>61 GAG GTG CAG TTG CAG GAA TCT GGT CCC AGT</div> <div>E V Q L Q E S G P S</div> <div>91 CTA GTT AAG CCC AGC CAG ACA CTG AGC CTG</div> <div>L V K P S Q T L S L</div> <div>121 ACA TGT AGT GTG ACC GGT GAC AGC ATT ACA</div> <div>T C S V T G D S I T</div> <div>151 AGC GGC TAC TGG AAC TGG ATC AGA CAG GTG</div> <div>S G Y W N W I R Q V</div> <div>181 CCA GGA AAC AAA CTC GAA TAC ATG GGG TTC</div> <div>P G N K L E Y M G F</div> <div>211 ATC AAT TAC AGT GGC AAT ACT TAC TAT AAT</div> <div>I N Y S G N T Y Y N</div> <div>241 CCC AGC CTG AGA AGC AGA ATT TCT ATA ACC</div> <div>P S L R S R I S I T</div> <div>271 AGA GAC ACC AGC AAA AAC CAG TAC TTT CTG</div> <div>R D T S K N Q Y F L</div> <div>301 CAC CTG AAC AGC GTA ACA ACG GAA GAC ACC</div> <div>H L N S V T T E D T</div> <div>331 GCC ACC TAT TAC TGC GCC AGG GCC AAC TGG</div> <div>A T Y Y C A R A N W</div> <div>361 GAT GTG TTC GCA TAC TGG GGC CAG GGC ACT</div> <div>D V F A Y W G Q G T</div> <div>391 CTG GTG ACG GTG AGC GCC GCG TCG ACA AAA</div> <div>L V T V S A A S T K</div> <div>421 GGC CCT AGC GTC TTT CCA CTC GCC CCA TGT</div> <div>G P S V F P L A P C</div> <div>451 TCA AGA AGC ACC AGC GAG TCA ACT GCG GCT</div> <div>S R S T S E S T A A</div> <div>481 TTG GGC TGC TTG GTG AAG GAT TAC TTC CCA</div> <div>L G C L V K D Y F P</div> <div>511 GAG CCT GTC ACT GTC AGC TGG AAT AGC GGG</div> |

10

20

30

40

50

[表2-2]

|      |                                         |
|------|-----------------------------------------|
|      | E P V T V S W N S G                     |
| 541  | GCT CTG ACC AGT GGA GTG CAC ACC TTT CCC |
|      | A L T S G V H T F F                     |
| 571  | GCC GTG TTA CAG AGC AGC GGC CTC TAT AGC |
|      | A V L Q S S G L Y S                     |
| 601  | CTG AGC AGT GTG GTA ACT GTG CCC TCG AGC |
|      | L S S V V T V P S S                     |
| 631  | AAT TTT GGT ACC CAG ACC TAT ACA TGC AAT |
|      | N F G T Q T Y T C N                     |
| 661  | GTC GAT CAT AAA CCC AGT AAC ACA AAG GTA |
|      | V D H K P S N T K V                     |
| 691  | GAC AAG ACA GTC GAA AGA AAA TGC TGT GTG |
|      | D K T V E R K C C V                     |
| 721  | GAG TGC CCT CCT TGC CCC GCC CCC GAG TTT |
|      | E <u>C P P C</u> F A <u>P E F</u>       |
| 751  | GAG GGG GGG CCT TCG GTT TTT CTT TTT CCA |
|      | <u>E G G</u> P S V F L F F              |
| 781  | CCT AAA CCG AAA GAC ACC CTG ATG ATC AGC |
|      | P K P K D T L M I S                     |
| 811  | AGG ACA CCA GAA GTG ACA TGT GTC GTC GTG |
|      | R T P E V T C V V V                     |
| 841  | GAC GTA GAG CAT GAA GAC CCG GAG GTG CAA |
|      | D V <u>E</u> H E D P E V Q              |
| 871  | TTC AAC TGG TAT GTT GAT GGT GTG GAA GTG |
|      | F N W Y V D G V E V                     |
| 901  | CAT AAT GCA AAA ACT AAG CCA CGG GAG GAA |
|      | H N A K T K P R E E                     |
| 931  | CAG TTC AAT AGC ACA TTC AGA GTA GTT AGC |
|      | Q F N S T F R V V S                     |
| 961  | GTT CTG ACT GTC GTG CAC CAA GAT TGG CTG |
|      | V L T V V H Q D W L                     |
| 991  | AAC GGG AAG GAA TAC AAG TGT AAG GTG AGC |
|      | N G K E Y K C K V S                     |
| 1021 | AAC AAA GGT TTT CCC GCT CCA ATT GAG AAA |
|      | N K G <u>F</u> P A P I E K              |
| 1051 | ACA ATT TCT AAG ACC AAA GGA CAG CCC CGG |
|      | T I S K T K G Q P R                     |
| 1081 | GAG CCA CAG GTG TAT ACT CTG CCG CCT AGC |
|      | E P Q V Y T L P P S                     |
| 1111 | AGG GAG GAA ATG ACC AAG AAC CAG GTG AGC |
|      | R E E M T K N Q V S                     |
| 1141 | CTG ACC TGT CTG GTG AAA GGC TTC TAC CCC |
|      | L T C L V K G F Y F                     |
| 1171 | AGC GAT ATC GCA GTT GAG TGG GAG AGC AAT |
|      | S D I A V E W E S N                     |
| 1201 | GGC CAA CCC GAG AAC AAC TAC AAG ACT ACG |

10

20

30

40

〔表2-3〕

|                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
|                                                                                                                                                                | <p>G Q P E N N Y K T T</p> <p>1231 CCC CCC ATG CTT GAT AGC GAC GGA TCA TTT</p> <p>P P M L D S D G S F</p> <p>1261 TTC CTG TAC TCA AAA CTG ACC GTG GAC AAA</p> <p>F L Y S K L T V D K</p> <p>1291 AGC AGA TGG CAG CAG GGA AAC GTT TTC AGT</p> <p>S R W Q Q G N V F S</p> <p>1321 TGC TCA GTG ATG CAC GAA GCG CTG CAC AAT</p> <p>C S V M H E A L H N</p> <p>1351 CAT TAT ACT CAG AAA AGC CTG AGC TTG AGC</p> <p>H Y T Q K S L S L S</p> <p>1381 TTA GGA AAA TGA TCT AGA (配列番号15)</p> <p>L G K * (配列番号16)</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 10             |
| <p>IgG2-FLGG-SELF変異体としてフォーマットされた抗TNP mAb</p> <p>太字及び下線のアミノ酸配列は、表1に開示されるように、コアヒンジ配列(Eu番号付け規則によるaa残基226~229)、下部ヒンジ配列の一部(aa残基232~237)、並びに変異S267E及びL328Fに対応する。</p> | <p>1 AAG CTT ACC ATG GTG CTT AGT TTG CTG TAT</p> <p>K L T M V L S L L Y</p> <p>31 CTG CTC ACC GCC CTG CCT GGA ATC CTG AGC</p> <p>L L T A L P G I L S</p> <p>61 GAG GTG CAG TTG CAG GAA TCT GGT CCC AGT</p> <p>E V Q L Q E S G P S</p> <p>91 CTA GTT AAG CCC AGC CAG ACA CTG AGC CTG</p> <p>L V K P S Q T L S L</p> <p>121 ACA TGT AGT GTG ACC GGT GAC AGC ATT ACA</p> <p>T C S V T G D S I T</p> <p>151 AGC GGC TAC TGG AAC TGG ATC AGA CAG GTG</p> <p>S G Y W N W I R Q V</p> <p>181 CCA GGA AAC AAA CTC GAA TAC ATG GGG TTC</p> <p>P G N K L E Y M G F</p> <p>211 ATC AAT TAC AGT GGC AAT ACT TAC TAT AAT</p> <p>I N Y S G N T Y Y N</p> <p>241 CCC AGC CTG AGA AGC AGA ATT TCT ATA ACC</p> <p>P S L R S R I S I T</p> <p>271 AGA GAC ACC AGC AAA AAC CAG TAC TTT CTG</p> <p>R D T S K N Q Y F L</p> <p>301 CAC CTG AAC AGC GTA ACA ACG GAA GAC ACC</p> <p>H L N S V T T E D T</p> <p>331 GCC ACC TAT TAC TGC GCC AGG GCC AAC TGG</p> <p>A T Y Y C A R A N W</p> <p>361 GAT GTG TTC GCA TAC TGG GGC CAG GGC ACT</p> <p>D V F A Y W G Q G T</p> <p>391 CTG GTG ACG GTG AGC GCC GCG TCG ACA AAA</p> <p>L V T V S A A S T K</p> <p>421 GGC CCT AGC GTC TTT CCA CTC GCC CCA TGT</p> <p>G P S V F P L A P C</p> <p>451 TCA AGA AGC ACC AGC GAG TCA ACT GCG GCT</p> <p>S R S T S E S T A A</p> | 20<br>30<br>40 |

10

20

30

40

[表2-4]

|  |                                                                                  |    |
|--|----------------------------------------------------------------------------------|----|
|  | 481 TTG GGC TGC TTG GTG AAG GAT TAC TTC CCA<br>L G C L V K D Y F P               |    |
|  | 511 GAG CCT GTC ACT GTC AGC TGG AAT AGC GGG<br>E P V T V S W N S G               |    |
|  | 541 GCT CTG ACC AGT GGA GTG CAC ACC TTT CCC<br>A L T S G V H T F P               |    |
|  | 571 GCC GTG TTA CAG AGC AGC GGC CTC TAT AGC<br>A V L Q S S G L Y S               | 10 |
|  | 601 CTG AGC AGT GTG GTA ACT GTG CCC TCG AGC<br>L S S V V T V P S S               |    |
|  | 631 AAT TTT GGT ACC CAG ACC TAT ACA TGC AAT<br>N F G T Q T Y T C N               |    |
|  | 661 GTC GAT CAT AAA CCC AGT AAC ACA AAG GTA<br>V D H K P S N T K V               |    |
|  | 691 GAC AAG ACA GTC GAA AGA AAA TGC TGT GTG<br>D K T V E R K C C V               |    |
|  | 721 GAG TGC CCT CCT TGC CCC GCC CCC GAG TTT<br>E <u>C P P C</u> P A <u>P E F</u> |    |
|  | 751 CTG GGG GGG CCT TCG GTT TTT CTT TTT CCA<br><u>L G G</u> P S V F L F P        | 20 |
|  | 781 CCT AAA CCG AAA GAC ACC CTG ATG ATC AGC<br>P K P K D T L M I S               |    |
|  | 811 AGG ACA CCA GAA GTG ACA TGT GTC GTC GTG<br>R T P E V T C V V V               |    |
|  | 841 GAC GTA GAG CAT GAA GAC CCG GAG GTG CAA<br>D V <u>E</u> H E D P E V Q        |    |
|  | 871 TTC AAC TGG TAT GTT GAT GGT GTG GAA GTG<br>F N W Y V D G V E V               |    |
|  | 901 CAT AAT GCA AAA ACT AAG CCA CGG GAG GAA<br>H N A K T K P R E E               |    |
|  | 931 CAG TTC AAT AGC ACA TTC AGA GTA GTT AGC<br>Q F N S T F R V V S               |    |
|  | 961 GTT CTG ACT GTC GTG CAC CAA GAT TGG CTG<br>V L T V V H Q D W L               | 30 |
|  | 991 AAC GGG AAG GAA TAC AAG TGT AAG GTG AGC<br>N G K E Y K C K V S               |    |
|  | 1021 AAC AAA GGT TTT CCC GCT CCA ATT GAG AAA<br>N K G <u>F</u> P A P I E K       |    |
|  | 1051 ACA ATT TCT AAG ACC AAA GGA CAG CCC CGG<br>T I S K T K G Q P R              |    |
|  | 1081 GAG CCA CAG GTG TAT ACT CTG CCG CCT AGC<br>E P Q V Y T L P P S              |    |
|  | 1111 AGG GAG GAA ATG ACC AAG AAC CAG GTG AGC<br>R E E M T K N Q V S              |    |
|  | 1141 CTG ACC TGT CTG GTG AAA GGC TTC TAC CCC<br>L T C L V K G F Y P              | 40 |

10

20

30

40

[表2-5]

|  |                                                                     |
|--|---------------------------------------------------------------------|
|  | 1171 AGC GAT ATC GCA GTT GAG TGG GAG AGC AAT<br>S D I A V E W E S N |
|  | 1201 GGC CAA CCC GAG AAC AAC TAC AAG ACT ACG<br>G Q P E N N Y K T T |
|  | 1231 CCC CCC ATG CTT GAT AGC GAC GGA TCA TTT<br>P P M L D S D G S F |
|  | 1261 TTC CTG TAC TCA AAA CTG ACC GTG GAC AAA<br>F L Y S K L T V D K |
|  | 1291 AGC AGA TGG CAG CAG GGA AAC GTT TTC AGT<br>S R W Q Q G N V F S |
|  | 1321 TGC TCA GTG ATG CAC GAA GCG CTG CAC AAT<br>C S V M H E A L H N |
|  | 1351 CAT TAT ACT CAG AAA AGC CTG AGC TTG AGC<br>H Y T Q K S L S L S |
|  | 1381 TTA GGA AAA TGA TCT AGA (配列番号17)<br>L G K * (配列番号18)           |

10

[表2-6]

|                                                       |                                                                    |
|-------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| キメラ抗INP軽鎖<br>ヒト定常カッパ軽鎖ドメインに接合したマウスVHを含むコドン最適化ヌクレオチド配列 | 1 ATG GAT TCC CAG GCC CAG GTG CTC ATG CTG<br>M D S Q A Q V L M L   |
|                                                       | 31 TTA CTC CTG TGG GTC TCC GGA ACC TGC GGC<br>L L L W V S G T C G  |
|                                                       | 61 GAC ATA GTG ATG TCA CAG AGC CCA AGC AGC<br>D I V M S Q S P S S  |
|                                                       | 91 CTT GCA GTG TCT GTT GGT GAG AAG GTG ACC<br>L A V S V G E K V T  |
|                                                       | 121 ATG AGC TGC AAG TCA AGC CAG AGC CTG CTC<br>M S C K S S Q S L L |
|                                                       | 151 TAT AGC AGC AAT CAG AAG AAC TAT TTG GCC<br>Y S S N Q K N Y L A |
|                                                       | 181 TGG TAT CAG AGA AAA CCC GGC CAG AGC CCT<br>W Y Q R K P G Q S P |
|                                                       | 211 AAG CTC CTT ATT TAT TGG GCT AGC ACA CGC<br>K L L I Y W A S T R |
|                                                       | 241 GAG TCC GGC GTG CCG GAC AGA TTT ACC GGC<br>E S G V P D R F T G |
|                                                       | 271 AGC GGT AGC GGC ACC GAT TTT ACT TTG ACC<br>S G S G T D F T L T |
|                                                       | 301 ATC TCG TCT GTA AAG GCC GAA GAC CTG GCA<br>I S S V K A E D L A |
|                                                       | 331 GTG TAT TAC TGT CAA CAT TAT TAC TCA TCT<br>V Y Y C Q H Y Y S S |
|                                                       | 361 CCC TAC ACT TTC GGA GGG GGG ACC AAA CTG<br>P Y T F G G G T K L |
|                                                       | 391 GAA ATT AAG CGT ACG GTT GCT GCC CCT TCT<br>E I K R T V A A P S |
|                                                       | 421 GTC TTC ATC TTC CCT CCC AGC GAT GAA CAG                        |

20

30

40

50

[表2-7]

|     |                                         |
|-----|-----------------------------------------|
|     | V F I F P P S D E Q                     |
| 451 | CTG AAA AGT GGG ACA GCG AGT GTA GTG TGC |
|     | L K S G T A S V V C                     |
| 481 | CTG CTA AAC AAT TTT TAC CCA CGG GAG GCC |
|     | L L N N F Y P R E A                     |
| 511 | AAA GTG CAG TGG AAA GTG GAC AAC GCT CTG |
|     | K V Q W K V D N A L                     |
| 541 | CAA AGT GGA AAT TCT CAG GAG TCC GTC ACA |
|     | Q S G N S Q E S V T                     |
| 571 | GAG CAG GAC TCG AAG GAC AGC ACT TAC AGC |
|     | E Q D S K D S T Y S                     |
| 601 | TTG TCA AGC ACC CTG ACG CTG AGC AAA GCC |
|     | L S S T L T L S K A                     |
| 631 | GAT TAC GAG AAG CAC AAG GTG TAC GCA TGC |
|     | D Y E K H K V Y A C                     |
| 661 | GAA GTT ACG CAC CAA GGA CTG AGT AGC CCA |
|     | E V T H Q G L S S P                     |
| 691 | GTC ACA AAG AGC TTC AAC AGG GGG GAA TGT |
|     | V T K S F N R G E C                     |
| 721 | TAG (配列番号19)                            |
|     | * (配列番号20)                              |

【0067】

抗ヒトIgE及び変異型抗ヒトIgEプラスミド構築物の産生

抗ヒトIgE抗体構築物は、療法用mAbであるオマリズマブ（ThermoFisher、GeneArt, Waltham, MA, United States of America）の可変重（VH）領域及び軽鎖領域配列をコードする合成DNAを含んでいた。H鎖構築物は、IgG4及びIgG2バリエーションについてのVH cDNA配列及び定常ドメイン配列を含んでいた。IgG重鎖及び軽鎖についてのDNAを、発現ベクターpCR3又はpcDNA3.4にサブクローニングした。結合に影響を及ぼすIgG2定常重鎖（CH）cDNA配列の変異を表1に列挙した。

【0068】

IgG重鎖ポリペプチド（CH）又は抗IgE軽鎖（CL）の定常領域、IgG4、並びにIgG2-FEGG-SELF及びIgG2-FLGG-SELFをコードするcDNA配列を表3に提供し、これらは、可変重（VH）領域についてのcDNA配列にライゲーションして示している。抗IgE抗体軽鎖についてのcDNA配列も提供する。

10

20

30

40

50

【表 3】

〔表3-1〕

| 表 3                                                                                                                                |                                                                                                                                           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                                                                                    | cDNA配列及びアミノ酸翻訳                                                                                                                            |
| IgG4としてフォーマットされた抗IgE<br>太字及び下線のアミノ酸配列は、表1に開示されるように、コアヒンジ配列(Eu番号付け規則によるaa残基226~229)、下部ヒンジ配列の一部(aa残基232~237)、並びに変異S267E及びL328Fに対応する。 | <div>1 ATG GGC TGG TCC TGC ATC ATC CTG TTT CTG</div> <div>M G W S C I I L F L</div> <div>31 GTG GCC ACA GCC ACC GGC GTG CAC TCT GAA</div> |

10

20

30

40

50

[表3-2]

|     |                                         |
|-----|-----------------------------------------|
|     | V A T A T G V H S E                     |
| 61  | GTG CAG CTG GTG GAA TCT GGC GGC GGA CTG |
|     | V Q L V E S G G G L                     |
| 91  | GTG CAG CCT GGC GGA TCT CTG AGA CTG AGC |
|     | V Q P G G S L R L S                     |
| 121 | TGT GCC GTG TCC GGC TAC AGC ATC ACC AGC |
|     | C A V S G Y S I T S                     |
| 151 | GGC TAC TCT TGG AAC TGG ATC CGG CAG GCC |
|     | G Y S W N W I R Q A                     |
| 181 | CCT GGC AAG GGA CTG GAA TGG GTG GCC TCC |
|     | P G K G L E W V A S                     |
| 211 | ATC ACC TAC GAC GGC AGC ACC AAC TAC AAC |
|     | I T Y D G S T N Y N                     |
| 241 | CCC AGC GTG AAG GGC CGG ATC ACC ATC AGC |
|     | P S V K G R I T I S                     |
| 271 | AGG GAC GAC AGC AAG AAC ACA TTC TAC CTG |
|     | R D D S K N T F Y L                     |
| 301 | CAA ATG AAC AGC CTG CGG GCC GAG GAC ACC |
|     | Q M N S L R A E D T                     |
| 331 | GCC GTG TAC TAT TGT GCC AGA GGC AGC CAC |
|     | A V Y Y C A R G S H                     |
| 361 | TAC TTC GGC CAC TGG CAC TTT GCC GTG TGG |
|     | Y F G H W H F A V W                     |
| 391 | GGC CAG GGA ACA ACG GTC ACC GTG TCT GCA |
|     | G Q G T T V T V S A                     |
| 421 | GCG TCG ACA AAA GGT CCC AGC GTG TTT CCC |
|     | A S T K G P S V F P                     |
| 451 | CTG GCT CCT TGT AGC AGA AGC ACG TCA GAA |
|     | L A P C S R S T S E                     |
| 481 | AGT ACA GCT GCC CTG GGA TGC CTG GTG AAA |
|     | S T A A L G C L V K                     |
| 511 | GAT TAT TTT CCC GAG CCC GTT ACC GTT TCC |
|     | D Y F P E P V T V S                     |
| 541 | TGG AAT AGT GGC GCC CTG ACC TCG GGC GTG |
|     | W N S G A L T S G V                     |
| 571 | CAT ACT TTT CCC GCT GTT CTG CAG AGC AGC |
|     | H T F P A V L Q S S                     |
| 601 | GGC CTG TAT AGC CTG AGC AGT GTG GTG ACT |
|     | G L Y S L S S V V T                     |
| 631 | GTT CCG TCT AGC AGC CTG GGT ACC AAG ACT |
|     | V P S S S L G T K T                     |
| 661 | TAT ACA TGC AAC GTG GAC CAT AAG CCT AGC |
|     | Y T C N V D H K P S                     |
| 691 | AAT ACT AAG GTA GAT AAG CGA GTG GAG AGC |
|     | N T K V D K R V E S                     |
| 721 | AAG TAC GGC CCC CCC TGC CCT AGC TGT CCC |

10

20

30

40

[表3-3]

|      |                                           |
|------|-------------------------------------------|
|      | K Y G P P <u>C P S C</u> P                |
| 751  | GCA CCT GAG TTT CTA GGC GGG CCC AGC GTG   |
|      | A <u>P E F L G G</u> P S V                |
| 781  | TTT CTG TTC CCC CCG AAG CCT AAA GAT ACC   |
|      | F L F P P K P K D T                       |
| 811  | CTG ATG ATC AGC AGA ACA CCC GAA GTG ACC   |
|      | L M I S R T P E V T                       |
| 841  | TGC GTG GTT GTG GAC GTC AGC CAG GAA GAT   |
|      | C V V V D V S Q E D                       |
| 871  | CCT GAG GTG CAG TTC AAT TGG TAC GTG GAC   |
|      | P E V Q F N W Y V D                       |
| 901  | GGC GTG GAG GTG CAC AAT GCT AAG ACA AAG   |
|      | G V E V H N A K T K                       |
| 931  | CCC CGC GAA GAG CAA TTC AAC AGC ACA TAT   |
|      | P R E E Q F N S T Y                       |
| 961  | AGA GTA GTA TCT GTG CTG ACC GTG CTG CAC   |
|      | R V V S V L T V L H                       |
| 991  | CAG GAT TGG CTG AAC GGC AAG GAA TAC AAA   |
|      | Q D W L N G K E Y K                       |
| 1021 | TGT AAA GTG AGC AAC AAG GGC TTA CCC AGT   |
|      | C K V S N K G L P S                       |
| 1051 | AGC ATC GAG AAG ACC ATT AGC AAA GCA AAA   |
|      | S I E K T I S K A K                       |
| 1081 | GGT CAA CCC CGG GAG CCC CAG GTG TAC ACC   |
|      | G Q P R E P Q V Y T                       |
| 1111 | CTG CCT CCG AGC CAA GAG GAA ATG ACA AAG   |
|      | L P P S Q E E M T K                       |
| 1141 | AAT CAG GTG AGC CTG ACC TGC CTG GTG AAG   |
|      | N Q V S L T C L V K                       |
| 1171 | GGA TTT TAC CCC AGC GAT ATT GCT GTG GAG   |
|      | G F Y P S D I A V E                       |
| 1201 | TGG GAG AGC AAT GGG CAA CCA GAG AAT AAC   |
|      | W E S N G Q P E N N                       |
| 1231 | TAC AAA ACG ACC CCA CCA GTA TTA GAC TCG   |
|      | Y K T T P P V L D S                       |
| 1261 | GAC GGA TCT TTC TTC TTG TAT TCG CGG CTG   |
|      | D G S F F L Y S R L                       |
| 1291 | ACT GTG GAC AAG AGC AGA TGG CAA GAG GGC   |
|      | T V D K S R W Q E G                       |
| 1321 | AAT GTT TTC AGC TGT AGC GTT ATG CAC GAA   |
|      | N V F S C S V M H E                       |
| 1351 | GCG CTG CAC AAT CAT TAT ACT CAG AAA AGC   |
|      | A L H N H Y T Q K S                       |
| 1381 | CTG AGC TTG AGC TTA GGA AAA TGA (配列番号2 1) |
|      | L S L S L G K * (配列番号2 2)                 |

10

20

30

40

[表3-4]

|                           |     |                                         |
|---------------------------|-----|-----------------------------------------|
| IgG2バリエントとしてフォーマットされた抗IgE | 1   | ATG GGC TGG TCC TGC ATC ATC CTG TTT CTG |
|                           |     | M G W S C I I L F L                     |
|                           | 31  | GTG GCC ACA GCC ACC GGC GTG CAC TCT GAA |
|                           |     | V A T A T G V H S E                     |
|                           | 61  | GTG CAG CTG GTG GAA TCT GGC GGC GGA CTG |
|                           |     | V Q L V E S G G G L                     |
|                           | 91  | GTG CAG CCT GGC GGA TCT CTG AGA CTG AGC |
|                           |     | V Q P G G S L R L S                     |
|                           | 121 | TGT GCC GTG TCC GGC TAC AGC ATC ACC AGC |
|                           |     | C A V S G Y S I T S                     |
|                           | 151 | GGC TAC TCT TGG AAC TGG ATC CGG CAG GCC |
|                           |     | G Y S W N W I R Q A                     |
|                           | 181 | CCT GGC AAG GGA CTG GAA TGG GTG GCC TCC |
|                           |     | P G K G L E W V A S                     |
|                           | 211 | ATC ACC TAC GAC GGC AGC ACC AAC TAC AAC |
|                           |     | I T Y D G S T N Y N                     |
|                           | 241 | CCC AGC GTG AAG GGC CGG ATC ACC ATC AGC |
|                           |     | P S V K G R I T I S                     |
|                           | 271 | AGG GAC GAC AGC AAG AAC ACA TTC TAC CTG |
|                           |     | R D D S K N T F Y L                     |
|                           | 301 | CAA ATG AAC AGC CTG CGG GCC GAG GAC ACC |
|                           |     | Q M N S L R A E D T                     |
|                           | 331 | GCC GTG TAC TAT TGT GCC AGA GGC AGC CAC |
|                           |     | A V Y Y C A R G S H                     |
|                           | 361 | TAC TTC GGC CAC TGG CAC TTT GCC GTG TGG |
|                           |     | Y F G H W H F A V W                     |
|                           | 391 | GGC CAG GGA ACA ACG GTC ACC GTG TCT GCA |
|                           |     | G Q G T T V T V S A                     |
|                           | 421 | GCG TCG ACA AAA GGC CCT AGC GTC TTT CCA |
|                           |     | A S T K G P S V F F                     |
|                           | 451 | CTC GCC CCA TGT TCA AGA AGC ACC AGC GAG |
|                           |     | L A P C S R S T S E                     |
|                           | 481 | TCA ACT GCG GCT TTG GGC TGC TTG GTG AAG |
|                           |     | S T A A L G C L V K                     |
|                           | 511 | GAT TAC TTC CCA GAG CCT GTC ACT GTC AGC |
|                           |     | D Y F P E P V T V S                     |
|                           | 541 | TGG AAT AGC GGG GCT CTG ACC AGT GGA GTG |
|                           |     | W N S G A L T S G V                     |
|                           | 571 | CAC ACC TTT CCC GCC GTG TTA CAG AGC AGC |
|                           |     | H T F P A V L Q S S                     |
|                           | 601 | GGC CTC TAT AGC CTG AGC AGT GTG GTA ACT |
|                           |     | G L Y S L S S V V T                     |
|                           | 631 | GTG CCC TCG AGC AAT TTT GGT ACC CAG ACC |
|                           |     | V P S S N F G T Q T                     |
|                           | 661 | TAT ACA TGC AAT GTC GAT CAT AAA CCC AGT |

10

20

30

40

[表3-5]

|      |                                         |
|------|-----------------------------------------|
|      | Y T C N V D H K P S                     |
| 691  | AAC ACA AAG GTA GAC AAG ACA GTC GAA AGA |
|      | N T K V D K T V E R                     |
| 721  | AAA TGC TGT GTG GAG TGC CCT CCT TGC CCC |
|      | K C C V E C P P C P                     |
| 751  | GCC CCC CCA GTG GCC GGG CCT TCG GTT TTT |
|      | A P P V A G P S V F                     |
| 781  | CTT TTT CCA CCT AAA CCG AAA GAC ACC CTG |
|      | L F P P K P K D T L                     |
| 811  | ATG ATC AGC AGG ACA CCA GAA GTG ACA TGT |
|      | M I S R T P E V T C                     |
| 841  | GTC GTC GTG GAC GTA TCC CAT GAA GAC CCG |
|      | V V V D V S H E D P                     |
| 871  | GAG GTG CAA TTC AAC TGG TAT GTT GAT GGT |
|      | E V Q F N W Y V D G                     |
| 901  | GTG GAA GTG CAT AAT GCA AAA ACT AAG CCA |
|      | V E V H N A K T K P                     |
| 931  | CGG GAG GAA CAG TTC AAT AGC ACA TTC AGA |
|      | R E E Q F N S T F R                     |
| 961  | GTA GTT AGC GTT CTG ACT GTC GTG CAC CAA |
|      | V V S V L T V V H Q                     |
| 991  | GAT TGG CTG AAC GGG AAG GAA TAC AAG TGT |
|      | D W L N G K E Y K C                     |
| 1021 | AAG GTG AGC AAC AAA GGT CTG CCC GCT CCA |
|      | K V S N K G L P A P                     |
| 1051 | ATT GAG AAA ACA ATT TCT AAG ACC AAA GGA |
|      | I E K T I S K T K G                     |
| 1081 | CAG CCC CGG GAG CCA CAG GTG TAT ACT CTG |
|      | Q P R E P Q V Y T L                     |
| 1111 | CCG CCT AGC AGG GAG GAA ATG ACC AAG AAC |
|      | P P S R E E M T K N                     |
| 1141 | CAG GTG AGC CTG ACC TGT CTG GTG AAA GGC |
|      | Q V S L T C L V K G                     |
| 1171 | TTC TAC CCC AGC GAT ATC GCA GTT GAG TGG |
|      | F Y P S D I A V E W                     |
| 1201 | GAG AGC AAT GGC CAA CCC GAG AAC AAC TAC |
|      | E S N G Q P E N N Y                     |
| 1231 | AAG ACT ACG CCC CCC ATG CTT GAT AGC GAC |
|      | K T T P P M L D S D                     |
| 1261 | GGA TCA TTT TTC CTG TAC TCA AAA CTG ACC |
|      | G S F F L Y S K L T                     |
| 1291 | GTG GAC AAA AGC AGA TGG CAG CAG GGA AAC |
|      | V D K S R W Q Q G N                     |
| 1321 | GTT TTC AGT TGC TCA GTG ATG CAC GAA GCg |
|      | V F S C S V M H E A                     |
| 1351 | CTG CAC AAT CAT TAT ACT CAG AAA AGC CTG |

10

20

30

40

[表3-6]

|      |                                        |
|------|----------------------------------------|
|      | L H N H Y T Q K S L                    |
| 1381 | AGC TTG AGC TTA GGA AAA TGA (配列番号 2 3) |
|      | S L S L G K * (配列番号 2 4)               |

〔表3-7〕

|                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>IgG2-FEGG-SELFバリエーションとしてフォーマットされた抗IgE</p> <p>太字及び下線のアミノ酸配列は、表1に開示されるように、WT配列からのバリエーション、例えば、下部ヒンジ配列の一部(aa残基232~237)、並びに変異S267E及びL328Fに対応する。</p> | <p>1 ATG GGC TGG TCC TGC ATC ATC CTG TTT CTG</p> <p>M G W S C I I L F L</p> <p>31 GTG GCC ACA GCC ACC GGC GTG CAC TCT GAA</p> <p>V A T A T G V H S E</p> <p>61 GTG CAG CTG GTG GAA TCT GGC GGC GGA CTG</p> <p>V Q L V E S G G G L</p> <p>91 GTG CAG CCT GGC GGA TCT CTG AGA CTG AGC</p> <p>V Q P G G S L R L S</p> <p>121 TGT GCC GTG TCC GGC TAC AGC ATC ACC AGC</p> <p>C A V S G Y S I T S</p> <p>151 GGC TAC TCT TGG AAC TGG ATC CGG CAG GCC</p> <p>G Y S W N W I R Q A</p> <p>181 CCT GGC AAG GGA CTG GAA TGG GTG GCC TCC</p> <p>P G K G L E W V A S</p> <p>211 ATC ACC TAC GAC GGC AGC ACC AAC TAC AAC</p> <p>I T Y D G S T N Y N</p> <p>241 CCC AGC GTG AAG GGC CGG ATC ACC ATC AGC</p> <p>P S V K G R I T I S</p> <p>271 AGG GAC GAC AGC AAG AAC ACA TTC TAC CTG</p> <p>R D D S K N T F Y L</p> <p>301 CAA ATG AAC AGC CTG CGG GCC GAG GAC ACC</p> <p>Q M N S L R A E D T</p> <p>331 GCC GTG TAC TAT TGT GCC AGA GGC AGC CAC</p> <p>A V Y Y C A R G S H</p> <p>361 TAC TTC GGC CAC TGG CAC TTT GCC GTG TGG</p> <p>Y F G H W H F A V W</p> <p>391 GGC CAG GGA ACA ACG GTC ACC GTG TCT GCA</p> <p>G Q G T T V T V S A</p> <p>421 GCG TCG ACA AAA GGC CCT AGC GTC TTT CCA</p> <p>A S T K G P S V F P</p> <p>451 CTC GCC CCA TGT TCA AGA AGC ACC AGC GAG</p> <p>L A P C S R S T S E</p> <p>481 TCA ACT GCG GCT TTG GGC TGC TTG GTG AAG</p> <p>S T A A L G C L V K</p> <p>511 GAT TAC TTC CCA GAG CCT GTC ACT GTC AGC</p> <p>D Y F P E P V T V S</p> <p>541 TGG AAT AGC GGG GCT CTG ACC AGT GGA GTG</p> <p>W N S G A L T S G V</p> <p>571 CAC ACC TTT CCC GCC GTG TTA CAG AGC AGC</p> <p>H T F P A V L Q S S</p> <p>601 GGC CTC TAT AGC CTG AGC AGT GTG GTA ACT</p> <p>G L Y S L S S V V T</p> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

10

20

30

40

50

[表3-8]

|  |                                                                            |
|--|----------------------------------------------------------------------------|
|  | 631 GTG CCC TCG AGC AAT TTT GGT ACC CAG ACC<br>V P S S N F G T Q T         |
|  | 661 TAT ACA TGC AAT GTC GAT CAT AAA CCC AGT<br>Y T C N V D H K P S         |
|  | 691 AAC ACA AAG GTA GAC AAG ACA GTC GAA AGA<br>N T K V D K T V E R         |
|  | 721 AAA TGC TGT GTG GAG TGC CCT CCT TGC CCC<br>K C C V E C P P C P         |
|  | 751 GCC CCC GAG TTT GAG GGG GGG CCT TCG GTT<br>A <u>P E F E G G</u> P S V  |
|  | 781 TTT CTT TTT CCA CCT AAA CCG AAA GAC ACC<br>F L F P P K P K D T         |
|  | 811 CTG ATG ATC AGC AGG ACA CCA GAA GTG ACA<br>L M I S R T P E V T         |
|  | 841 TGT GTC GTC GTG GAC GTA GAG CAT GAA GAC<br>C V V V D V <u>E</u> H E D  |
|  | 871 CCG GAG GTG CAA TTC AAC TGG TAT GTT GAT<br>P E V Q F N W Y V D         |
|  | 901 GGT GTG GAA GTG CAT AAT GCA AAA ACT AAG<br>G V E V H N A K T K         |
|  | 931 CCA CGG GAG GAA CAG TTC AAT AGC ACA TTC<br>P R E E Q F N S T F         |
|  | 961 AGA GTA GTT AGC GTT CTG ACT GTC GTG CAC<br>R V V S V L T V V H         |
|  | 991 CAA GAT TGG CTG AAC GGG AAG GAA TAC AAG<br>Q D W L N G K E Y K         |
|  | 1021 TGT AAG GTG AGC AAC AAA GGT TTT CCC GCT<br>C K V S N K G <u>F</u> P A |
|  | 1051 CCA ATT GAG AAA ACA ATT TCT AAG ACC AAA<br>P I E K T I S K T K        |
|  | 1081 GGA CAG CCC CGG GAG CCA CAG GTG TAT ACT<br>G Q P R E P Q V Y T        |
|  | 1111 CTG CCG CCT AGC AGG GAG GAA ATG ACC AAG<br>L P P S R E E M T K        |
|  | 1141 AAC CAG GTG AGC CTG ACC TGT CTG GTG AAA<br>N Q V S L T C L V K        |
|  | 1171 GGC TTC TAC CCC AGC GAT ATC GCA GTT GAG<br>G F Y P S D I A V E        |
|  | 1201 TGG GAG AGC AAT GGC CAA CCC GAG AAC AAC<br>W E S N G Q P E N N        |
|  | 1231 TAC AAG ACT ACG CCC CCC ATG CTT GAT AGC<br>Y K T T P P M L D S        |
|  | 1261 GAC GGA TCA TTT TTC CTG TAC TCA AAA CTG<br>D G S F F L Y S K L        |
|  | 1291 ACC GTG GAC AAA AGC AGA TGG CAG CAG GGA<br>T V D K S R W Q Q G        |

10

20

30

40

[表3－9]

|  |                                                                           |
|--|---------------------------------------------------------------------------|
|  | 1321 AAC GTT TTC AGT TGC TCA GTG ATG CAC GAA<br>N V F S C S V M H E       |
|  | 1351 GCG CTG CAC AAT CAT TAT ACT CAG AAA AGC<br>A L H N H Y T Q K S       |
|  | 1381 CTG AGC TTG AGC TTA GGA AAA TGA (配列番号25)<br>L S L S L G K * (配列番号26) |

[表3－10]

|                                                                                                                                        |                                                                    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| IgG2-FLGG-SELFバリエーションとしてフォーマットされた抗IgE<br>太字及び下線のアミノ酸配列は、表1に開示されるように、WT配列からのバリエーション、例えば、下部ヒンジ配列の一部(aa残基232~237)、並びに変異S267E及びL328Fに対応する。 | 1 ATG GGC TGG TCC TGC ATC ATC CTG TTT CTG<br>M G W S C I I L F L   |
|                                                                                                                                        | 31 GTG GCC ACA GCC ACC GGC GTG CAC TCT GAA<br>V A T A T G V H S E  |
|                                                                                                                                        | 61 GTG CAG CTG GTG GAA TCT GGC GGC GGA CTG<br>V Q L V E S G G G L  |
|                                                                                                                                        | 91 GTG CAG CCT GGC GGA TCT CTG AGA CTG AGC<br>V Q P G G S L R L S  |
|                                                                                                                                        | 121 TGT GCC GTG TCC GGC TAC AGC ATC ACC AGC<br>C A V S G Y S I T S |
|                                                                                                                                        | 151 GGC TAC TCT TGG AAC TGG ATC CGG CAG GCC<br>G Y S W N W I R Q A |
|                                                                                                                                        | 181 CCT GGC AAG GGA CTG GAA TGG GTG GCC TCC<br>P G K G L E W V A S |
|                                                                                                                                        | 211 ATC ACC TAC GAC GGC AGC ACC AAC TAC AAC<br>I T Y D G S T N Y N |
|                                                                                                                                        | 241 CCC AGC GTG AAG GGC CGG ATC ACC ATC AGC<br>P S V K G R I T I S |
|                                                                                                                                        | 271 AGG GAC GAC AGC AAG AAC ACA TTC TAC CTG<br>R D D S K N T F Y L |
|                                                                                                                                        | 301 CAA ATG AAC AGC CTG CGG GCC GAG GAC ACC<br>Q M N S L R A E D T |
|                                                                                                                                        | 331 GCC GTG TAC TAT TGT GCC AGA GGC AGC CAC<br>A V Y Y C A R G S H |
|                                                                                                                                        | 361 TAC TTC GGC CAC TGG CAC TTT GCC GTG TGG<br>Y F G H W H F A V W |
|                                                                                                                                        | 391 GGC CAG GGA ACA ACG GTC ACC GTG TCT GCA<br>G Q G T T V T V S A |
|                                                                                                                                        | 421 GCG TCG ACA AAA GGC CCT AGC GTC TTT CCA<br>A S T K G P S V F P |
|                                                                                                                                        | 451 CTC GCC CCA TGT TCA AGA AGC ACC AGC GAG<br>L A P C S R S T S E |
|                                                                                                                                        | 481 TCA ACT GCG GCT TTG GGC TGC TTG GTG AAG<br>S T A A L G C L V K |
|                                                                                                                                        | 511 GAT TAC TTC CCA GAG CCT GTC ACT GTC AGC<br>D Y F P E P V T V S |
|                                                                                                                                        | 541 TGG AAT AGC GGG GCT CTG ACC AGT GGA GTG<br>W N S G A L T S G V |
|                                                                                                                                        | 571 CAC ACC TTT CCC GCC GTG TTA CAG AGC AGC                        |

10

20

30

40

[表3-11]

|      |                                         |
|------|-----------------------------------------|
|      | H T F P A V L Q S S                     |
| 601  | GGC CTC TAT AGC CTG AGC AGT GTG GTA ACT |
|      | G L Y S L S S V V T                     |
| 631  | GTG CCC TCG AGC AAT TTT GGT ACC CAG ACC |
|      | V P S S N F G T Q T                     |
| 661  | TAT ACA TGC AAT GTC GAT CAT AAA CCC AGT |
|      | Y T C N V D H K P S                     |
| 691  | AAC ACA AAG GTA GAC AAG ACA GTC GAA AGA |
|      | N T K V D K T V E R                     |
| 721  | AAA TGC TGT GTG GAG TGC CCT CCT TGC CCC |
|      | K C C V E C P P C P                     |
| 751  | GCC CCC GAG TTT CTG GGG GGG CCT TCG GTT |
|      | A <u>P E F L G G</u> P S V              |
| 781  | TTT CTT TTT CCA CCT AAA CCG AAA GAC ACC |
|      | F L F P P K P K D T                     |
| 811  | CTG ATG ATC AGC AGG ACA CCA GAA GTG ACA |
|      | L M I S R T P E V T                     |
| 841  | TGT GTC GTC GTG GAC GTA GAG CAT GAA GAC |
|      | C V V V D V <u>E</u> H E D              |
| 871  | CCG GAG GTG CAA TTC AAC TGG TAT GTT GAT |
|      | P E V Q F N W Y V D                     |
| 901  | GGT GTG GAA GTG CAT AAT GCA AAA ACT AAG |
|      | G V E V H N A K T K                     |
| 931  | CCA CGG GAG GAA CAG TTC AAT AGC ACA TTC |
|      | P R E E Q F N S T F                     |
| 961  | AGA GTA GTT AGC GTT CTG ACT GTC GTG CAC |
|      | R V V S V L T V V H                     |
| 991  | CAA GAT TGG CTG AAC GGG AAG GAA TAC AAG |
|      | Q D W L N G K E Y K                     |
| 1021 | TGT AAG GTG AGC AAC AAA GGT TTT CCC GCT |
|      | C K V S N K G <u>E</u> P A              |
| 1051 | CCA ATT GAG AAA ACA ATT TCT AAG ACC AAA |
|      | P I E K T I S K T K                     |
| 1081 | GGA CAG CCC CGG GAG CCA CAG GTG TAT ACT |
|      | G <u>Q</u> P R E P <u>Q</u> V Y T       |
| 1111 | CTG CCG CCT AGC AGG GAG GAA ATG ACC AAG |
|      | L P P S R E E M T K                     |
| 1141 | AAC CAG GTG AGC CTG ACC TGT CTG GTG AAA |
|      | N Q V S L T C L V K                     |
| 1171 | GGC TTC TAC CCC AGC GAT ATC GCA GTT GAG |
|      | G F Y P S D I A V E                     |
| 1201 | TGG GAG AGC AAT GGC CAA CCC GAG AAC AAC |
|      | W E S N G Q P E N N                     |
| 1231 | TAC AAG ACT ACG CCC CCC ATG CTT GAT AGC |
|      | Y K T T P P M L D S                     |
| 1261 | GAC GGA TCA TTT TTC CTG TAC TCA AAA CTG |

10

20

30

40

[表3-12]

|      |                                          |
|------|------------------------------------------|
|      | D G S F F L Y S K L                      |
| 1291 | ACC GTG GAC AAA AGC AGA TGG CAG CAG GGA  |
|      | T V D K S R W Q Q G                      |
| 1321 | AAC GTT TTC AGT TGC TCA GTG ATG CAC GAA  |
|      | N V F S C S V M H E                      |
| 1351 | GCg CTG CAC AAT CAT TAT ACT CAG AAA AGC  |
|      | A L H N H Y T Q K S                      |
| 1381 | CTG AGC TTG AGC TTA GGA AAA TGA (配列番号27) |
|      | L S L S L G K * (配列番号28)                 |

10

[表3-13]

|        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 抗IgE軽鎖 | 1 ATG GGC TGG TCC TGC ATC ATC CTG TTT CTG<br>M G W S C I I L F L<br>31 GTG GCC ACA GCC ACC GGC GTG CAC AGC GAT<br>V A T A T G V H S D<br>61 ATC CAG CTG ACA CAG AGA CCC AGC AGC CTG<br>I Q L T Q R P S S L<br>91 TCT GCC AGC GTG GGC GAC AGA GTG ACC ATC<br>S A S V G D R V T I<br>121 ACC TGT AGA GCC AGC CAG AGC GTG GAC TAC<br>T C R A S Q S V D Y<br>151 GAC GGC GAC AGC TAC ATG AAC TGG TAT CAG<br>D G D S Y M N W Y Q<br>181 CAG AAG CCC GGC AAG GCC CCC AAG CTG CTG<br>Q K P G K A P K L L<br>211 ATC TAC GCC GCC AGC TAC CTG GAA AGC GGC<br>I Y A A S Y L E S G<br>241 GTG CCC AGC AGA TTT TCC GGC AGC GGC TCT<br>V P S R F S G S G S<br>271 GGC ACC GAC TTC ACC CTG ACC ATC AGC TCC<br>G T D F T L T I S S<br>301 CTG CAG CCC GAG GAC TTC GCC ACC TAC TAC<br>L Q P E D F A T Y Y<br>331 TGC CAG CAG AGC CAC GAG GAC CCC TAC ACC<br>C Q Q S H E D P Y T<br>361 TTT GGC CAG GGC ACC AAG GTG GAA ATC AAG<br>F G Q G T K V E I K<br>391 CGG ACA GTG GCC GCT CCC AGC GTG TTC ATC<br>R T V A A P S V F I<br>421 TTC CCA CCT AGC GAC GAG CAG CTG AAG TCC<br>F P P S D E Q L K S<br>451 GGC ACA GCC TCT GTC GTG TGC CTG CTG AAC<br>G T A S V V C L L N<br>481 AAC TTC TAC CCC CGC GAG GCC AAG GTG CAG<br>N F Y P R E A K V Q<br>511 TGG AAG GTG GAC AAT GCC CTG CAG AGC GGC<br>W K V D N A L Q S G |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

20

30

40

[表3-14]

|  |                                              |
|--|----------------------------------------------|
|  | 541 AAC AGC CAG GAA AGC GTG ACC GAG CAG GAC  |
|  | N S Q E S V T E Q D                          |
|  | 571 AGC AAG GAC TCC ACC TAC AGC CTG AGC AGC  |
|  | S K D S T Y S L S S                          |
|  | 601 ACC CTG ACA CTG AGC AAG GCC GAC TAC GAG  |
|  | T L T L S K A D Y E                          |
|  | 631 AAG CAC AAG GTG TAC GCC TGC GAA GTG ACC  |
|  | K H K V Y A C E V T                          |
|  | 661 CAC CAG GGC CTG TCT AGC CCC GTG ACC AAG  |
|  | H Q G L S S P V T K                          |
|  | 691 AGC TTC AAC CGG GGC GAG TGC TAA (配列番号29) |
|  | S F N R G E C * (配列番号30)                     |

10

【0069】

Expi293細胞によるヒトIgG及び変異型IgGタンパク質の発現及び産生  
ヒトIgG及び変異型ヒトIgGを、前述のように、Expi293ヒト胚性腎細胞において産生した(Wines et al., 2016 (前掲))。簡潔に述べると、Expi293細胞を、細胞成長及びタンパク質産生の両方のためにExpi293発現培地(Gibco、Waltham, MA, United States of America)中に維持した。細胞を、Expifectamineトランスフェクションキット(Life Technologies Corporation、Carlsbad, CA, United States of America)を使用して、Opti-MEM I還元血清培地(Gibco)中で希釈したIgG重鎖プラスミド(15ug)及び軽鎖プラスミド(15ug)と同時にトランスフェクションし、次いで4日間培養した。培養上清を遠心分離によって清澄化し、0.2μmフィルターを通して濾過し、その後、IgGをHi-Trap HPタンパク質Aカラム(GE Healthcare Life Sciences、Marlborough, MA, United States of America)を使用してアフィニティークロマトグラフィーによって精製し、0.1Mのクエン酸(pH3.5)で溶出し、続いて1MのTris-HCl(pH9.0)で中和し、PBS(pH7.5)に対する透析を行った。任意の凝集体を、Superose 6 10/300GLカラム(GE Healthcare Biosciences)上で後続のゲル濾過によって除去し、単量体IgGピーク画分を収集した。記載されるように、全ての抗体調製物の抗原結合活性を、ELISAによってBSA-TNP上で試験した(Wines et al., 2016 (前掲))。

20

30

【0070】

細胞表面FcγRへのIgG結合のフローサイトメトリー測定  
抗体FcγR結合を、免疫複合体又は単量体IgGのいずれかを使用して測定した。免疫複合体は、抗TNP抗体(親又は変異型抗TNP IgG)をTNP-BSAと2:1の比(40μg/ml:20μg/ml)で37℃で30分間、次いで4℃で10分間インキュベートすることによって生成した。フローサイトメトリー結合分析において、複合体又は単量体IgGを、示された濃度で、PBS/BSA緩衝液中の25μlのFcγR発現細胞(5×10<sup>6</sup>/ml)に添加し、氷上で1時間インキュベートし、2回洗浄し、氷上で1時間、ヤギ抗ヒトIgG F(ab')<sub>2</sub>特異的ヤギ抗血清のAlexa 647コンジュゲートF(ab')<sub>2</sub>断片50ul(Jackson ImmunoResearch Laboratories、West Grove, PA, United States of America)(緩衝液で1/400希釈)に再懸濁した。細胞を2回洗浄し、200μlのPBS/0.5%のBSA及び10,000個の生細胞に再懸濁し、少なくとも3つの実験で分析した。単量体IgG結合(MFI)を単一結合部位モデル

40

50

に適合させて、結合親和性 ( $K_A$ ) を測定した。同様に、免疫複合体結合は、みかけの親和性 ( $K_A^{app}$ ) として報告される。

【0071】

Bio-Layer Interferometry (OCTET) を使用した IgG : FcR 相互作用の親和性測定  
TNP-BSA を、製造業者の指示に従って EZ-link (商標) ビオチン化試薬 (ThermoFisher Scientific) と反応させた。得られた TNP-BSA-ビオチン ( $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、30 秒) を、Octet Red 96 (ForteBio ; Molecular Devices LLC, San Jose, CA, United States of America) を使用してストレプトアビジン BLI プローブ上で約 0.8 nm まで捕捉し、次いで、抗 TNP IgG ( $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、75 秒) を充填した。ベースラインを確立し (60 秒)、続いて、rsFcγRIIa-R<sup>131</sup> 又は rsFcγRIIb の濃度系列 ( $15 \text{ nM} \sim 20 \mu\text{M}$ ) の会合及び解離を行った (90 秒)。各初期反応 TNP-BSA-ビオチン捕捉後の再生及びその後の結合サイクルには、10 mM の HCl を使用した。センソグラム (Sensogram) を 1 : 1 のラングミュア結合モデルに充填するか、又は会合サイクルの終了時の結合応答を定常状態親和性に適合させた。

10

【0072】

蜜蜂毒アレルゲンの製造及び精製 : Api m 1  
蜜蜂 (Apis mellifera) 毒からの主要なアレルゲン : ホスホリパーゼ A 2 (Api m 1) (GenBank X16709、アレルゲン名 : Api m 1) を製造業者の指示 (Gibco) に従って、懸濁液適合昆虫細胞株 Spodoptera frugiperda Sf21 で製造した。簡潔に述べると、Sf21 細胞を、成長、ウイルス産生及びタンパク質産生のために、Sf-900 II SFM 培地中で  $27^\circ\text{C}$  で維持した。3'ヘキサ-His タグを有する完全長 Api m 1 をコードする cDNA をドナープラスミド pFastBac にクローニングし、次いで DH10Bac E. coli にトランスフェクトした。得られたバクミド DNA を DH10Bac E. coli 細胞から精製し、Sf21 細胞にトランスフェクトした。次いで、組換えバキュロウイルスを使用して Sf21 細胞に感染させ、分泌した Api m 1 を、Talon Superflow Metal Affinity クロマトグラフィー (Clontech, Mountain View, CA, United States of America) によって細胞培養上清から精製した。

20

30

【0073】

好塩基球活性化試験 (BAT)  
BAT アッセイを、2つの細胞源のいずれか、すなわち、全 (未加工) 血又は DMEM / 0.1% BSA で 2 回洗浄した血液を使用して、前述のように (Drew AC et al., J Immunol 173 (9) : 5872-5879, 2004) 実行した。好塩基球を、IgG mAb の存在下又は非存在下で、ハプテン化 (TNP) ウサギ F (ab')<sub>2</sub> 抗ヒト IgE (抗 IgE-TNP) 又はハプテン化蜂毒アレルゲン (Api m 1-TNP) を使用して刺激した。簡潔に述べると、健康なドナー又はアレルギー患者のいずれかからの  $100 \mu\text{l}$  のヘパリン化ヒト全血を、 $20 \mu\text{l}$  の刺激緩衝液 ( $133 \text{ mM}$  の NaCl、 $20 \text{ mM}$  の HEPES、 $7 \text{ mM}$  の  $\text{CaCl}_2$ 、 $5 \text{ mM}$  の KCl、 $3.5 \text{ mM}$  の  $\text{MgCl}_2$ 、 $1 \text{ mg}/\text{ml}$  の BSA、 $20 \mu\text{l}/\text{ml}$  のヘパリン、 $2 \text{ ng}/\text{ml}$  の IL3、pH 7.4) とともに  $37^\circ\text{C}$  で 10 分間インキュベートした。次いで、試料を、抗 TNP hIgG と予め複合化されていた ( $37^\circ\text{C}$  で 30 分間)  $100 \mu\text{l}$  の抗 hIgE-TNP ( $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) 又は Api m 1-TNP ( $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) のいずれかを添加することによって、 $37^\circ\text{C}$  で 20 分間刺激した。バックグラウンド刺激を、 $100 \mu\text{l}$  の刺激緩衝液単独を添加することによって判定した。刺激のための陽性対照としては、N-ホルミル-Met-Leu-Phe (fMLP、 $9 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) (Sigma-Aldrich) 又は無傷のウサギ抗ヒト IgE ( $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) (Dako Agil

40

50

ent, Santa Clara, CA, United States of America) のいずれかを利用した。アッセイを氷上で5分間インキュベーションすることによって終了させ、次いで正常なヤギ血清を添加した(10  $\mu$ l) (Sigma-Aldrich)。刺激応答をフローサイトメトリーによって定量した。したがって、刺激後、細胞を、マウス抗ヒトCD63-PE (2  $\mu$ l/試験) (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, United States of America)、マウス抗ヒトIgE-FITC (3  $\mu$ l/試験) (eBioscience, San Diego, CA, United States of America) 及びマウス抗ヒトCD203c-APC (5  $\mu$ l/試験) (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, United States of America) を添加することによって、氷上で40分間染色した。染色後、2mlの溶解溶液(154mMのNH<sub>4</sub>Cl、10mMのKHCO<sub>2</sub>、0.8mMのEDTA)とともに室温で10分間2回インキュベートし、遠心分離(250  $\times$  g、5分)を行うことによって、赤血球(RBC)を溶解した。細胞ペレットを3mlの洗浄緩衝液(133mMのNaCl、20mMのHepes、5mMのKCl、0.27mMのEDTA、pH7.3)で洗浄し、7-アミノアクチノマイシンD (2  $\mu$ l/試験) (BD Biosciences) を含有する200  $\mu$ lの洗浄緩衝液中にフローサイトメトリー分析のために再懸濁して、非生細胞を除外した。

10

#### 【0074】

FACS Canto IIサイトメーター上で細胞を解析し、Flowlogic解析ソフトウェアを使用して蛍光データを解析した。使用されたゲーティング戦略は以下の通りである。洗浄した血液又は全血細胞を、好塩基球集団を含むように前方散乱及び側方散乱でゲーティングし、続いて、7AAD陽性細胞の除外に基づいて生細胞ゲーティングを行った。好塩基球を、高IgE発現(FITC高)及びCD203c(APC陽性)細胞として同定し、次いで、CD63陰性ゲート(刺激緩衝液単独)及びCD63陽性ゲート(抗ヒトIgE又はfMLPで刺激)を設定するために使用した。活性化された好塩基球は、CD63陽性ゲート内の細胞として同定した。好塩基球活性化の阻害%は、Api m 1-TNP又は抗IgE-TNP刺激単独と比較した、Api m 1-TNP又は抗IgE-TNP:IgG複合体によって誘導されるCD63陽性細胞の%減少として計算した。

20

30

#### 【0075】

好塩基球活性化試験(BAT)におけるFc $\gamma$ RIIb阻害作用の遮断  
Fc $\gamma$ RIIbとBAT中の抗IgE-TNP:IgG複合体との相互作用は、上記のようにBAT中の抗IgE-TNP:IgGを添加する前に、Fc $\gamma$ RIIb特異的遮断mAbであるH2B6のF(ab')<sub>2</sub>断片との細胞のインキュベーションによって遮断された。簡潔に述べると、10  $\mu$ lの抗H2B6 F(ab')<sub>2</sub> (最終濃度7.5  $\mu$ g/ml)又は刺激緩衝液単独を90  $\mu$ lの洗浄した血液に添加し、氷上で30分間インキュベートした後、抗IgE-TNP又は抗IgE-TNP:IgG (最終濃度5  $\mu$ g/ml)を使用してBATを実行し、%好塩基球活性化を測定した。

#### 【0076】

ヒト高親和性Fc $\epsilon$ RI複合体と阻害性hFc $\gamma$ RIIbとの細胞表面共発現 阻害性Fc $\gamma$ RIIbとともにFc $\epsilon$ RI複合体(Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ )を発現する細胞を、介在するピコルナウイルスリボソームスキッピング2Aペプチドによって中断された各FcR又はサブユニットをコードするコドン最適化cDNAによるIIA1.6細胞の形質導入によって生成した(Szymczak AL et al., Nat Biotechnol 22(5):589-594, 2004)。配列は、Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ -P2A-Fc $\epsilon$ RI $\beta$ -T2A-Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ -F2A-Fc $\gamma$ RIIb-翻訳停止の順序であった。これを、配列検証済みの2863bp合成DNA(ThermoFisher, GeneArt, Waltham, MA, United States of America)として、隣接するゲートウェイattB1及びattB2部位を用いて合成した。合

40

50

成DNAをゲートウェイ適合マウス白血病ウイルス発現ベクターpMXI-neoにサブクローニングした。Phoenixパッケージング株の一過性トランスフェクション及びFcR欠損マウスIIA1.6細胞株の感染を、前述のように実行した(Powell et al., 2006 (前掲))。

【0077】

IgE誘導性カルシウム動員

阻害性hFcγRIIbとhFcεRI(α、β、γ)複合体とを共発現するIIA1.6細胞を、0.5μg/mlのIgE(JW8/5/13マウス/ヒトキメラ抗NP IgE)(Bruggemann Met al., J Exp Med 166:1351-1361, 1987)とともに一晚インキュベーションすることによってIgEで感作した。翌日、細胞を20μg/mlの抗IgE-T単独で刺激したか、又は抗TNPIgG mAb(最終濃度、35μg/ml)と複合化し、カルシウム動員を測定した(Anania JC et al., 2018 (前掲))。

10

【0078】

キメラ抗NP IgE BCRと阻害性hFcγRIIbとの細胞表面共発現

マウスVドメイン(並びに膜貫通及び細胞質ドメインを含むヒト細胞表面IgE重鎖)と、軽鎖と、を含むJW8/5/13マウス/ヒトキメラ抗NP(4-ヒドロキシ-3-ニトロフェニルアセチル)IgE BCRを発現し、かつ阻害性FcγRIIbを共発現するレポーター細胞を、ピコルナウイルスリボソームスキッピングP2A及びF2Aペプチドによって分離された軽鎖、IgE重鎖及びFcγRIIb1を含む単一のポリタンパク質をコードするコドン最適化cDNAによるIIA1.6細胞の形質導入によって生成した(Szymczak AL et al., Nat Biotechnol 22(5):589-594, 2004)。したがって、ポリタンパク質をコードするDNA配列を、抗NP IgE軽鎖cDNA、次いでP2Aペプチド、次いでIgE重鎖、次いでF2Aペプチド、次いでFcγRIIb1、及び次いで翻訳停止で構成した。マウス/ヒトキメラ抗NP重鎖配列は、適切に接合されたJW8/5/13抗NP IgE DNA配列(Bruggemann Met al., J Exp Med 166:1351-1361, 1987)と、配列受託番号X63693.1(H.sapiens生殖細胞系選択的スプライシングIgE重鎖DNA)と、を含んでいた。これを、配列検証済みの合成DNA(ThermoFisher、GeneArt)として、隣接するゲートウェイattB1及びattB2部位を用いて合成した。合成DNAをGateway適合マウス白血病ウイルス発現ベクターpMXI-neoにサブクローニングした。Phoenixパッケージング株の一過性トランスフェクション及びFcR欠損マウスIIA1.6 B細胞株の感染を、前述のように実行した(Powell et al., 2006 (前掲))。

20

30

【0079】

IgE B細胞受容体(BCR)誘導性カルシウム動員

抗NP表面IgE及び阻害性hFcγRIIbを共発現するIIA1.6細胞にカルシウムインジケータFura-2を充填し、IgE特異的療法用mAbであるオマリズマブ又は変異体、すなわち、IgG4として、IgG2、IgG2-FEGG、IgG2-FLGG、IgG2-FEGG-S267E-L328F、IgG2-FLGG-S267E-L328F-としてフォーマットされたオマリズマブ(1μg/ml)、続いてNP関連抗原であるNIP(22)BSA(BSA分子1個当たり平均22個の4-ヒドロキシ-3-ヨード-5-ニトロフェニルアセチル基で誘導体化されたウシ血清アルブミン)とともにインキュベートした。カルシウム動員を測定した(Anania JC et al., 2018 (前掲))。

40

【0080】

結果

修飾Fcを有する変異型IgG2抗体は、強力な特異的好塩基球阻害剤を生成する。IgG4及びIgG1(表1)からの配列エレメント用の足場としてIgG2を使用して

50

、IgGサブクラス間で異なり、FcγRとの重要な接触部である下部ヒンジ領域に焦点を当てて、一連の阻害性mAbを開発した。特に、IgG2下部ヒンジのVAGを、IgG4からのFLGG (IgG2-FLGG) 又はIgG1からのLLGG (IgG2-LLGG) のいずれかで置き換えた。変異型IgG2 mAbを、細胞表面上で発現される異なるヒトFcγRに対するそれらのFcγR結合特異性について評価した。結果を図1に示す。

#### 【0081】

細胞表面上のヒトFcγRと変異型IgGの相互作用をフローサイトメトリーによって評価し、親IgG2又はIgG4の結合、並びに全てのヒトFcγRの「普遍的な」リガンドであるIgG1と比較した。低親和性ヒトFcγR (FcγRIIb、FcγRIIa、及びFcγRIII) への結合を、免疫複合体を使用して実行した (図1A~E)。高親和性FcγRIへの結合を、単量体IgGを使用して測定した (図1F)。親IgG分子の各々は、期待される特異性を示した (すなわち、全ての受容体に結合した複合化IgG1、IgG2は、阻害性FcγRIIbのみに結合したFcγRIIa-H<sup>131</sup>及びIgG4複合体を除いて、任意のFcγRに結合することができなかった)。IgG2ではなく、複合化されていない単量体IgG1及びIgG4が、高親和性FcγRIに結合した。

#### 【0082】

IgG2-LLGG又はIgG2-FLGG mAb FcγR結合プロファイルは、IgG2とはかなり異なり、IgG2-FLGGの場合にはIgG4とも異なることが見出された (図1A~E)。IgG2-LLGG mAbは、親IgG1と同等の特異性プロファイルを示した (図1A~E)。

したがって、IgG2中の下部ヒンジのみの置き換えは、阻害性FcγRIIbへの結合を含むIgG1様結合を付与するのに十分であった。更に、IgG2-FLGGの受容体結合プロファイルは、両方の親IgGとは異なっている (図1)。特に、この変異型mAbは、阻害性FcγRIIbへの有意に増強された結合、並びにIgG4と比較してより広い特異性を示し、IgG2にもIgG4にも結合しないFcγRIIIa対立遺伝子形態の両方、並びに通常、IgG2及びIgG4の貧弱な結合剤でもあるFcγRIIa-R<sup>131</sup>にも貪欲に結合した。FcγRIIa-H<sup>131</sup>への結合は、おそらくIgG2骨格からの寄与である。しかしながら、単量体IgG4と同様に、単量体IgG2-FLGGは、IgG2に結合しない高親和性FcγRIに結合した (図1F)。

#### 【0083】

変異型IgG2抗体は、Api m 1アレルギー誘導性好塩基球活性化を阻害する。また、変異型IgG2 mAbを、IgEによるアレルギー性好塩基球活性化のFcγRIIb依存性阻害を媒介する能力について評価した。特に、IgG2-FLGG、IgG4-LLGG及びIgG2-LLGG抗体を、IgE+アトピー性個体 (蜜蜂毒アレルギー患者) からの好塩基球のFcεRI活性化を調節するそれらの能力について、親IgG2、IgG4、及びIgG1と比較した。洗浄した血液中の好塩基球を、抗TNF IgG2又はIgG4 mAbの存在下で、主要な蜜蜂毒アレルギーであるホスホリパーゼA2 (Api m 1-TNP) で刺激した。結果を図2に示す。

#### 【0084】

最も驚くべきことに、Api m 1誘導性好塩基球活性化のほぼ完全な阻害は、IgG2-LLGG及びIgG2-FLGGによって媒介された (それぞれ81%及び85%阻害) が、予想通り、FcγRIIbに結合しない親IgG2は、Api m 1応答を阻害しなかった。驚くべきことに、いずれもFcγRIIbに貪欲に結合する親IgG4及びIgG1は、使用される最高濃度 (2 µg/ml) でそれぞれ42%及び45%の阻害しか達成しない比較的弱い阻害を示した。

#### 【0085】

下部ヒンジの変異は、FcγRIIbに対するmAb特異性を改善する。FcγRIIb相互作用に対する特異性は、下部ヒンジの更なる変異によって更に改良さ

10

20

30

40

50

れ（図1）、洗浄した血液（すなわち、血漿を含まない）又は全血（すなわち、生理学的レベルのIgGを含有する）を使用して、BATアッセイにおける効力について評価した。その結果を図2、3、及び7に示す。

【0086】

まず、L<sup>235</sup>Eの点変異を親IgG4-WTとIgG2-FLGG mAbの下部ヒンジ配列のFLGGに導入し、それぞれIgG4-FEGGとIgG2-FEGGを作製した。この変異は、一般にFcγR結合を除去すると記載されており（Alegre ML et al., J Immunol 148 (11): 3461-3468, 1992）、いくつかの抗体におけるFcγR結合の不活性化のために使用されている（Reddy MP et al., J Immunol 164 (4): 1925-1933, 2000）。しかしながら、ここでは、FcγRIIbへの結合が保持されることが見出された。

【0087】

IgG2-FEGG及びIgG4-FEGGにおけるL<sup>235</sup>E変異は、元の修飾されていないIgG2-FLGG及びIgG4-WTのFcγRIへの結合を、親IgG2-WTのほぼベースラインレベルまで除去した（図1F）。他の骨格依存性の違いも明らかであった。IgG2骨格上で、IgG2-FEGG及びIgG2-FLGG変異体は、FcγRIIbだけでなく、FcγRIIa-H<sup>131</sup>及びR<sup>131</sup>対立遺伝子にも容易に結合する能力を含む類似の低親和性FcγR結合プロファイルを示し（図1A～E）、FcγRIIaの両方の対立遺伝子へのIgG2-FEGGの結合は、比較的わずかしき低下しなかった（図1D、E）。しかしながら、このことは、IgG4-FEGG mAbにおけるIgG4骨格に対する同じ変異の影響とは著しく対照的であり（図1）、SELF変異との関連では結合が大幅に減少した（図5F）。

【0088】

次に、変異体を洗浄した血液BAT（図2）で評価した。ここで、FcγRIIbへの明らかな優先的かつ改善された結合にもかかわらず（図1Aを参照）、IgG4-FEGGは、好塩基球活性化の抑制レベルが驚くほど弱い（42%）ことを示し、これはIgG4-WT（45%）と実質的に同等であった。対照的に、IgG2骨格上の同等の配列であるIgG2-FEGG抗体は、元のIgG2-FLGG変異体及びIgG2-LLGGでも見られるより強力な阻害を保持した（図2）。

【0089】

改善されたmAb親和性及び阻害効力のためのCH2の修飾

FcγRIIb特異性を更に改善するために、FcドメインのCH2中の2つの残基を追加的に修飾した（表1を参照）。特に、IgG1骨格で使用されている2つの変異S<sup>267</sup>E及びL<sup>328</sup>F（SELF）（Chu SY et al., Mol Immunol 45 (15): 3926-3933, 2008）を、IgG2及びIgG4ベースのmAb、IgG2-FLGG、IgG2-FEGG及びIgG4-FEGG、並びに親IgG4抗体に導入した。次いで、抗体を、アレルゲン特異的（図3）及び抗IgE BAT（図7）において特異性（図4～6を参照されたい）及び阻害効力について試験した。いくつかの効果が明らかになった。すなわち、SELF変異の導入により、単量体IgG（図6）及び複合化IgG（図5）の両方の結合の親和性が有意な増加（70倍超の増加）し、特異性が変化した。単量体IgG2-FLGG-SELF及びIgG2-FEGG-SELFは、それぞれ、細胞表面（K<sub>A</sub>89及び3.2×10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>）上で発現されるFcγRIIbへの高い親和性結合を示し（図6A）、BLI分析（K<sub>A</sub>103及び2.9×10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>）（図4及び表4）により、これらは、SELF変異を伴わない同等のmAbと比較して70～120倍増加した親和性である（図4及び表4）。IgG1-SELF変異体は、以前に報告されたように高い親和性結合を示した（Chu SY et al., Mol Immunol 45: 3926-3933, 2008）。特に、SELF変異を有するこれらの抗体は、細胞上の阻害性FcγRIIbに対するよりも、FcγRIIa-R<sup>131</sup>に対してより高い結合親和性（4～6倍）を示した（図6A、B、

並びに図4及び表4に示されるように、BLI分析によって確認される)。

#### 【0090】

この新たに獲得した高い親和性結合は、免疫複合体の結合力の大幅な増加にも反映された(図5)。加えて、元のIgG2-FLGG及びIgG2-FEGG mAbのFcγRIII形態への予期せぬ免疫複合体結合(図1D、E)を、SELF変異によって除去した(図5)。IgG2骨格上にSELF変異を含めることの影響は、同等のIgG4 mAbでも明らかであり(図5)、FcγRIIIb及びFcγRIIIa-R<sup>131</sup>に対する結合の増加は同様に示されたが、FcγRIIIa-H<sup>131</sup>に対する結合の増加は示されなかった。

#### 【0091】

SELF変異によって誘導される低親和性FcγRとの相互作用の親和性及び特異性に対する大きな変化にもかかわらず、FcγRIとの相互作用は影響を受けず、IgG2-FLGG、IgG2-FLGG-SELFは、IgG1-SELF変異型抗体と同一の結合を示した(図6F及び7D)。更に、重要なことに、IgG2-FEGG-SELF及びIgG4-FEGG-SELFにおけるSELF変異によって、元のIgG2-FEGG又はIgG4-FEGGにおいて観察されたL235E変異によるFcγRI結合の除去が無効にならなかったことが見出された(図1F)。したがって、この抗体変異の組み合わせは、より限定された特異性だけでなく、阻害性FcγRIIIbへの強固な結合ももたらした。

#### 【表4】

表4 変異型IgG mAbへの組換え可溶性FcγRIIIb及び組換え可溶性FcγRIIIa-Arg131の結合親和性( $K_A$  ( $10^6$  M<sup>-1</sup>))

| Fc受容体                       | IgG1    | IgG2           | IgG2-LLGG    | IgG2-FLGG    |
|-----------------------------|---------|----------------|--------------|--------------|
| rsFcγRIIIb                  | 0.16(1) | 0.059±0.017(3) | 0.80±0.18(4) | 0.83±0.13(4) |
| rsFcγRIIIa-R <sup>131</sup> | 未検出     | 未検出            | 未検出          | 未検出          |

| Fc受容体                       | IgG2-FEGG    | IgG1-SELF | IgG2-SELF | IgG2-FLGG-SELF | IgG2-FEGG-SELF |
|-----------------------------|--------------|-----------|-----------|----------------|----------------|
| rsFcγRIIIb                  | 0.40±0.06(4) | 74±4(7)   | 34±2(8)   | 103±8(8)       | 29±3(8)        |
| rsFcγRIIIa-R <sup>131</sup> | 未検出          | 349±38(3) | 91±8(3)   | 630±75(3)      | 188±12(3)      |

親和性は、ラングミュア1:1結合モデルに対するグローバルフィッティングからのものである( $K_A \pm S.E.M$ )。(n)、n=実験回数

#### 【0092】

アレルギー患者及び健康なドナーからの全血における好塩基球活性化の阻害 変異型IgG2 mAbも、全血におけるそれらの阻害効力について評価した。すなわち、2つの別個のIgE依存性刺激であるアレルゲンApi m 1-T(図3)又は抗IgE-TNP(図7)のいずれかを使用して、IgGの生理学的レベルの存在下で評価した。対応するIgG4変異体と比較して、IgG2ベースのmAb(図7A)は、IgG4-mAb(図7B)よりもアレルゲン誘導性活性化のより強力な阻害剤であった。実際、洗浄した血液における活性化を阻害したIgG4、IgG4-FEGG、及びIgG4-LLGG(図2)は、全血における非常に低い阻害を示した(それぞれ8%、8%、13%の阻害)。対照的に、生理学的IgGの存在にもかかわらず、IgG4の下部ヒンジを含有し、低親和性でFcγRIIIbに結合するIgG2-FLGGは、実質的な阻害を保持した(54%、 $IC_{50} = 1.6 \mu g/ml$ )。加えて、結果は、IgG2 mAbの効力が、CH2領域のSELF変異の包含によって大幅に増加したことを示した。例えば、IgG2-FLGG-SELF及びIgG2-FEGG-SELFの結合は、それぞれ $IC_{50} = 0.24 \mu g/ml$ 及び $0.38 \mu g/ml$ に少なくとも6倍改善された。興味深いことに、SELF変異を有する変異型IgG2 mAbは、それらのIgG4下部ヒンジ

当量よりも実質的に強力であった（例えば、 $IgG4-SELF$   $IC_{50}=1.1 \mu g/ml$ と比較して、 $IgG4$ 下部ヒンジを有する $IgG2-FLGG-SELF$  ( $IC_{50}=0.24 \mu g/ml$ )、これは、 $IgG$ 骨格の性質が、これらの操作された抗体における阻害効力を決定する重要な要因であることを示している）。

【0093】

また、効力がアレルゲン系に固有のものでないことを確認するために、変異型 $IgG2$   $mAb$ を第2の $IgE/Fc\epsilon RI$ 依存系において試験した。すなわち、抗 $IgE-TNP$ で刺激した全血中の好塩基球についてアッセイを行い、その結果、抗体によって媒介される阻害の相対的効力は、 $Api m 1-T$ アレルゲン刺激を用いて見られるもの、すなわち、

【数1】

$$IgG2-FLGG-SELF \approx IgG2-FEGG-SELF \approx IgG1-SELF > IgG2-FLGG \approx IgG2-FEGG >>> IgG2$$

、及び $IgG4$ 骨格 $mAb$ については、

【数2】

$$IgG4-SELF \approx IgG4-FEGG-SELF >>> IgG4-FEGG \approx IgG4-LLGG \approx IgG4$$

と同じであることが示された。したがって、含有する特定の変異型 $mAb$ が好塩基球の活性化を阻害する能力と、使用した他の抗体と比較したそのランキングは、好塩基球が抗 $IgE-TNP$ 断片又は $Api m 1-TNP$ のどちらを介して活性化されたとしても同等であった。

【0094】

変異型 $IgG2$ 抗体の阻害機能は、 $Fc\gamma RI Ib$ 遮断によって損なわれる。血中好塩基球に対する阻害性 $Fc\gamma RI Ib$ 受容体の予想される発現（*Kepley C L et al., J Allergy Clin Immunol 106:337-348, 2000*）をフローサイトメトリーによって確認した（図8Aを参照されたい）。 $IgG$   $mAb$ による $IgE/Fc\epsilon RI$ 好塩基球活性化の阻害の $Fc\gamma RI Ib$ 依存性を、 $Fc\gamma RI Ib$ 特異的 $mAb$ である $H2B6$ を使用して好塩基球上で発現される $Fc\gamma RI Ib$ の遮断によって評価した（図8B）。 $IgG2-FLGG$ の存在下での抗 $IgE-TNP$ による刺激前の $H2B6$   $F(ab')$ 2断片による全血の前処理により、 $IgG2-FLGG$ の効力が有意に低下した（図8B）。

【0095】

$Fc\epsilon RI$ 誘導性カルシウム動員の阻害

変異型 $IgG2$ 抗体を、 $IgE:Fc\epsilon RI$ 誘導性カルシウム動員の $Fc\gamma RI Ib$ 依存性調節についても試験した（図8C）。 $Fc\gamma RI Ib$ と $Fc\epsilon RI(\alpha\beta\gamma 2)$ 複合体とを共発現する細胞を、親抗 $TNP$   $IgG2$ 又は $IgG2$ ベースの抗 $TNP$ 変異型 $mAb$ の存在下で、 $IgE$ で感作し、抗 $IgE-TNP$ で刺激した（図8C）。 $mAb$ による $IgE/Fc\epsilon RI$ カルシウム動員の阻害は、 $Fc\gamma RI Ib$ に対するそれらの親和性と、好塩基球のアレルゲン又は抗 $IgE$ 誘導活性化の両方におけるそれらの阻害の効力と相関していた（図3及び8）。 $IgG2-FLGG-SELF$ 及び $IgG2-FEGG-SELF$ 抗体は、カルシウム動員の最大の阻害を示し、応答の大きさ及び動態の同様の低下を引き起こした。興味深いことに、 $SELF$ 変異を含有しなかった $IgG2-FLGG$ 抗体は、 $IgE/Fc\epsilon RI$   $Ca^{2+}$ 応答の実質的な低下を依然として示し（図8C）、これは全血における好塩基球活性化のその阻害とも一致する（図3）。

【0096】

表面 $IgE$ 、B細胞抗原受容体誘導性カルシウム動員の阻害

療法用 $mAb$ オマリズマブを $IgG4$ 及び $IgG2$ 抗体として再フォーマットし、これらを、抗原（ $NIP22BSA$ ）誘導性カルシウム動員の $Fc\gamma RI Ib$ 依存性調節につい

10

20

30

40

50

て試験した（図 9 及び図 10）。

【0097】

FcγRIIb と NP 特異的細胞表面 IgE BCR とを共発現する IIA1.6 B 細胞を、療法用 mAb オマリズマブ（IgG1 mAb）又はオマリズマブ変異型 mAb（IgG4 骨格を備えるか、又は本開示による変異型 IgG2 抗体として提供される）で処理し、その後、BCR を NP 関連抗原 NIP（22）BSA 抗原で刺激した。IgG1 オマリズマブ処理は、抗原（2 回目の注射、NIP（22）BSA、図 9A）による後続のカルシウム動員を強く抑制した。IgG2 変異型抗 IgE 処理は、NIP（22）BSA 抗原（2 回目の注射、図 9B）による後続のカルシウム動員を部分的にしか抑制しなかった。オマリズマブと同様であるが、IgG2 対応物とは異なり、IgG4 フォーマットされた抗 IgE は、抗原刺激カルシウム動員を強く抑制した（図 9C）。これらの抑制活性は、IgG1 及び IgG4 が阻害性 FcγRIIb1 に係合する能力と相関するが、IgG2 は、FcγRIIb1 に結合することができない。

10

【0098】

BCR を標的とする mAb の抗原刺激に対する効果を、IgG2 骨格を備えるオマリズマブの可変ドメインを含む抗 IgE mAb を使用して、FcγRIIb1 を共発現する IIA1.6 B 細胞について評価した（図 10）。IgE BCR 及びヒト FcγRIIb1 を IgG2 形態のオマリズマブと共発現する B 細胞の処理は、緩衝液対照（2 回目の注射、NIP（22）BSA、図 10A）と比較して、抗原（NIP）特異的 h u-IgE BCR 誘発カルシウムフラックスの部分的な抑制をもたらした。この部分的な抑制は、IgG2 が FcγRIIb1 に結合しないため、FcγRIIb1 とは無関係である。しかしながら、IgG2-FLGG 抗体として提供されるオマリズマブによる処理は、抗原特異的 h u-IgE BCR 誘発カルシウムフラックス（2 回目の注射、図 10B）を大幅に抑制した。また、IgG2-FEGG mAb として提供されるオマリズマブは、抗原誘発カルシウムフラックス（2 回目の注射、図 10C）も抑制したが、IgG2-FLGG フォーマットされた mAb よりも強力ではなかった。IgG2-FLGG-SELF mAb として提供されるオマリズマブの形態は、抗原刺激応答（2 回目の注射、図 10D）も抑制したが、IgG2-FEGG-SELF 形態による抑制（図 10E）は、IgG-FLGG mAb のものと同等であった。全体として、IgE BCR の調節は、FLGG-SELF > FLGG~FEGG-SELF > FEGG > IgG2 の階層を有し、これは、この IgG2 フォーマットにおけるこれらの変異の FcγRIIb 結合活性のランク順序と広く相関していた。

20

30

【0099】

考察

免疫チェックポイントの標的化は、疾患における白血球応答を調節するための重要な戦略として浮上している。FcγRIIb は、記載された最も初期の免疫チェックポイントのうちの 1 つである（Hibbs ML et al., Proc Natl Acad Sci U S A 83:6980-6984, 1986）。FcεRI、他の活性化型 FcR、及び B 細胞抗原受容体によって利用される ITAM 依存性シグナル伝達経路のその調節は、自然免疫及び適応免疫における抗体依存性白血球機能を調節する。これには、IgE 依存性好塩基球活性化の阻害（Cady CT et al., Immunol Lett 130(1-2):57-65, 2010）及び B 細胞抗原受容体（Amigorena S et al., Science 256:1808-1812, 1992）が含まれる。本実施例で説明される研究では、下部ヒンジ配列を変異させることによって FcγRIIb の阻害効力を利用するように修飾された FcγR 特異性／親和性を有する mAb を開発するための足場として「機能的に不活性な」ヒト IgG2 を使用できることが見出された。実際、このようにして、活性化型受容体 FcεRI を調節し、それによってヒト好塩基球の IgE / FcεRI アレルゲン又は抗 IgE 活性化を阻害するように、FcγRIIb の阻害効力を利用することが可能であることが見出された。更に、そのような変異型 IgG2 抗体としての抗 IgE mAb を提供することは、表面 IgE

40

50

B細胞受容体の抗原刺激の阻害に有効であった。

したがって、そのような変異型IgG2抗体は、アレルギー反応を治療又は予防するための新規のmAb治療薬の基礎としてかなりの期待を提供する。

【0100】

本明細書及び以下の特許請求の範囲全体を通して、文脈が別段の定めがない限り、「含む (comprise)」及び「含む (include)」、並びに「含む (comprising)」及び「含む (including)」などの変化形は、記載された整数又は整数群の包含を意味するが、任意の他の整数又は整数群の除外を意味するものではないことが理解されるであろう。

【0101】

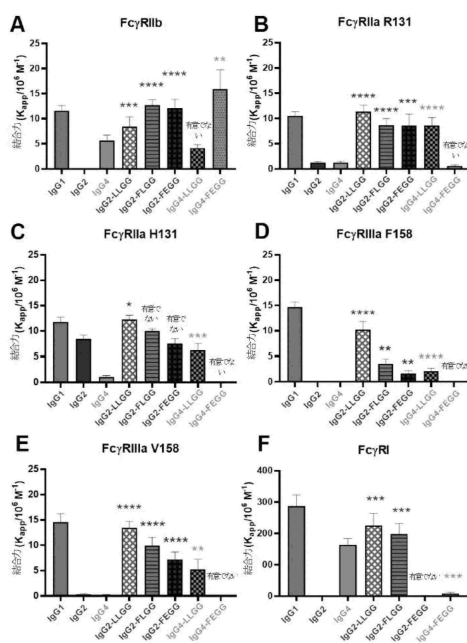
本明細書における任意の先行技術への言及は、そのような先行技術が共通の一般知識の一部を形成するという何らかの形の示唆を承認するものではなく、また承認するものとして解釈されるべきではない。

【0102】

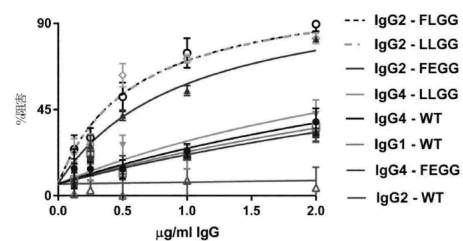
本明細書に開示される免疫療法用タンパク質（例えば、変異型IgG2抗体）及び組成物の方法及び使用は、記載される特定の出願によって制限されないことが、当業者には理解されるであろう。方法、使用、及び組成物は、本明細書に記載又は描写される特定の要素及び／又は特徴に関して、それらの好ましい実施形態においては制限されない。また、本明細書に開示される免疫療法用タンパク質及び組成物の方法及び使用は、開示される1つ以上の実施形態に限定されず、以下の特許請求の範囲によって記載及び定義される本開示の範囲から逸脱することなく、多数の再構成、変形及び置換が可能であることも理解されるであろう。

【図面】

【図1】



【図2】



10

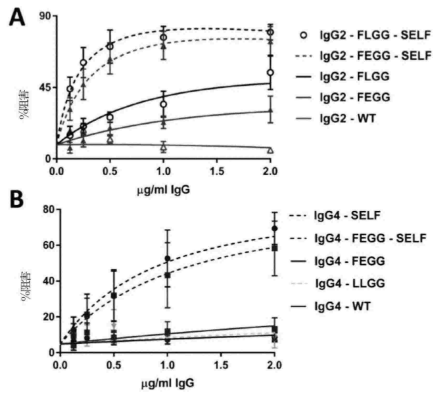
20

30

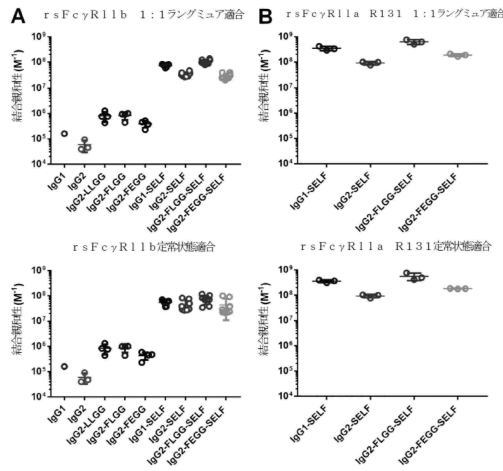
40

50

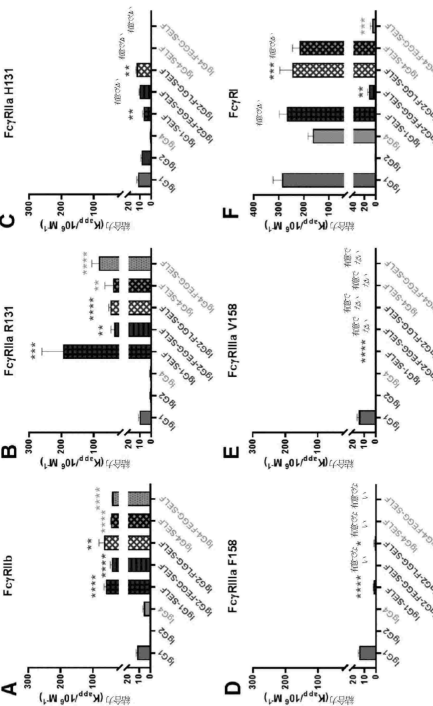
【図 3】



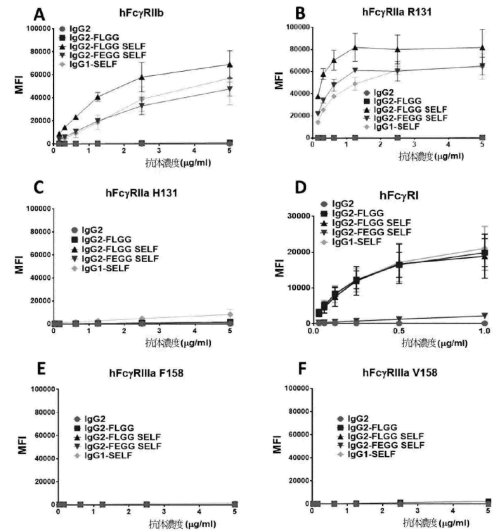
【図 4】



【図 5】



【図 6】



10

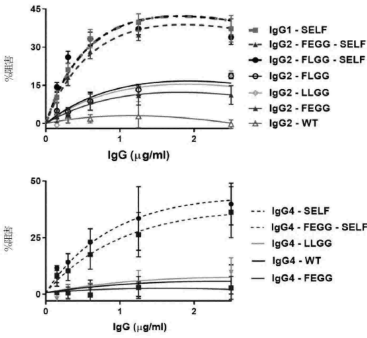
20

30

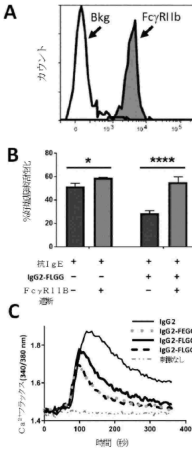
40

50

【図 7】

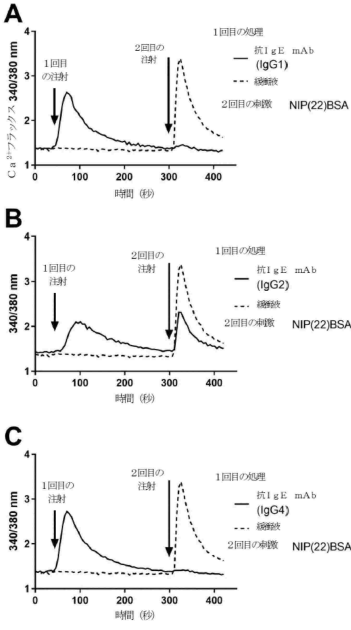


【図 8】

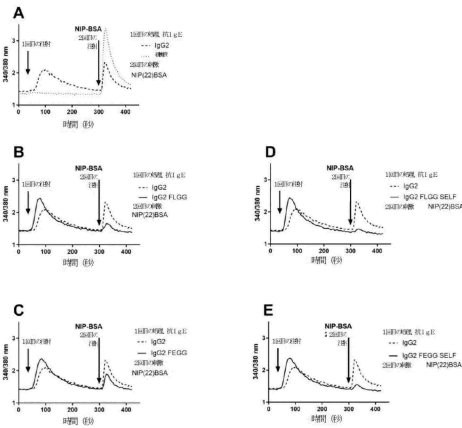


10

【図 9】



【図 10】



20

30

【配列表】

2024500945000001.app

40

50

## 【国際調査報告】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                    | International application No.<br><b>PCT/AU2021/051548</b>                                                                                    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br><b>C07K 16/42 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01) A61P 37/00 (2006.01) C07K 16/44 (2006.01) C12N 15/85 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                    |                                                                                                                                              |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                    |                                                                                                                                              |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                    |                                                                                                                                              |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                    |                                                                                                                                              |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                    |                                                                                                                                              |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)<br>DATABASES: PATENW (EPODOC, WPIAP and English language full text databases), REGISTRY, MEDLINE, CAPLUS, BIOSIS, EMBASE, Applicant and/or Inventor searches of the patent and non-patent literature was performed using PubMed, Espacenet, and in internal databases provided by IP Australia.<br>Keywords: FCγRIIB terms, hinge terms, IgG2 terms, ELLGG, EFLGG, EFLGP, EFEGG in proximity to mutation, substitution etc. terms, 233-236 residuc mutations.<br>CPC/IPC mark search: combination of C07K16/283, C07K2317/53, C07K2317/72 and keywords.<br>Genomequest: CPPCPAPEFLGG, CPPCPAPEFLGP, CPPCPAPEFEGG, CPPCPAPELLGG in combination with keyword search (please see SIS for more information).                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                    |                                                                                                                                              |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                    |                                                                                                                                              |
| Category*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No.                                                                                                                        |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Documents are listed in the continuation of Box C                                  |                                                                                                                                              |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                    |                                                                                                                                              |
| * Special categories of cited documents:<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"D" document cited by the applicant in the international application earlier application or patent but published on or after the international filing date<br>"E" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention<br>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone<br>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art<br>"&" document member of the same patent family |                                                                                    |                                                                                                                                              |
| Date of the actual completion of the international search<br>7 March 2022                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                    | Date of mailing of the international search report<br>07 March 2022                                                                          |
| Name and mailing address of the ISA/AU<br>AUSTRALIAN PATENT OFFICE<br>PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA<br>Email address: pct@ipaaustralia.gov.au                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                    | Authorised officer<br>Srgjan Chivchiristov<br>AUSTRALIAN PATENT OFFICE<br>(ISO 9001 Quality Certified Service)<br>Telephone No. +61262833104 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |  |                                                    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|----------------------------------------------------|
| INTERNATIONAL SEARCH REPORT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |  | International application No.<br>PCT/AU2021/051548 |
| Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |  |                                                    |
| <div>1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:</div> <div><div>a. <input checked="" type="checkbox"/> forming part of the international application as filed:</div><div><div><input checked="" type="checkbox"/> in the form of an Annex C/ST.25 text file.</div><div><input type="checkbox"/> on paper or in the form of an image file.</div></div><div>b. <input type="checkbox"/> furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.</div><div>c. <input type="checkbox"/> furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:</div><div><div><input type="checkbox"/> in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).</div><div><input type="checkbox"/> on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).</div></div></div> <div>2. <input type="checkbox"/> In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.</div> <div>3. Additional comments:</div> <div>A sequence search combined with a keyword search was performed in GenomeQuest for sequences CPPCPAPEFLGG, CPPCPAPEFEGG, CPPCPAPELLGG, and CPPCPAPEFLGP (please see SIS for more information).</div> |  |                                                    |

10

20

30

40

50

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | International application No. |
|-------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | PCT/AU2021/051548             |
| Category*                                             | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Relevant to claim No.         |
| X                                                     | WO 2020/065409 A3 (LYVGEN BIOPHARMA CO., LTD. ET AL.) 02 April 2020<br>Title, Abstract; Summary of the Invention; claims 1, 6, 21-26, 29; page 2, para 3; page 3, last para; page 4, para 1; Figures; pages 25-26 sequence alignment of human IgG2 variants; page 21 last para to page 22 para 3; page 25, last para; Example 2; page 71, para 1; page 72, para 3-4; Table 3; claims 52-57; Example 6; page 5, second last para | 1-25                          |
| X                                                     | WO 2018/183520 A1 (LYVGEN BIOPHARMA HOLDINGS LIMITED ET AL.) 04 October 2018<br>Title; Abstract; pages 3, 13; Tables 3, 5, 8, 11; Examples; Figures; claims 1-9, 16-21; 35-48; G2m2 with SEQ ID NO: 25                                                                                                                                                                                                                          | 1-25                          |
| X                                                     | WO 2020/069382 A1 (LYVGEN BIOPHARMA CO., LTD. ET AL.) 02 April 2020<br>Title; Abstract; page 3, last para to page 4 first para; pages 21, 23, 25, 51; Figures 1-4; Table 3, 5, 9, 11; Examples; claims 1-6, 21-29, 52-57; page 5, last two paras; page 51, para 2                                                                                                                                                               | 1-25                          |
| X                                                     | US 2018/0360981 A1 (XENCOR, INC.) 20 December 2018<br>Abstract; para 12, 337, 344, 499-500, 604, 607; Figures 14, 15a, 17, 23, 42-46; Table B; Examples 24-25; claims                                                                                                                                                                                                                                                           | 1-25                          |
| X                                                     | EP 3392273 A1 (XENCOR, INC.) 24 October 2018<br>Abstract; claims; Example 8; Figures 14, 28; para 238;                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 1-25                          |
| X                                                     | US 2017/0355766 A1 (XENCOR, INC.) 14 December 2017<br>Abstract; claims; Example 5; Figures 7, 11; para 310                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 1-25                          |
| Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2019)            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                               |

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT                                                                                                                                                                                                                                           |                  | International application No. |                  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|-------------------------------|------------------|
| Information on patent family members                                                                                                                                                                                                                                  |                  | PCT/AU2021/051548             |                  |
| This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. |                  |                               |                  |
| Patent Document/s Cited in Search Report                                                                                                                                                                                                                              |                  | Patent Family Member/s        |                  |
| Publication Number                                                                                                                                                                                                                                                    | Publication Date | Publication Number            | Publication Date |
| WO 2020/065409 A3                                                                                                                                                                                                                                                     | 02 April 2020    | WO 2020065409 A2              | 02 Apr 2020      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2019349874 A1              | 29 Apr 2021      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CA 3114567 A1                 | 02 Apr 2020      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CN 112996818 A                | 18 Jun 2021      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 3856790 A2                 | 04 Aug 2021      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 2022503961 A               | 12 Jan 2022      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | KR 20210070317 A              | 14 Jun 2021      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2021301029 A1              | 30 Sep 2021      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 11186648 B2                | 30 Nov 2021      |
| WO 2018/183520 A1                                                                                                                                                                                                                                                     | 04 October 2018  | WO 2018183520 A1              | 04 Oct 2018      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2018244574 A1              | 31 Oct 2019      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CA 3058185 A1                 | 04 Oct 2018      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CN 110546162 A                | 06 Dec 2019      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CN 110546162 B                | 07 Sep 2021      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CN 113201071 A                | 03 Aug 2021      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CN 113336849 A                | 03 Sep 2021      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CN 113480654 A                | 08 Oct 2021      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CN 113480655 A                | 08 Oct 2021      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CN 113603780 A                | 05 Nov 2021      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CN 113603781 A                | 05 Nov 2021      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 3601333 A1                 | 05 Feb 2020      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 2020527581 A               | 10 Sep 2020      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | KR 20200006526 A              | 20 Jan 2020      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2020392227 A1              | 17 Dec 2020      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | WO 2020/069382 A1             | 02 April 2020    |
| CN 113039201 A                                                                                                                                                                                                                                                        | 25 Jun 2021      |                               |                  |
| US 2018/0360981 A1                                                                                                                                                                                                                                                    | 20 December 2018 | US 2018360981 A1              | 20 Dec 2018      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2003217912 A1              | 16 Sep 2003      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2003279719 A1              | 19 Apr 2004      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2003279719 B2              | 11 Dec 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2004236160 A1              | 18 Nov 2004      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2004236160 B2              | 23 Oct 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2004297616 A1              | 23 Jun 2005      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2004297616 B2              | 18 Dec 2008      |
| AU 2005211602 A1                                                                                                                                                                                                                                                      | 13 Apr 2006      |                               |                  |
| Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.                                                                                                                                             |                  |                               |                  |
| Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2019)                                                                                                                                                                                                                            |                  |                               |                  |

10

20

30

40

50

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT                                                                                                                                                                                                                                           |                  | International application No. |                  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|-------------------------------|------------------|
| Information on patent family members                                                                                                                                                                                                                                  |                  | PCT/AU2021/051548             |                  |
| This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. |                  |                               |                  |
| Patent Document/s Cited in Search Report                                                                                                                                                                                                                              |                  | Patent Family Member/s        |                  |
| Publication Number                                                                                                                                                                                                                                                    | Publication Date | Publication Number            | Publication Date |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2005227326 A1              | 06 Oct 2005      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2005227326 B2              | 03 Dec 2009      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2005272993 A1              | 23 Feb 2006      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2005272993 B2              | 11 Feb 2010      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2006230413 A1              | 05 Oct 2006      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2006230413 B2              | 23 Sep 2010      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2006268227 A1              | 18 Jan 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2006299429 A1              | 12 Apr 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2006299429 B2              | 23 Feb 2012      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2006302254 A1              | 19 Apr 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2006302254 B2              | 26 May 2011      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2007285976 A1              | 21 Feb 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2007285976 B2              | 18 Aug 2011      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2007299843 A1              | 27 Mar 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2007299843 B2              | 08 Mar 2012      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2008207898 A1              | 31 Jul 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2008207898 B2              | 03 May 2012      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2008229860 A1              | 30 Oct 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2008229860 B2              | 12 Jan 2012      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2008260498 A1              | 11 Dec 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2008260498 B2              | 29 Nov 2012      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2008261120 A1              | 15 Jan 2009      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2008261120 B2              | 15 Mar 2012      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2009200518 A1              | 05 Mar 2009      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2009293143 A1              | 25 Mar 2010      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2009293143 B2              | 09 Apr 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2011202115 A1              | 26 May 2011      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2014207549 A1              | 30 Jul 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2014207549 B2              | 06 Dec 2018      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | BR 0314814 A                  | 09 Aug 2005      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | BR PI0314814 B1               | 05 Feb 2019      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | BR PI0410031 A                | 25 Apr 2006      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | BR PI0503905 A                | 09 May 2006      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | BR PI0510674 A                | 26 Dec 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | BR PI0918670 A2               | 01 Dec 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | BR PI0918670 B1               | 24 Sep 2020      |
| Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.                                                                                                                                             |                  |                               |                  |
| Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2019)                                                                                                                                                                                                                            |                  |                               |                  |

10

20

30

40

50

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT                                                                                                                                                                                                                                           |                  | International application No. |                  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|-------------------------------|------------------|
| Information on patent family members                                                                                                                                                                                                                                  |                  | PCT/AU2021/051548             |                  |
| This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. |                  |                               |                  |
| Patent Document/s Cited in Search Report                                                                                                                                                                                                                              |                  | Patent Family Member/s        |                  |
| Publication Number                                                                                                                                                                                                                                                    | Publication Date | Publication Number            | Publication Date |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | BR 122018016045 B1            | 13 Oct 2020      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CA 2499816 A1                 | 08 Apr 2004      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CA 2520457 A1                 | 27 Mar 2006      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CA 2524399 A1                 | 18 Nov 2004      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CA 2548817 A1                 | 23 Jun 2005      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CA 2561264 A1                 | 06 Oct 2005      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CA 2565961 A1                 | 23 Feb 2006      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CA 2602663 A1                 | 05 Oct 2006      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CA 2624189 A1                 | 12 Apr 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CA 2625998 A1                 | 19 Apr 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CA 2652434 A1                 | 18 Jan 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CA 2658557 A1                 | 21 Feb 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CA 2660795 A1                 | 27 Mar 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CA 2669412 A1                 | 31 Jul 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CA 2693053 A1                 | 11 Dec 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CA 2736511 A1                 | 25 Mar 2010      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CA 2766627 A1                 | 18 Nov 2004      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CA 2816149 A1                 | 08 Apr 2004      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CA 2832136 A1                 | 08 Apr 2004      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CA 2897987 A1                 | 24 Jul 2014      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CA 2916863 A1                 | 18 Nov 2004      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CN 1705491 A                  | 07 Dec 2005      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CN 1705491 B                  | 29 May 2013      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CN 1755850 A                  | 05 Apr 2006      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CN 1867583 A                  | 22 Nov 2006      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CN 1867583 B                  | 23 May 2012      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CN 101014619 A                | 08 Aug 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CN 101014619 B                | 03 Nov 2010      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CN 101987870 A                | 23 Mar 2011      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CN 101987870 B                | 03 Jul 2013      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CN 101987871 A                | 23 Mar 2011      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CN 102292353 A                | 21 Dec 2011      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CN 102292353 B                | 29 Apr 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CN 102633880 A                | 15 Aug 2012      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CN 102633880 B                | 25 Feb 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CN 103172731 A                | 26 Jun 2013      |
| Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.                                                                                                                                             |                  |                               |                  |
| Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2019)                                                                                                                                                                                                                            |                  |                               |                  |

10

20

30

40

50

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT                                                                                                                                                                                                                                           |                  | International application No. |                  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|-------------------------------|------------------|
| Information on patent family members                                                                                                                                                                                                                                  |                  | PCT/AU2021/051548             |                  |
| This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. |                  |                               |                  |
| Patent Document/s Cited in Search Report                                                                                                                                                                                                                              |                  | Patent Family Member/s        |                  |
| Publication Number                                                                                                                                                                                                                                                    | Publication Date | Publication Number            | Publication Date |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CN 103351434 A                | 16 Oct 2013      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CN 103351434 B                | 30 Sep 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CN 104788565 A                | 22 Jul 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CN 104961830 A                | 07 Oct 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CN 104961830 B                | 07 Sep 2018      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 1553975 A2                 | 20 Jul 2005      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 1553975 B1                 | 18 Jan 2012      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 1620467 A2                 | 01 Feb 2006      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 1645902 A2                 | 12 Apr 2006      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 1697520 A2                 | 06 Sep 2006      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 1697741 A2                 | 06 Sep 2006      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 1737890 A2                 | 03 Jan 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 1871808 A2                 | 02 Jan 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 1919950 A1                 | 14 May 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 1931709 A2                 | 18 Jun 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 1931709 B1                 | 07 Dec 2016      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 1951757 A2                 | 06 Aug 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 1951757 B1                 | 14 May 2014      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 2004695 A2                 | 24 Dec 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 2042517 A1                 | 01 Apr 2009      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 2042517 B1                 | 14 Nov 2012      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 2053062 A1                 | 29 Apr 2009      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 2059536 A2                 | 20 May 2009      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 2059536 B1                 | 08 Jan 2014      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 2064240 A2                 | 03 Jun 2009      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 2125893 A2                 | 02 Dec 2009      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 2176298 A1                 | 21 Apr 2010      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 2176298 B1                 | 15 Nov 2017      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 2221315 A1                 | 25 Aug 2010      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 2298805 A2                 | 23 Mar 2011      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 2331578 A1                 | 15 Jun 2011      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 2331578 B1                 | 04 Jun 2014      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 2345671 A1                 | 20 Jul 2011      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 2345671 B1                 | 11 Nov 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 2364996 A1                 | 14 Sep 2011      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 2364996 B1                 | 09 Nov 2016      |
| Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.                                                                                                                                             |                  |                               |                  |
| Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2019)                                                                                                                                                                                                                            |                  |                               |                  |

10

20

30

40

50

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT                                                                                                                                                                                                                                           |                  | International application No. |                  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|-------------------------------|------------------|
| Information on patent family members                                                                                                                                                                                                                                  |                  | PCT/AU2021/051548             |                  |
| This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. |                  |                               |                  |
| Patent Document/s Cited in Search Report                                                                                                                                                                                                                              |                  | Patent Family Member/s        |                  |
| Publication Number                                                                                                                                                                                                                                                    | Publication Date | Publication Number            | Publication Date |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 2368911 A1                 | 28 Sep 2011      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 2368911 B1                 | 10 May 2017      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 2383297 A1                 | 02 Nov 2011      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 2383297 B1                 | 16 Jan 2013      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 2471813 A1                 | 04 Jul 2012      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 2471813 B1                 | 31 Dec 2014      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 2703415 A1                 | 05 Mar 2014      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 2703415 B1                 | 06 Mar 2019      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 2708557 A1                 | 19 Mar 2014      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 2796469 A2                 | 29 Oct 2014      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 2796469 B1                 | 08 May 2019      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 2853545 A1                 | 01 Apr 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 2853545 B1                 | 25 May 2016      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 2940043 A1                 | 04 Nov 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 2945969 A1                 | 25 Nov 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 3101030 A1                 | 07 Dec 2016      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 3101030 B1                 | 23 Dec 2020      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 3150630 A1                 | 05 Apr 2017      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 3190128 A1                 | 12 Jul 2017      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 3190128 B1                 | 14 Nov 2018      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 3321282 A1                 | 16 May 2018      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 3342782 A1                 | 04 Jul 2018      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 3392273 A1                 | 24 Oct 2018      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 3502133 A1                 | 26 Jun 2019      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 3581588 A1                 | 18 Dec 2019      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 3838920 A1                 | 23 Jun 2021      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | HK 1131168 A1                 | 15 Jan 2010      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | IL 167685 A                   | 17 May 2010      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | IL 171723 A                   | 31 Mar 2014      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | IL 195338 A                   | 31 Aug 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | IL 202406 A                   | 29 Dec 2016      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | IL 213648 A                   | 31 Jan 2017      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | IL 224397 A                   | 31 May 2016      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | IL 265538 A                   | 31 May 2020      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 2007525443 A               | 06 Sep 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 4578467 B2                 | 10 Nov 2010      |
| Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.                                                                                                                                             |                  |                               |                  |
| Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2019)                                                                                                                                                                                                                            |                  |                               |                  |

10

20

30

40

50

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT                                                                                                                                                                                                                                           |                  | International application No. |                  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|-------------------------------|------------------|
| Information on patent family members                                                                                                                                                                                                                                  |                  | PCT/AU2021/051548             |                  |
| This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. |                  |                               |                  |
| Patent Document/s Cited in Search Report                                                                                                                                                                                                                              |                  | Patent Family Member/s        |                  |
| Publication Number                                                                                                                                                                                                                                                    | Publication Date | Publication Number            | Publication Date |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 2006512407 A               | 13 Apr 2006      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 4580340 B2                 | 10 Nov 2010      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 2009511495 A               | 19 Mar 2009      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 4860703 B2                 | 25 Jan 2012      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 2009209150 A               | 17 Sep 2009      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 5226613 B2                 | 03 Jul 2013      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 2009203237 A               | 10 Sep 2009      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 5242502 B2                 | 24 Jul 2013      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 2011188869 A               | 29 Sep 2011      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 5301611 B2                 | 25 Sep 2013      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 2010514460 A               | 06 May 2010      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 5357778 B2                 | 04 Dec 2013      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 2010503732 A               | 04 Feb 2010      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 5562031 B2                 | 30 Jul 2014      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 2011182798 A               | 22 Sep 2011      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 5645747 B2                 | 24 Dec 2014      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 2012503007 A               | 02 Feb 2012      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 5785493 B2                 | 30 Sep 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 2010500882 A               | 14 Jan 2010      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 5825756 B2                 | 02 Dec 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 2015187185 A               | 29 Oct 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 6178819 B2                 | 09 Aug 2017      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 2006100821 A               | 13 Apr 2006      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 2007512846 A               | 24 May 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 2008147707 A               | 26 Jun 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 2008505174 A               | 21 Feb 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 2008537941 A               | 02 Oct 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 2013177443 A               | 09 Sep 2013      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 2015221839 A               | 10 Dec 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | KR 20070029190 A              | 13 Mar 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | KR 100863776 B1               | 16 Oct 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | KR 20050116400 A              | 12 Dec 2005      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | KR 100890586 B1               | 25 Mar 2009      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | KR 20070116176 A              | 06 Dec 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | KR 100956110 B1               | 10 May 2010      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | KR 20050071523 A              | 07 Jul 2005      |
| Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.                                                                                                                                             |                  |                               |                  |
| Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2019)                                                                                                                                                                                                                            |                  |                               |                  |

10

20

30

40

50

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT                                                                                                                                                                                                                                           |                  | International application No. |                  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|-------------------------------|------------------|
| Information on patent family members                                                                                                                                                                                                                                  |                  | PCT/AU2021/051548             |                  |
| This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. |                  |                               |                  |
| Patent Document/s Cited in Search Report                                                                                                                                                                                                                              |                  | Patent Family Member/s        |                  |
| Publication Number                                                                                                                                                                                                                                                    | Publication Date | Publication Number            | Publication Date |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | KR 100960560 B1               | 03 Jun 2010      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | KR 20090059170 A              | 10 Jun 2009      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | KR 100973564 B1               | 03 Aug 2010      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | KR 20080106371 A              | 04 Dec 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | KR 100980065 B1               | 03 Sep 2010      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | KR 20060092925 A              | 23 Aug 2006      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | KR 101238242 B1               | 04 Mar 2013      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | KR 20120102554 A              | 18 Sep 2012      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | KR 101299616 B1               | 23 Aug 2013      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | KR 20110061616 A              | 09 Jun 2011      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | KR 101783272 B1               | 29 Sep 2017      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | KR 20130030278 A              | 26 Mar 2013      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | KR 20140006746 A              | 16 Jan 2014      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | ME 01786 B                    | 20 Sep 2014      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | MX PA05010307 A               | 18 Apr 2006      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | RS 52775 B                    | 31 Oct 2013      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | RS 53263 B                    | 29 Aug 2014      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | RU 2005112742 A               | 20 Jan 2006      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | RU 2005137578 A               | 10 Jun 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | RU 2008104038 A               | 10 Aug 2009      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | RU 2005129847 A               | 10 Apr 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | RU 2006142852 A               | 10 Jun 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | SG 121171 A1                  | 26 Apr 2006      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | SG 155978 A1                  | 29 Oct 2009      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | SM T201600288 B               | 10 Nov 2016      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | TW 200625356 A                | 16 Jul 2006      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2005244403 A1              | 03 Nov 2005      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 7276585 B2                 | 02 Oct 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2005054832 A1              | 10 Mar 2005      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 7317091 B2                 | 08 Jan 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2007161783 A1              | 12 Jul 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 7557190 B2                 | 07 Jul 2009      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2006077617 A1              | 13 Apr 2006      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 7653371 B2                 | 26 Jan 2010      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2006067028 A1              | 30 Mar 2006      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 7657242 B2                 | 02 Feb 2010      |
| Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.                                                                                                                                             |                  |                               |                  |
| Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2019)                                                                                                                                                                                                                            |                  |                               |                  |

10

20

30

40

50

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT                                                                                                                                                                                                                                           |                  | International application No. |                  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|-------------------------------|------------------|
| Information on patent family members                                                                                                                                                                                                                                  |                  | PCT/AU2021/051548             |                  |
| This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. |                  |                               |                  |
| Patent Document/s Cited in Search Report                                                                                                                                                                                                                              |                  | Patent Family Member/s        |                  |
| Publication Number                                                                                                                                                                                                                                                    | Publication Date | Publication Number            | Publication Date |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2006008883 A1              | 12 Jan 2006      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 7657380 B2                 | 02 Feb 2010      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2007003546 A1              | 04 Jan 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 7662925 B2                 | 16 Feb 2010      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2010149722 A1              | 17 Jun 2010      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 7881686 B2                 | 01 Feb 2011      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2008167449 A1              | 10 Jul 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 7930107 B2                 | 19 Apr 2011      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2008267976 A1              | 30 Oct 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 7973136 B2                 | 05 Jul 2011      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2009092599 A1              | 09 Apr 2009      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 8039592 B2                 | 18 Oct 2011      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2009136485 A1              | 28 May 2009      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 8063187 B2                 | 22 Nov 2011      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2011085278 A1              | 14 Apr 2011      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 8078128 B2                 | 13 Dec 2011      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2006121032 A1              | 08 Jun 2006      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 8084582 B2                 | 27 Dec 2011      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2007160597 A1              | 12 Jul 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 8093357 B2                 | 10 Jan 2012      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2009068177 A1              | 12 Mar 2009      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 8093359 B2                 | 10 Jan 2012      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2009053240 A1              | 26 Feb 2009      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 8101720 B2                 | 24 Jan 2012      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2009068175 A1              | 12 Mar 2009      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 8124731 B2                 | 28 Feb 2012      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2006024298 A1              | 02 Feb 2006      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 8188231 B2                 | 29 May 2012      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2010117761 A1              | 13 May 2010      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 8340615 B2                 | 25 Dec 2012      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2012230980 A1              | 13 Sep 2012      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 8383109 B2                 | 26 Feb 2013      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2007231329 A1              | 04 Oct 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 8388955 B2                 | 05 Mar 2013      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2010104557 A1              | 29 Apr 2010      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 8394374 B2                 | 12 Mar 2013      |
| Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.                                                                                                                                             |                  |                               |                  |
| Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2019)                                                                                                                                                                                                                            |                  |                               |                  |

10

20

30

40

50

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT                                                                                                                                                                                                                                           |                  | International application No. |                  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|-------------------------------|------------------|
| Information on patent family members                                                                                                                                                                                                                                  |                  | PCT/AU2021/051548             |                  |
| This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. |                  |                               |                  |
| Patent Document/s Cited in Search Report                                                                                                                                                                                                                              |                  | Patent Family Member/s        |                  |
| Publication Number                                                                                                                                                                                                                                                    | Publication Date | Publication Number            | Publication Date |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2012225058 A1              | 06 Sep 2012      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 8399618 B2                 | 19 Mar 2013      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2010080814 A1              | 01 Apr 2010      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 8435517 B2                 | 07 May 2013      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2010272723 A1              | 28 Oct 2010      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 8524867 B2                 | 03 Sep 2013      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2013058919 A1              | 07 Mar 2013      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 8734791 B2                 | 27 May 2014      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2007248602 A1              | 25 Oct 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 8735545 B2                 | 27 May 2014      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2013261289 A1              | 03 Oct 2013      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 8735547 B2                 | 27 May 2014      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2013273043 A1              | 17 Oct 2013      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 8753628 B2                 | 17 Jun 2014      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2013302315 A1              | 14 Nov 2013      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 8753629 B2                 | 17 Jun 2014      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2014073768 A1              | 13 Mar 2014      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 8802823 B2                 | 12 Aug 2014      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2013243762 A1              | 19 Sep 2013      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 8809503 B2                 | 19 Aug 2014      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2013156758 A1              | 20 Jun 2013      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 8858937 B2                 | 14 Oct 2014      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2013202599 A1              | 08 Aug 2013      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 8883147 B2                 | 11 Nov 2014      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2008154025 A1              | 26 Jun 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 8937158 B2                 | 20 Jan 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2010249382 A1              | 30 Sep 2010      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 9040041 B2                 | 26 May 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2014205605 A1              | 24 Jul 2014      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 9040042 B2                 | 26 May 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2013209457 A1              | 15 Aug 2013      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 9051373 B2                 | 09 Jun 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2013177553 A1              | 11 Jul 2013      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 9062117 B2                 | 23 Jun 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2012321620 A1              | 20 Dec 2012      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 9079960 B2                 | 14 Jul 2015      |
| Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.                                                                                                                                             |                  |                               |                  |
| Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2019)                                                                                                                                                                                                                            |                  |                               |                  |

10

20

30

40

50

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT                                                                                                                                                                                                                                           |                  | International application No. |                  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|-------------------------------|------------------|
| Information on patent family members                                                                                                                                                                                                                                  |                  | PCT/AU2021/051548             |                  |
| This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. |                  |                               |                  |
| Patent Document/s Cited in Search Report                                                                                                                                                                                                                              |                  | Patent Family Member/s        |                  |
| Publication Number                                                                                                                                                                                                                                                    | Publication Date | Publication Number            | Publication Date |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2015079082 A1              | 19 Mar 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 9193798 B2                 | 24 Nov 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2015139985 A1              | 21 May 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 9221916 B2                 | 29 Dec 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2012148578 A1              | 14 Jun 2012      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 9260523 B2                 | 16 Feb 2016      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2015093379 A1              | 02 Apr 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 9266966 B2                 | 23 Feb 2016      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2013156754 A1              | 20 Jun 2013      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 9353187 B2                 | 31 May 2016      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2013315910 A1              | 28 Nov 2013      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 9394366 B2                 | 19 Jul 2016      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2013203966 A1              | 08 Aug 2013      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 9540451 B2                 | 10 Jan 2017      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2012014943 A1              | 19 Jan 2012      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 9574006 B2                 | 21 Feb 2017      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2013203967 A1              | 08 Aug 2013      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 9617348 B2                 | 11 Apr 2017      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2015031862 A1              | 29 Jan 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 9657106 B2                 | 23 May 2017      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2015010543 A1              | 08 Jan 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 9663582 B2                 | 30 May 2017      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2014377256 A1              | 25 Dec 2014      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 9714282 B2                 | 25 Jul 2017      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2014212436 A1              | 31 Jul 2014      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 9738722 B2                 | 22 Aug 2017      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2014086906 A1              | 27 Mar 2014      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 9803020 B2                 | 31 Oct 2017      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2015037321 A1              | 05 Feb 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 9902773 B2                 | 27 Feb 2018      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2015037322 A1              | 05 Feb 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 9914778 B2                 | 13 Mar 2018      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2015232567 A1              | 20 Aug 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 10113001 B2                | 30 Oct 2018      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2016318993 A1              | 03 Nov 2016      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 10183999 B2                | 22 Jan 2019      |
| Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.                                                                                                                                             |                  |                               |                  |
| Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2019)                                                                                                                                                                                                                            |                  |                               |                  |

10

20

30

40

50

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT                                                                                                                                                                                                                                           |                  | International application No. |                  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|-------------------------------|------------------|
| Information on patent family members                                                                                                                                                                                                                                  |                  | PCT/AU2021/051548             |                  |
| This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. |                  |                               |                  |
| Patent Document/s Cited in Search Report                                                                                                                                                                                                                              |                  | Patent Family Member/s        |                  |
| Publication Number                                                                                                                                                                                                                                                    | Publication Date | Publication Number            | Publication Date |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2016347825 A1              | 01 Dec 2016      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 10184000 B2                | 22 Jan 2019      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2019071512 A1              | 07 Mar 2019      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 10584176 B2                | 10 Mar 2020      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2018009900 A1              | 11 Jan 2018      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 10626182 B2                | 21 Apr 2020      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2004110226 A1              | 10 Jun 2004      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2004132101 A1              | 08 Jul 2004      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2005249723 A1              | 10 Nov 2005      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2006134105 A1              | 22 Jun 2006      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2006235208 A1              | 19 Oct 2006      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2007053901 A1              | 08 Mar 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2007122406 A1              | 31 May 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2007148170 A1              | 28 Jun 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2007148171 A1              | 28 Jun 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2007166309 A1              | 19 Jul 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2007202098 A1              | 30 Aug 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2007219133 A1              | 20 Sep 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2007224189 A1              | 27 Sep 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2007224192 A1              | 27 Sep 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2007237765 A1              | 11 Oct 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2007237766 A1              | 11 Oct 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2007237767 A1              | 11 Oct 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2007238665 A1              | 11 Oct 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2007243188 A1              | 18 Oct 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2007248603 A1              | 25 Oct 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2007275460 A1              | 29 Nov 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2007286859 A1              | 13 Dec 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2008051563 A1              | 28 Feb 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2008057056 A1              | 06 Mar 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2008152649 A1              | 26 Jun 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2008161541 A1              | 03 Jul 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2008181890 A1              | 31 Jul 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2008199471 A1              | 21 Aug 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2008206242 A1              | 28 Aug 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2008206867 A1              | 28 Aug 2008      |
| Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.                                                                                                                                             |                  |                               |                  |
| Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2019)                                                                                                                                                                                                                            |                  |                               |                  |

10

20

30

40

50

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT                                                                                                                                                                                                                                           |                  | International application No. |                  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|-------------------------------|------------------|
| Information on patent family members                                                                                                                                                                                                                                  |                  | PCT/AU2021/051548             |                  |
| This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. |                  |                               |                  |
| Patent Document/s Cited in Search Report                                                                                                                                                                                                                              |                  | Patent Family Member/s        |                  |
| Publication Number                                                                                                                                                                                                                                                    | Publication Date | Publication Number            | Publication Date |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2008219974 A1              | 11 Sep 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2008242845 A1              | 02 Oct 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2008248028 A1              | 09 Oct 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2008254027 A1              | 16 Oct 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2008260731 A1              | 23 Oct 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2008292621 A1              | 27 Nov 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2009010920 A1              | 08 Jan 2009      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2009042291 A1              | 12 Feb 2009      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2009081208 A1              | 26 Mar 2009      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2009142340 A1              | 04 Jun 2009      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2009162382 A1              | 25 Jun 2009      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2009214526 A1              | 27 Aug 2009      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2009215991 A1              | 27 Aug 2009      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2010093979 A1              | 15 Apr 2010      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2010190247 A1              | 29 Jul 2010      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2010311954 A1              | 09 Dec 2010      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2010317834 A1              | 16 Dec 2010      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2011021755 A1              | 27 Jan 2011      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2011236969 A1              | 29 Sep 2011      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2011250681 A1              | 13 Oct 2011      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2012082664 A1              | 05 Apr 2012      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2012156207 A1              | 21 Jun 2012      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2012156220 A1              | 21 Jun 2012      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2012258092 A1              | 11 Oct 2012      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2013209445 A1              | 15 Aug 2013      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2014112916 A1              | 24 Apr 2014      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2014212435 A1              | 31 Jul 2014      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2015010550 A1              | 08 Jan 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2015030592 A1              | 29 Jan 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2015071948 A1              | 12 Mar 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2015315284 A1              | 05 Nov 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2016122435 A1              | 05 May 2016      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2016347837 A1              | 01 Dec 2016      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2017166655 A1              | 15 Jun 2017      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2017335013 A1              | 23 Nov 2017      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2018141997 A1              | 24 May 2018      |
| Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.                                                                                                                                             |                  |                               |                  |
| Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2019)                                                                                                                                                                                                                            |                  |                               |                  |

10

20

30

40

50

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT                                                                                                                                                                                                                                           |                  | International application No. |                  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|-------------------------------|------------------|
| Information on patent family members                                                                                                                                                                                                                                  |                  | PCT/AU2021/051548             |                  |
| This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. |                  |                               |                  |
| Patent Document/s Cited in Search Report                                                                                                                                                                                                                              |                  | Patent Family Member/s        |                  |
| Publication Number                                                                                                                                                                                                                                                    | Publication Date | Publication Number            | Publication Date |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2018201686 A1              | 19 Jul 2018      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2018208668 A1              | 26 Jul 2018      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2018215821 A1              | 02 Aug 2018      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2018215822 A1              | 02 Aug 2018      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2019315861 A1              | 17 Oct 2019      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2019330342 A1              | 31 Oct 2019      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2020071402 A1              | 05 Mar 2020      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2020317804 A1              | 08 Oct 2020      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2020332024 A1              | 22 Oct 2020      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2021009689 A1              | 14 Jan 2021      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2021009690 A1              | 14 Jan 2021      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2021139600 A1              | 13 May 2021      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2021395363 A1              | 23 Dec 2021      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | WO 03074679 A2                | 12 Sep 2003      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | WO 2004029207 A2              | 08 Apr 2004      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | WO 2004099249 A2              | 18 Nov 2004      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | WO 2005056759 A2              | 23 Jun 2005      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | WO 2005077981 A2              | 25 Aug 2005      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | WO 2005092925 A2              | 06 Oct 2005      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | WO 2006019447 A1              | 23 Feb 2006      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | WO 2006047350 A2              | 04 May 2006      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | WO 2006085967 A2              | 17 Aug 2006      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | WO 2006105338 A2              | 05 Oct 2006      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | WO 2007008943 A2              | 18 Jan 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | WO 2007041635 A2              | 12 Apr 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | WO 2007044616 A2              | 19 Apr 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | WO 2008022152 A2              | 21 Feb 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | WO 2008036688 A2              | 27 Mar 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | WO 2008091798 A2              | 31 Jul 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | WO 2008091954 A2              | 31 Jul 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | WO 2008092117 A2              | 31 Jul 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | WO 2008098115 A2              | 14 Aug 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | WO 2008121160 A2              | 09 Oct 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | WO 2008150494 A1              | 11 Dec 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | WO 2010033736 A1              | 25 Mar 2010      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | WO 2014113510 A1              | 24 Jul 2014      |
| Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.                                                                                                                                             |                  |                               |                  |
| Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2019)                                                                                                                                                                                                                            |                  |                               |                  |

10

20

30

40

50

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT                                                                                                                                                                                                                                           |                  | International application No. |                  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|-------------------------------|------------------|
| Information on patent family members                                                                                                                                                                                                                                  |                  | PCT/AU2021/051548             |                  |
| This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. |                  |                               |                  |
| Patent Document/s Cited in Search Report                                                                                                                                                                                                                              |                  | Patent Family Member/s        |                  |
| Publication Number                                                                                                                                                                                                                                                    | Publication Date | Publication Number            | Publication Date |
| EP 3392273 A1                                                                                                                                                                                                                                                         | 24 October 2018  | EP 3392273 A1                 | 24 Oct 2018      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2003217912 A1              | 16 Sep 2003      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2003279719 A1              | 19 Apr 2004      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2003279719 B2              | 11 Dec 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2004236160 A1              | 18 Nov 2004      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2004236160 B2              | 23 Oct 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2004297616 A1              | 23 Jun 2005      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2004297616 B2              | 18 Dec 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2005211602 A1              | 13 Apr 2006      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2005227326 A1              | 06 Oct 2005      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2005227326 B2              | 03 Dec 2009      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2005272993 A1              | 23 Feb 2006      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2005272993 B2              | 11 Feb 2010      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2006230413 A1              | 05 Oct 2006      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2006230413 B2              | 23 Sep 2010      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2006268227 A1              | 18 Jan 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2006299429 A1              | 12 Apr 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2006299429 B2              | 23 Feb 2012      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2006302254 A1              | 19 Apr 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2006302254 B2              | 26 May 2011      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2007285976 A1              | 21 Feb 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2007285976 B2              | 18 Aug 2011      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2007299843 A1              | 27 Mar 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2007299843 B2              | 08 Mar 2012      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2008207898 A1              | 31 Jul 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2008207898 B2              | 03 May 2012      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2008229860 A1              | 30 Oct 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2008229860 B2              | 12 Jan 2012      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2008260498 A1              | 11 Dec 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2008260498 B2              | 29 Nov 2012      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2008261120 A1              | 15 Jan 2009      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2008261120 B2              | 15 Mar 2012      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2009200518 A1              | 05 Mar 2009      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2009293143 A1              | 25 Mar 2010      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2009293143 B2              | 09 Apr 2015      |
| Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.                                                                                                                                             |                  |                               |                  |
| Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2019)                                                                                                                                                                                                                            |                  |                               |                  |

10

20

30

40

50

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT                                                                                                                                                                                                                                           |                  | International application No. |                  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|-------------------------------|------------------|
| Information on patent family members                                                                                                                                                                                                                                  |                  | PCT/AU2021/051548             |                  |
| This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. |                  |                               |                  |
| Patent Document/s Cited in Search Report                                                                                                                                                                                                                              |                  | Patent Family Member/s        |                  |
| Publication Number                                                                                                                                                                                                                                                    | Publication Date | Publication Number            | Publication Date |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2011202115 A1              | 26 May 2011      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2014207549 A1              | 30 Jul 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2014207549 B2              | 06 Dec 2018      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | BR 0314814 A                  | 09 Aug 2005      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | BR PI0314814 B1               | 05 Feb 2019      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | BR PI0410031 A                | 25 Apr 2006      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | BR PI0503905 A                | 09 May 2006      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | BR PI0510674 A                | 26 Dec 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | BR PI0918670 A2               | 01 Dec 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | BR PI0918670 B1               | 24 Sep 2020      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | BR I22018016045 B1            | 13 Oct 2020      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CA 2499816 A1                 | 08 Apr 2004      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CA 2520457 A1                 | 27 Mar 2006      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CA 2524399 A1                 | 18 Nov 2004      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CA 2548817 A1                 | 23 Jun 2005      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CA 2561264 A1                 | 06 Oct 2005      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CA 2565961 A1                 | 23 Feb 2006      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CA 2602663 A1                 | 05 Oct 2006      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CA 2624189 A1                 | 12 Apr 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CA 2625998 A1                 | 19 Apr 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CA 2652434 A1                 | 18 Jan 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CA 2658557 A1                 | 21 Feb 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CA 2660795 A1                 | 27 Mar 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CA 2669412 A1                 | 31 Jul 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CA 2693053 A1                 | 11 Dec 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CA 2736511 A1                 | 25 Mar 2010      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CA 2766627 A1                 | 18 Nov 2004      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CA 2816149 A1                 | 08 Apr 2004      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CA 2832136 A1                 | 08 Apr 2004      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CA 2897987 A1                 | 24 Jul 2014      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CA 2916863 A1                 | 18 Nov 2004      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CN 1705491 A                  | 07 Dec 2005      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CN 1705491 B                  | 29 May 2013      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CN 1755850 A                  | 05 Apr 2006      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CN 1867583 A                  | 22 Nov 2006      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CN 1867583 B                  | 23 May 2012      |
| Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.                                                                                                                                             |                  |                               |                  |
| Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2019)                                                                                                                                                                                                                            |                  |                               |                  |

10

20

30

40

50

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT                                                                                                                                                                                                                                           |                  | International application No. |                  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|-------------------------------|------------------|
| Information on patent family members                                                                                                                                                                                                                                  |                  | PCT/AU2021/051548             |                  |
| This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. |                  |                               |                  |
| Patent Document/s Cited in Search Report                                                                                                                                                                                                                              |                  | Patent Family Member/s        |                  |
| Publication Number                                                                                                                                                                                                                                                    | Publication Date | Publication Number            | Publication Date |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CN 101014619 A                | 08 Aug 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CN 101014619 B                | 03 Nov 2010      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CN 101987870 A                | 23 Mar 2011      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CN 101987870 B                | 03 Jul 2013      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CN 101987871 A                | 23 Mar 2011      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CN 102292353 A                | 21 Dec 2011      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CN 102292353 B                | 29 Apr 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CN 102633880 A                | 15 Aug 2012      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CN 102633880 B                | 25 Feb 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CN 103172731 A                | 26 Jun 2013      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CN 103351434 A                | 16 Oct 2013      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CN 103351434 B                | 30 Sep 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CN 104788565 A                | 22 Jul 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CN 104961830 A                | 07 Oct 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CN 104961830 B                | 07 Sep 2018      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 1553975 A2                 | 20 Jul 2005      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 1553975 B1                 | 18 Jan 2012      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 1620467 A2                 | 01 Feb 2006      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 1645902 A2                 | 12 Apr 2006      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 1697520 A2                 | 06 Sep 2006      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 1697741 A2                 | 06 Sep 2006      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 1737890 A2                 | 03 Jan 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 1871808 A2                 | 02 Jan 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 1919950 A1                 | 14 May 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 1931709 A2                 | 18 Jun 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 1931709 B1                 | 07 Dec 2016      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 1951757 A2                 | 06 Aug 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 1951757 B1                 | 14 May 2014      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 2004695 A2                 | 24 Dec 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 2042517 A1                 | 01 Apr 2009      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 2042517 B1                 | 14 Nov 2012      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 2053062 A1                 | 29 Apr 2009      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 2059536 A2                 | 20 May 2009      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 2059536 B1                 | 08 Jan 2014      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 2064240 A2                 | 03 Jun 2009      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 2125893 A2                 | 02 Dec 2009      |
| Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.                                                                                                                                             |                  |                               |                  |
| Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2019)                                                                                                                                                                                                                            |                  |                               |                  |

10

20

30

40

50

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT                                                                                                                                                                                                                                           |                  | International application No. |                  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|-------------------------------|------------------|
| Information on patent family members                                                                                                                                                                                                                                  |                  | PCT/AU2021/051548             |                  |
| This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. |                  |                               |                  |
| Patent Document/s Cited in Search Report                                                                                                                                                                                                                              |                  | Patent Family Member/s        |                  |
| Publication Number                                                                                                                                                                                                                                                    | Publication Date | Publication Number            | Publication Date |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 2176298 A1                 | 21 Apr 2010      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 2176298 B1                 | 15 Nov 2017      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 2221315 A1                 | 25 Aug 2010      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 2298805 A2                 | 23 Mar 2011      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 2331578 A1                 | 15 Jun 2011      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 2331578 B1                 | 04 Jun 2014      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 2345671 A1                 | 20 Jul 2011      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 2345671 B1                 | 11 Nov 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 2364996 A1                 | 14 Sep 2011      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 2364996 B1                 | 09 Nov 2016      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 2368911 A1                 | 28 Sep 2011      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 2368911 B1                 | 10 May 2017      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 2383297 A1                 | 02 Nov 2011      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 2383297 B1                 | 16 Jan 2013      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 2471813 A1                 | 04 Jul 2012      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 2471813 B1                 | 31 Dec 2014      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 2703415 A1                 | 05 Mar 2014      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 2703415 B1                 | 06 Mar 2019      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 2708557 A1                 | 19 Mar 2014      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 2796469 A2                 | 29 Oct 2014      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 2796469 B1                 | 08 May 2019      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 2853545 A1                 | 01 Apr 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 2853545 B1                 | 25 May 2016      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 2940043 A1                 | 04 Nov 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 2945969 A1                 | 25 Nov 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 3101030 A1                 | 07 Dec 2016      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 3101030 B1                 | 23 Dec 2020      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 3150630 A1                 | 05 Apr 2017      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 3190128 A1                 | 12 Jul 2017      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 3190128 B1                 | 14 Nov 2018      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 3321282 A1                 | 16 May 2018      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 3342782 A1                 | 04 Jul 2018      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 3502133 A1                 | 26 Jun 2019      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 3581588 A1                 | 18 Dec 2019      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 3838920 A1                 | 23 Jun 2021      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | HK 1131168 A1                 | 15 Jan 2010      |
| Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.                                                                                                                                             |                  |                               |                  |
| Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2019)                                                                                                                                                                                                                            |                  |                               |                  |

10

20

30

40

50

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT                                                                                                                                                                                                                                           |                  | International application No. |                  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|-------------------------------|------------------|
| Information on patent family members                                                                                                                                                                                                                                  |                  | PCT/AU2021/051548             |                  |
| This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. |                  |                               |                  |
| Patent Document/s Cited in Search Report                                                                                                                                                                                                                              |                  | Patent Family Member/s        |                  |
| Publication Number                                                                                                                                                                                                                                                    | Publication Date | Publication Number            | Publication Date |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | IL 167685 A                   | 17 May 2010      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | IL 171723 A                   | 31 Mar 2014      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | IL 195338 A                   | 31 Aug 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | IL 202406 A                   | 29 Dec 2016      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | IL 213648 A                   | 31 Jan 2017      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | IL 224397 A                   | 31 May 2016      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | IL 265538 A                   | 31 May 2020      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 2007525443 A               | 06 Sep 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 4578467 B2                 | 10 Nov 2010      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 2006512407 A               | 13 Apr 2006      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 4580340 B2                 | 10 Nov 2010      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 2009511495 A               | 19 Mar 2009      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 4860703 B2                 | 25 Jan 2012      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 2009209150 A               | 17 Sep 2009      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 5226613 B2                 | 03 Jul 2013      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 2009203237 A               | 10 Sep 2009      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 5242502 B2                 | 24 Jul 2013      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 2011188869 A               | 29 Sep 2011      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 5301611 B2                 | 25 Sep 2013      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 2010514460 A               | 06 May 2010      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 5357778 B2                 | 04 Dec 2013      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 2010503732 A               | 04 Feb 2010      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 5562031 B2                 | 30 Jul 2014      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 2011182798 A               | 22 Sep 2011      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 5645747 B2                 | 24 Dec 2014      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 2012503007 A               | 02 Feb 2012      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 5785493 B2                 | 30 Sep 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 2010500882 A               | 14 Jan 2010      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 5825756 B2                 | 02 Dec 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 2015187185 A               | 29 Oct 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 6178819 B2                 | 09 Aug 2017      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 2006100821 A               | 13 Apr 2006      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 2007512846 A               | 24 May 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 2008147707 A               | 26 Jun 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 2008505174 A               | 21 Feb 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 2008537941 A               | 02 Oct 2008      |
| Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.                                                                                                                                             |                  |                               |                  |
| Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2019)                                                                                                                                                                                                                            |                  |                               |                  |

10

20

30

40

50

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT                                                                                                                                                                                                                                           |                  | International application No. |                  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|-------------------------------|------------------|
| Information on patent family members                                                                                                                                                                                                                                  |                  | PCT/AU2021/051548             |                  |
| This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. |                  |                               |                  |
| Patent Document/s Cited in Search Report                                                                                                                                                                                                                              |                  | Patent Family Member/s        |                  |
| Publication Number                                                                                                                                                                                                                                                    | Publication Date | Publication Number            | Publication Date |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 2013177443 A               | 09 Sep 2013      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 2015221839 A               | 10 Dec 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | KR 20070029190 A              | 13 Mar 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | KR 100863776 B1               | 16 Oct 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | KR 20050116400 A              | 12 Dec 2005      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | KR 100890586 B1               | 25 Mar 2009      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | KR 20070116176 A              | 06 Dec 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | KR 100956110 B1               | 10 May 2010      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | KR 20050071523 A              | 07 Jul 2005      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | KR 100960560 B1               | 03 Jun 2010      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | KR 20090059170 A              | 10 Jun 2009      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | KR 100973564 B1               | 03 Aug 2010      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | KR 20080106371 A              | 04 Dec 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | KR 100980065 B1               | 03 Sep 2010      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | KR 20060092925 A              | 23 Aug 2006      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | KR 101238242 B1               | 04 Mar 2013      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | KR 20120102554 A              | 18 Sep 2012      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | KR 101299616 B1               | 23 Aug 2013      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | KR 20110061616 A              | 09 Jun 2011      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | KR 101783272 B1               | 29 Sep 2017      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | KR 20130030278 A              | 26 Mar 2013      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | KR 20140006746 A              | 16 Jan 2014      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | ME 01786 B                    | 20 Sep 2014      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | MX PA05010307 A               | 18 Apr 2006      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | RS 52775 B                    | 31 Oct 2013      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | RS 53263 B                    | 29 Aug 2014      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | RU 2005112742 A               | 20 Jan 2006      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | RU 2005137578 A               | 10 Jun 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | RU 2008104038 A               | 10 Aug 2009      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | RU 2005129847 A               | 10 Apr 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | RU 2006142852 A               | 10 Jun 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | SG 121171 A1                  | 26 Apr 2006      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | SG 155978 A1                  | 29 Oct 2009      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | SM T201600288 B               | 10 Nov 2016      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | TW 200625356 A                | 16 Jul 2006      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2005244403 A1              | 03 Nov 2005      |
| Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.                                                                                                                                             |                  |                               |                  |
| Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2019)                                                                                                                                                                                                                            |                  |                               |                  |

10

20

30

40

50

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT                                                                                                                                                                                                                                           |                  | International application No. |                  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|-------------------------------|------------------|
| Information on patent family members                                                                                                                                                                                                                                  |                  | PCT/AU2021/051548             |                  |
| This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. |                  |                               |                  |
| Patent Document/s Cited in Search Report                                                                                                                                                                                                                              |                  | Patent Family Member/s        |                  |
| Publication Number                                                                                                                                                                                                                                                    | Publication Date | Publication Number            | Publication Date |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 7276585 B2                 | 02 Oct 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2005054832 A1              | 10 Mar 2005      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 7317091 B2                 | 08 Jan 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2007161783 A1              | 12 Jul 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 7557190 B2                 | 07 Jul 2009      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2006077617 A1              | 13 Apr 2006      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 7653371 B2                 | 26 Jan 2010      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2006067028 A1              | 30 Mar 2006      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 7657242 B2                 | 02 Feb 2010      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2006008883 A1              | 12 Jan 2006      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 7657380 B2                 | 02 Feb 2010      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2007003546 A1              | 04 Jan 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 7662925 B2                 | 16 Feb 2010      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2010149722 A1              | 17 Jun 2010      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 7881686 B2                 | 01 Feb 2011      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2008167449 A1              | 10 Jul 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 7930107 B2                 | 19 Apr 2011      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2008267976 A1              | 30 Oct 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 7973136 B2                 | 05 Jul 2011      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2009092599 A1              | 09 Apr 2009      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 8039592 B2                 | 18 Oct 2011      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2009136485 A1              | 28 May 2009      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 8063187 B2                 | 22 Nov 2011      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2011085278 A1              | 14 Apr 2011      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 8078128 B2                 | 13 Dec 2011      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2006121032 A1              | 08 Jun 2006      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 8084582 B2                 | 27 Dec 2011      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2007160597 A1              | 12 Jul 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 8093357 B2                 | 10 Jan 2012      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2009068177 A1              | 12 Mar 2009      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 8093359 B2                 | 10 Jan 2012      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2009053240 A1              | 26 Feb 2009      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 8101720 B2                 | 24 Jan 2012      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2009068175 A1              | 12 Mar 2009      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 8124731 B2                 | 28 Feb 2012      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2006024298 A1              | 02 Feb 2006      |
| Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.                                                                                                                                             |                  |                               |                  |
| Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2019)                                                                                                                                                                                                                            |                  |                               |                  |

10

20

30

40

50

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT                                                                                                                                                                                                                                           |                  | International application No. |                  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|-------------------------------|------------------|
| Information on patent family members                                                                                                                                                                                                                                  |                  | PCT/AU2021/051548             |                  |
| This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. |                  |                               |                  |
| Patent Document/s Cited in Search Report                                                                                                                                                                                                                              |                  | Patent Family Member/s        |                  |
| Publication Number                                                                                                                                                                                                                                                    | Publication Date | Publication Number            | Publication Date |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 8188231 B2                 | 29 May 2012      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2010117761 A1              | 13 May 2010      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 8340615 B2                 | 25 Dec 2012      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2012230980 A1              | 13 Sep 2012      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 8383109 B2                 | 26 Feb 2013      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2007231329 A1              | 04 Oct 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 8388955 B2                 | 05 Mar 2013      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2010104557 A1              | 29 Apr 2010      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 8394374 B2                 | 12 Mar 2013      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2012225058 A1              | 06 Sep 2012      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 8399618 B2                 | 19 Mar 2013      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2010080814 A1              | 01 Apr 2010      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 8435517 B2                 | 07 May 2013      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2010272723 A1              | 28 Oct 2010      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 8524867 B2                 | 03 Sep 2013      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2013058919 A1              | 07 Mar 2013      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 8734791 B2                 | 27 May 2014      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2007248602 A1              | 25 Oct 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 8735545 B2                 | 27 May 2014      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2013261289 A1              | 03 Oct 2013      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 8735547 B2                 | 27 May 2014      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2013273043 A1              | 17 Oct 2013      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 8753628 B2                 | 17 Jun 2014      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2013302315 A1              | 14 Nov 2013      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 8753629 B2                 | 17 Jun 2014      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2014073768 A1              | 13 Mar 2014      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 8802823 B2                 | 12 Aug 2014      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2013243762 A1              | 19 Sep 2013      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 8809503 B2                 | 19 Aug 2014      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2013156758 A1              | 20 Jun 2013      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 8858937 B2                 | 14 Oct 2014      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2013202599 A1              | 08 Aug 2013      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 8883147 B2                 | 11 Nov 2014      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2008154025 A1              | 26 Jun 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 8937158 B2                 | 20 Jan 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2010249382 A1              | 30 Sep 2010      |
| Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.                                                                                                                                             |                  |                               |                  |
| Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2019)                                                                                                                                                                                                                            |                  |                               |                  |

10

20

30

40

50

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT                                                                                                                                                                                                                                           |                  | International application No. |                  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|-------------------------------|------------------|
| Information on patent family members                                                                                                                                                                                                                                  |                  | PCT/AU2021/051548             |                  |
| This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. |                  |                               |                  |
| Patent Document/s Cited in Search Report                                                                                                                                                                                                                              |                  | Patent Family Member/s        |                  |
| Publication Number                                                                                                                                                                                                                                                    | Publication Date | Publication Number            | Publication Date |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 9040041 B2                 | 26 May 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2014205605 A1              | 24 Jul 2014      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 9040042 B2                 | 26 May 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2013209457 A1              | 15 Aug 2013      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 9051373 B2                 | 09 Jun 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2013177553 A1              | 11 Jul 2013      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 9062117 B2                 | 23 Jun 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2012321620 A1              | 20 Dec 2012      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 9079960 B2                 | 14 Jul 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2015079082 A1              | 19 Mar 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 9193798 B2                 | 24 Nov 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2015139985 A1              | 21 May 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 9221916 B2                 | 29 Dec 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2012148578 A1              | 14 Jun 2012      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 9260523 B2                 | 16 Feb 2016      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2015093379 A1              | 02 Apr 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 9266966 B2                 | 23 Feb 2016      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2013156754 A1              | 20 Jun 2013      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 9353187 B2                 | 31 May 2016      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2013315910 A1              | 28 Nov 2013      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 9394366 B2                 | 19 Jul 2016      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2013203966 A1              | 08 Aug 2013      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 9540451 B2                 | 10 Jan 2017      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2012014943 A1              | 19 Jan 2012      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 9574006 B2                 | 21 Feb 2017      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2013203967 A1              | 08 Aug 2013      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 9617348 B2                 | 11 Apr 2017      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2015031862 A1              | 29 Jan 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 9657106 B2                 | 23 May 2017      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2015010543 A1              | 08 Jan 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 9663582 B2                 | 30 May 2017      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2014377256 A1              | 25 Dec 2014      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 9714282 B2                 | 25 Jul 2017      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2014212436 A1              | 31 Jul 2014      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 9738722 B2                 | 22 Aug 2017      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2014086906 A1              | 27 Mar 2014      |
| Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.                                                                                                                                             |                  |                               |                  |
| Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2019)                                                                                                                                                                                                                            |                  |                               |                  |

10

20

30

40

50

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT                                                                                                                                                                                                                                           |                  | International application No. |                  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|-------------------------------|------------------|
| Information on patent family members                                                                                                                                                                                                                                  |                  | PCT/AU2021/051548             |                  |
| This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. |                  |                               |                  |
| Patent Document/s Cited in Search Report                                                                                                                                                                                                                              |                  | Patent Family Member/s        |                  |
| Publication Number                                                                                                                                                                                                                                                    | Publication Date | Publication Number            | Publication Date |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 9803020 B2                 | 31 Oct 2017      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2015037321 A1              | 05 Feb 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 9902773 B2                 | 27 Feb 2018      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2015037322 A1              | 05 Feb 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 9914778 B2                 | 13 Mar 2018      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2015232567 A1              | 20 Aug 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 10113001 B2                | 30 Oct 2018      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2016318993 A1              | 03 Nov 2016      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 10183999 B2                | 22 Jan 2019      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2016347825 A1              | 01 Dec 2016      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 10184000 B2                | 22 Jan 2019      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2019071512 A1              | 07 Mar 2019      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 10584176 B2                | 10 Mar 2020      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2018009900 A1              | 11 Jan 2018      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 10626182 B2                | 21 Apr 2020      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2004110226 A1              | 10 Jun 2004      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2004132101 A1              | 08 Jul 2004      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2005249723 A1              | 10 Nov 2005      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2006134105 A1              | 22 Jun 2006      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2006235208 A1              | 19 Oct 2006      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2007053901 A1              | 08 Mar 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2007122406 A1              | 31 May 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2007148170 A1              | 28 Jun 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2007148171 A1              | 28 Jun 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2007166309 A1              | 19 Jul 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2007202098 A1              | 30 Aug 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2007219133 A1              | 20 Sep 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2007224189 A1              | 27 Sep 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2007224192 A1              | 27 Sep 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2007237765 A1              | 11 Oct 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2007237766 A1              | 11 Oct 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2007237767 A1              | 11 Oct 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2007238665 A1              | 11 Oct 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2007243188 A1              | 18 Oct 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2007248603 A1              | 25 Oct 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2007275460 A1              | 29 Nov 2007      |
| Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.                                                                                                                                             |                  |                               |                  |
| Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2019)                                                                                                                                                                                                                            |                  |                               |                  |

10

20

30

40

50

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT                                                                                                                                                                                                                                           |                  | International application No. |                  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|-------------------------------|------------------|
| Information on patent family members                                                                                                                                                                                                                                  |                  | PCT/AU2021/051548             |                  |
| This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. |                  |                               |                  |
| Patent Document/s Cited in Search Report                                                                                                                                                                                                                              |                  | Patent Family Member/s        |                  |
| Publication Number                                                                                                                                                                                                                                                    | Publication Date | Publication Number            | Publication Date |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2007286859 A1              | 13 Dec 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2008051563 A1              | 28 Feb 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2008057056 A1              | 06 Mar 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2008152649 A1              | 26 Jun 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2008161541 A1              | 03 Jul 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2008181890 A1              | 31 Jul 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2008199471 A1              | 21 Aug 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2008206242 A1              | 28 Aug 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2008206867 A1              | 28 Aug 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2008219974 A1              | 11 Sep 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2008242845 A1              | 02 Oct 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2008248028 A1              | 09 Oct 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2008254027 A1              | 16 Oct 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2008260731 A1              | 23 Oct 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2008292621 A1              | 27 Nov 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2009010920 A1              | 08 Jan 2009      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2009042291 A1              | 12 Feb 2009      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2009081208 A1              | 26 Mar 2009      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2009142340 A1              | 04 Jun 2009      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2009162382 A1              | 25 Jun 2009      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2009214526 A1              | 27 Aug 2009      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2009215991 A1              | 27 Aug 2009      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2010093979 A1              | 15 Apr 2010      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2010190247 A1              | 29 Jul 2010      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2010311954 A1              | 09 Dec 2010      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2010317834 A1              | 16 Dec 2010      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2011021755 A1              | 27 Jan 2011      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2011236969 A1              | 29 Sep 2011      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2011250681 A1              | 13 Oct 2011      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2012082664 A1              | 05 Apr 2012      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2012156207 A1              | 21 Jun 2012      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2012156220 A1              | 21 Jun 2012      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2012258092 A1              | 11 Oct 2012      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2013209445 A1              | 15 Aug 2013      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2014112916 A1              | 24 Apr 2014      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2014212435 A1              | 31 Jul 2014      |
| Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.                                                                                                                                             |                  |                               |                  |
| Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2019)                                                                                                                                                                                                                            |                  |                               |                  |

10

20

30

40

50

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT                                                                                                                                                                                                                                           |                  | International application No. |                  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|-------------------------------|------------------|
| Information on patent family members                                                                                                                                                                                                                                  |                  | PCT/AU2021/051548             |                  |
| This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. |                  |                               |                  |
| Patent Document/s Cited in Search Report                                                                                                                                                                                                                              |                  | Patent Family Member/s        |                  |
| Publication Number                                                                                                                                                                                                                                                    | Publication Date | Publication Number            | Publication Date |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2015010550 A1              | 08 Jan 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2015030592 A1              | 29 Jan 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2015071948 A1              | 12 Mar 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2015315284 A1              | 05 Nov 2015      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2016122435 A1              | 05 May 2016      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2016347837 A1              | 01 Dec 2016      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2017166655 A1              | 15 Jun 2017      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2017335013 A1              | 23 Nov 2017      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2018141997 A1              | 24 May 2018      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2018201686 A1              | 19 Jul 2018      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2018208668 A1              | 26 Jul 2018      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2018215821 A1              | 02 Aug 2018      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2018215822 A1              | 02 Aug 2018      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2018360981 A1              | 20 Dec 2018      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2019315861 A1              | 17 Oct 2019      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2019330342 A1              | 31 Oct 2019      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2020071402 A1              | 05 Mar 2020      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2020317804 A1              | 08 Oct 2020      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2020332024 A1              | 22 Oct 2020      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2021009689 A1              | 14 Jan 2021      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2021009690 A1              | 14 Jan 2021      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2021139600 A1              | 13 May 2021      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2021395363 A1              | 23 Dec 2021      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | WO 03074679 A2                | 12 Sep 2003      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | WO 2004029207 A2              | 08 Apr 2004      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | WO 2004099249 A2              | 18 Nov 2004      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | WO 2005056759 A2              | 23 Jun 2005      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | WO 2005077981 A2              | 25 Aug 2005      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | WO 2005092925 A2              | 06 Oct 2005      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | WO 2006019447 A1              | 23 Feb 2006      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | WO 2006047350 A2              | 04 May 2006      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | WO 2006085967 A2              | 17 Aug 2006      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | WO 2006105338 A2              | 05 Oct 2006      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | WO 2007008943 A2              | 18 Jan 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | WO 2007041635 A2              | 12 Apr 2007      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | WO 2007044616 A2              | 19 Apr 2007      |
| Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.                                                                                                                                             |                  |                               |                  |
| Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2019)                                                                                                                                                                                                                            |                  |                               |                  |

10

20

30

40

50

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT                                                                                                                                                                                                                                           |                  | International application No. |                  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|-------------------------------|------------------|
| Information on patent family members                                                                                                                                                                                                                                  |                  | PCT/AU2021/051548             |                  |
| This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. |                  |                               |                  |
| Patent Document/s Cited in Search Report                                                                                                                                                                                                                              |                  | Patent Family Member/s        |                  |
| Publication Number                                                                                                                                                                                                                                                    | Publication Date | Publication Number            | Publication Date |
| US 2017/0355766 A1                                                                                                                                                                                                                                                    | 14 December 2017 | WO 2008022152 A2              | 21 Feb 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | WO 2008036688 A2              | 27 Mar 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | WO 2008091798 A2              | 31 Jul 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | WO 2008091954 A2              | 31 Jul 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | WO 2008092117 A2              | 31 Jul 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | WO 2008098115 A2              | 14 Aug 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | WO 2008121160 A2              | 09 Oct 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | WO 2008150494 A1              | 11 Dec 2008      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | WO 2010033736 A1              | 25 Mar 2010      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | WO 2014113510 A1              | 24 Jul 2014      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2017355766 A1              | 14 Dec 2017      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CA 3026880 A1                 | 14 Dec 2017      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 3468997 A1                 | 17 Apr 2019      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 2019525949 A               | 12 Sep 2019      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | WO 2017214452 A1              | 14 Dec 2017      |
| End of Annex                                                                                                                                                                                                                                                          |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類 F I テーマコード (参考)

|         |       |           |         |        |       |
|---------|-------|-----------|---------|--------|-------|
| A 6 1 P | 31/04 | (2006.01) | A 6 1 P | 31/04  |       |
| A 6 1 P | 31/12 | (2006.01) | A 6 1 P | 31/12  |       |
| A 6 1 P | 25/00 | (2006.01) | A 6 1 K | 39/395 | V     |
| C 0 7 K | 16/00 | (2006.01) | A 6 1 P | 25/00  |       |
| C 0 7 K | 16/46 | (2006.01) | C 0 7 K | 16/00  | Z N A |
| C 1 2 N | 15/13 | (2006.01) | C 0 7 K | 16/46  |       |
|         |       |           | C 1 2 N | 15/13  |       |

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N  
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,  
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,K  
E,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,N  
G,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,  
TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

Kalvebod Brygge 43 1560 Copenhagen V Denmark

- (74)代理人 110000338  
弁理士法人 HARAKENZO WORLD PATENT & TRADEMARK
- (72)発明者 ホガース, フィリップ マーク  
オーストラリア, 3 0 1 6 ビクトリア, ウィリアムトン, ローバーソン ストリート 6
- (72)発明者 ウィネス, ブルース デイビッド  
オーストラリア, 3 0 8 4 ビクトリア, ハイデルベルク, アンダーソン ストリート 4 8
- (72)発明者 トリスト, ハリナ マリー  
オーストラリア, 3 1 9 3 ビクトリア, ビューマリス, ヘイスティングス アベニュー 3
- (72)発明者 エスパロン, サンドラ エリザベス  
オーストラリア, 3 1 0 8 ビクトリア, ドンカスター, エルム ツリー ロード, ユニット 2 /  
6 - 8
- (72)発明者 チェノウェス, アリシア ミシェル  
イギリス, エスイー 1 5 5 エチエス, ロンドン, ハノーバー パーク 4 0 シー
- F ターム (参考) 4C085 AA14 BB11 CC23 EE01  
4H045 AA30 BA10 CA40 DA76 EA20 FA74 GA21