

平成28年3月8日判決言渡

平成27年(行ケ)第10043号 審決取消請求事件

口頭弁論終結日 平成28年2月4日

判 決

原 告 キ ュ ア バ ッ ク
ゲ ー エ ム ベ ー ハ ー

訴訟代理人弁理士	原 謙 三
同	福 井 清
同	藤 田 けんじろう
同	中 尾 守 男
同	青 野 直 樹
同	鶴 田 健 太 郎
同	小 池 隆 彌
同	黒 田 敏 朗
同	長 谷 川 和 哉

被 告	特 許 庁 長 官
指 定 代 理 人	田 村 明 照
同	高 堀 栄 二
同	井 上 猛
同	金 子 尚 人

主 文

- 1 原告の請求を棄却する。
- 2 訴訟費用は原告の負担とする。

- 3 この判決に対する上告及び上告受理の申立てのための付加期間を30日と定める。

事実及び理由

第1 請求

特許庁が不服2013-11636号事件について平成26年10月20日にした審決を取り消す。

第2 事案の概要

1 特許庁における手続の経緯等

- (1) 原告は、発明の名称を「トランスフェクションおよび免疫活性化のためのRNAの複合化」とする発明について、平成20年9月4日を国際出願日とする特許出願(特願2010-523324号, 優先権主張2007年(平成19年)9月4日・欧州特許庁(E P))。以下「本願」といい、優先権主張日を「本願優先日」という。)をした(甲1)。

原告は、平成24年8月28日付けで拒絶理由通知を受けたため、同年11月28日付けで、本願の願書に添付した特許請求の範囲について手続補正(甲5)をしたが、平成25年2月8日付けで拒絶査定を受けた。

そこで、原告は、同年6月19日、拒絶査定不服審判を請求するとともに、本願の願書に添付した特許請求の範囲について手続補正(以下「本件補正」という。甲2)をした。

- (2) 特許庁は、上記請求を不服2013-11636号事件として審理を行い、平成26年10月20日、本件補正を却下した上で、「本件審判の請求は、成り立たない。」との審決(出訴期間90日附加。以下「本件審決」という。)をし、同年11月4日、その謄本が原告に送達された。
- (3) 原告は、平成27年3月4日、本件審決の取消しを求める本件訴訟を提起した。

2 特許請求の範囲の記載

(1) 本件補正前のもの

本件補正前（ただし，平成24年11月28日付け手続補正による補正後。以下同じ。）の特許請求の範囲の請求項1の記載は，次のとおりである（甲5。以下，同請求項1に係る発明を「本願発明」という。）。

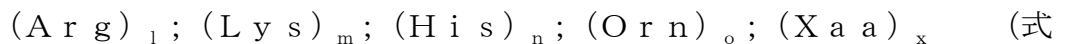
「【請求項1】

1つ以上のオリゴペプチドと複合化された少なくとも1つのRNA(分子)を包含する免疫活性化複合化一本鎖RNAであって，

上記RNAと上記オリゴペプチドとが，これらの分子の非共有的な相互作用によって連結しており

上記1つのRNA(分子)の，上記1つ以上のオリゴペプチドに対する窒素／リン酸塩比(N／P比)が，0.5～50の範囲内であって，

上記オリゴペプチドは8～15アミノ酸の長さであり，かつ以下の実験式



I)

によって表され，

上記実験式において，

$l + m + n + o + x = 8 \sim 15$ であり，かつ l ， m ， n ，および o は，それぞれ独立して，0，1，2，3，4，5，6，7，8，9，10，11，12，13，14，および15から選択された任意の数値であり， $A r g$ ， $L y s$ ， $H i s$ ，および $O r n$ の総含有量が，上記オリゴペプチドの全てのアミノ酸の少なくとも50%に相当するように規定され；

$X a a$ は， $A r g$ ， $L y s$ ， $H i s$ ，および $O r n$ 以外の天然アミノ酸または非天然アミノ酸から選択された任意のアミノ酸であり；さらに

x は，0，1，2，3，4，5，6，7，および8から選択された任意の数値であり， $X a a$ の総含有量が，上記オリゴペプチドの全アミノ酸の50%を超えないように規定された，

腫瘍または癌疾患，循環器病，感染症，（感染性）ウイルス性疾患，自己免疫疾患，（単）遺伝子疾患，および／またはアレルギーから選択される疾病の処置および／または予防における治療用複合化RNA。」

(2) 本件補正後のもの

本件補正後の特許請求の範囲の請求項1の記載は，次のとおりである（甲2。以下，同請求項1に係る発明を「本願補正発明」という。下線部は，本件補正による補正箇所である）。

「【請求項1】

1つ以上のオリゴペプチドと複合化された少なくとも1つのRNA(分子)を包含する免疫活性化複合化一本鎖RNAであって，

上記RNAと上記オリゴペプチドとが，これらの分子の非共有的な相互作用によって連結しており

上記1つのRNA(分子)の，上記1つ以上のオリゴペプチドに対する窒素／リン酸塩比(N/P比)が，0.5～50の範囲内であって，

上記オリゴペプチドは8～15アミノ酸の長さであり，かつ以下の実験式

$(\text{Arg})_1; (\text{Lys})_m; (\text{His})_n; (\text{Orn})_o; (\text{Xaa})_x$ (式

I)

によって表され，

上記実験式において，

$l+m+n+o+x=8\sim 15$ であり，かつ l ， m ， n ，および o は，それぞれ独立して，0，1，2，3，4，5，6，7，8，9，10，11，12，13，14，および15から選択された任意の数値であり，Arg，Lys，His，およびOrnの総含有量が，上記オリゴペプチドの全てのアミノ酸の少なくとも50%に相当するように規定され；

Xaaは，Arg，Lys，His，およびOrn以外の天然アミノ酸または非天然アミノ酸から選択された任意のアミノ酸であり；さらに

xは、0、1、2、3、4、5、6、7、および8から選択された任意の数値であり、X a aの総含有量が、上記オリゴペプチドの全アミノ酸の50%を超えないように規定され、

上記複合化一本鎖RNAの少なくとも1つのRNA（分子）、対、上記1つ以上のオリゴペプチドのモル比が、1：250以上であり、

腫瘍または癌疾患、循環器病、感染症、（感染性）ウイルス性疾患、自己免疫疾患、（単）遺伝子疾患、および／またはアレルギーから選択される疾病の処置および／または予防における治療用複合化RNA。」

3 本件審決の理由の要旨

(1) 本件審決の理由は、別紙審決書（写し）記載のとおりである。要するに、

①本願補正発明は、本願優先日前に頒布された刊行物である国際公開第2006/046978号公報（以下「引用例1」という。）に記載された発明及び本願優先日当時の技術常識に基づいて、当業者が容易に発明をすることができたものであり、特許法29条2項の規定により、特許出願の際独立して特許を受けることができないものであるから、本件補正は、平成18年法律第55号による改正前の特許法17条の2第5項において準用する同法126条5項の規定に違反するので、同法159条1項において読み替えて準用する同法53条1項の規定により却下すべきものである、②本願発明は、引用例1に記載された発明及び本願優先日当時の技術常識に基づいて、当業者が容易に発明をすることができたものであって、特許法29条2項の規定により特許を受けることができないものであるから、本願は拒絶されるべきであるというものである。

(2) 本件審決が認定した引用例1に記載された発明（以下「引用発明」という。）、本願補正発明と引用発明の一致点及び相違点は、以下のとおりである。

ア 引用発明

「Port-3 (HIV Tat: GRKKRRQRRRPPQ; SEQ ID NO: 29) カチオン性ペプチドと緑色蛍光タンパク質をコードするRNAの非共有結合複合体であって、Portカチオン性ペプチドとRNAの複合比は、100:1~1:1の範囲である複合体。」

イ 一致点

「1つ以上のオリゴペプチドと複合化された少なくとも1つのRNA(分子)を包含する複合化一本鎖RNAであって、

上記RNAと上記オリゴペプチドとが、これらの分子の非共有的な相互作用によって連結しており

上記オリゴペプチドは13アミノ酸の長さであり、かつ以下の実験式

$(Arg)_1; (Lys)_m; (His)_n; (Orn)_o; (Xaa)_x$
(式I) によって表され、

上記実験式において、

$l+m+n+o+x=13$ であり、かつ l は6、 m は2、 n 、および o は0であり、 Arg 、 Lys 、 His 、および Orn の総含有量が、上記オリゴペプチドの全てのアミノ酸の少なくとも50%に相当するように規定され;

Xaa は、 Arg 、 Lys 、 His 、および Orn 以外の天然アミノ酸または非天然アミノ酸から選択された任意のアミノ酸であり; さらに

x は5であり、 Xaa の総含有量が、上記オリゴペプチドの全アミノ酸の50%を超えないように規定される複合化RNA。」である点。

ウ 相違点

(ア) 相違点(1)

「複合化一本鎖RNA」が、本願補正発明においては「免疫活性化」との性質を有し、「腫瘍または癌疾患、循環器病、感染症、(感染性)ウイルス性疾患、自己免疫疾患、(単)遺伝子疾患、および/またはアレ

ルギーから選択される疾病の処置および／または予防における治療用」に用いるものであることが特定されているのに対し、引用発明においては、緑色蛍光タンパク質をコードするものである点。

(イ) 相違点(2)

複合体の1つのRNA(分子)の、1つ以上のオリゴペプチドに対する窒素／リン酸塩比(N/P比)が、本願補正発明においては、0.5～50の範囲内であるのに対し、引用発明においては、1.14であり、また、複合体の構成成分の複合比が、本願補正発明においては、「複合化一本鎖RNAの少なくとも1つのRNA(分子)、対、上記1つ以上のオリゴペプチドのモル比が、1:250以上」であるのに対し、引用発明においては、100:1～1:1(判決注 RNA対オリゴペプチドのモル比という意味では、厳密には1:1～1:100)の範囲である点。

第3 当事者の主張

1 原告の主張

(1) 取消事由1(引用発明の認定の誤り)

本件審決は、引用例1の記載から前記第2の3(2)アの引用発明を認定した。

しかしながら、以下のとおり、引用例1の記載から上記の引用発明を認定することは誤りである。

ア 引用例1には、多くの形質転換の方法、治療プロトコル及び一般的な技術論が記載されているが、これらの記載を裏付ける実験データの記載はないから、引用例1の記載は、単に理論上の可能性を示唆するにとどまる。

しかも、引用例1には、イン・ビボ条件における効果の記載もない。

なお、被告の主張するように、核酸とカチオン性ペプチドの複合体を用いることにより、トランスフェクションをすることは周知であり、GFP

をコードするRNAを対象の細胞に導入することはトランスフェクションによる遺伝子発現を観察するためによく用いられているが、RNAとペプチドとの複合体を作製して、その複合体を用いて、対象の細胞を形質転換するという方法を採用するに当たって、当該RNAをどのようなペプチドに複合化させても、必ず対象の細胞を形質転換できるわけではない。

したがって、実験的証拠の記載もない引用例1からは、形質転換できるという効果を奏する複合体が得られることや、仮に複合体が得られたとしても、引用例1に記載された性質を示すことは確認できないのであるから、引用例1には実施可能なものとして完成した発明が記載されているとはいえない。

イ 引用例1には、本件審決で引用発明を認定する基礎となったPorter-3 (HIV Tat: GRKKRRQRRRPPQ; SEQ ID NO: 29) カチオン性ペプチド(以下「Porter-3カチオン性ペプチド」ということがある。)以外にも多数のペプチドが記載されている上に、引用例1の実施例1の記載のみを参照しても、Porter-3カチオン性ペプチド以外に、本願補正発明の構成を有するものではない二つのペプチドが含まれている。

そうすると、引用例1の記載からPorter-3カチオン性ペプチドを選択することは当業者において容易ではなく、そのような特定は、後知恵によつてのみ可能なものというべきであるから、引用例1に基づいて引用発明を認定することはできない。

(2) 取消事由2 (相違点(1)の容易想到性の判断の誤り)

ア 本件審決は、相違点(1)につき、引用発明が細胞性免疫反応を誘導するものである一方、本願補正発明が有する性質は「生得の免疫反応を誘引する」等の限定を付すことなく、単に「免疫活性化」と特定されるものであるから、細胞性免疫反応の誘導をも包含するものであるとの判断を前提に、腫

瘍または癌疾患，感染症治療，（感染性）ウイルス性疾患などの処置，予防に有用な樹状細胞ワクチンを製造するために，引用発明の緑色蛍光タンパク質をコードするRNAに代えて，腫瘍細胞や病原体由来のmRNAを用いて，複合化一本鎖RNAを得ることは当業者が容易に想到することであり，このようにして得られた複合化一本鎖RNAは，樹状細胞に細胞性免疫反応を誘導させる性質，つまり，「免疫活性化」との性質を有するものであると判断した。

イ しかしながら，本願の特許請求の範囲の請求項1にいう「免疫活性化」は，免疫反応を活性化する生得（抗原非依存性）の効果を指すために一般的に広く用いられる語であり，本願発明における「免疫活性化複合化一本鎖RNA」は，複合化一本鎖RNAがそれ自体で身体に対して非特異的な免疫活性効果を有するものを意味する。

このことは，本願の明細書（以下，本願の明細書と図面を併せて「本願明細書」という。）の実施例5及び図7において，ルシフェラーゼをコードするRNAとノナアルギニン（(Arg)₉）との複合体を，ヒトPBMCsに触れさせると，TNF- α 等のサイトカインの生産及び分泌が生じているところ，これは，非特異的な免疫応答によるものか，又は，RNA／ペプチド複合体自体が起因した生得の免疫応答による「免疫活性」の特徴的な性質であることや，本願明細書の段落【0060】及び実施例5のとおり，本願補正発明は，RNA／ペプチド複合体自体が，細胞質基質ではなくエンドソームの内部に存在するTLR受容体と結合することにより，特定のサイトカインを分泌することで，生得の免疫反応を引き起こすものであることから明らかである。

ウ これに対し，引用例1には，実施例1に，mRNAがコードするレポータータンパク質（緑色蛍光タンパク質）のHeLa細胞への輸送に関する記載があるにすぎないことから明らかなように，細胞をトランスフェク

ションするためにカチオン性ペプチドを用いること、及びトランスフェクトされるmRNAから細胞質基質において翻訳されたタンパク質抗原が抗原提示細胞上に提示され、これにより免疫反応を引き起こすこと、すなわち従来から知られている抗原特異的な免疫応答が開示されているにとどまる。

エ 以上のとおり、本願補正発明に係る免疫活性化複合化一本鎖RNAと、引用例1に開示されている複合体とでは、免疫を誘導するための機構が全く異なるから、当業者が引用例1に基づき本願補正発明の相違点(1)に係る構成を容易に想到し得たものということとはできず、本件審決の判断は誤りである。

(3) 取消事由3（相違点(2)の容易想到性の判断の誤り）

本件審決は、相違点(2)に関し、引用例1の緑色蛍光タンパク質をコードするRNAについて、238アミノ酸において1個のアミノ酸につき3個のヌクレオチドが対応付けられている配列を開示する甲4を根拠として、「当該mRNAの残基数が700残基程度であることは本願優先日当時の技術常識である。」とした上で、カチオン性ペプチドとRNAの複合比が「100：1」である場合、引用発明のN/P比は1.14（ $= 8 \times 100 / 700$ ）となると認定した上で、複合体の効率的な複合体形成や導入のために、「複合化一本鎖RNAの少なくとも1つのRNA（分子）、対、上記1つ以上のオリゴペプチドのモル比」を最適化し、1：250以上とすることや、複合体のカチオン性ペプチドの正電荷とRNAの負電荷のバランスに着目して、複合体の「1つのRNA（分子）の、1つ以上のオリゴペプチドに対する窒素／リン酸塩比（N/P比）」のようなパラメータを設定、最適化し、これを0.5～50の範囲内とすることは当業者が適宜行うことであり、本願明細書をもみても、そのような数値限定をすることの臨界的意義は認められない旨判断した。

しかしながら、以下のとおり、本件審決の判断は誤りである。

ア N/P比について

(ア) N/P比は、ペプチド対RNAのモル比に対応するもので、RNAのモル量当たりのペプチドの数が掛け合わされた、複合タンパク質の正の荷電のアミノ酸(N)の数を、負の荷電である当該RNAのモル量当たりのリン酸(P)部分の数で割ることで定義される数値であり、mRNAの長さ(リン酸部分の数で示されるヌクレオチドの数)は、RNA分子によって定義されるN/P比の算出の決め手となることはよく知られている。

この点、引用例1には、緑色蛍光タンパク質をコードするmRNAの長さについて一切記載がない上に、緑色蛍光タンパク質をコードするmRNAの長さは、コード領域のヌクレオチドの数に依存するだけでなく、mRNAの5'非翻訳領域及び3'非翻訳領域の長さにも依存することに照らすと、引用発明の緑色蛍光タンパク質をコードするmRNAについて、甲4を根拠として、引用発明の緑色蛍光タンパク質のmRNAの塩基数が700塩基程度であることが本願優先日当時の技術常識であると認定することは誤りである。

そして、引用例1に基づいて導き出せる事項は、せいぜい、引用発明の緑色蛍光タンパク質をコードするmRNAの長さは、確実に700塩基より極めて大きいであろうということだけにすぎないから、このような引用例1の開示事項から、本願発明の相違点(2)のN/P比に係る構成が示唆されることはない。

(イ) 本件審決は、本願補正発明のN/P比について臨界的意義が認められない旨判断している。

しかしながら、引用発明では、免疫反応に関して、抗原をコードする核酸で形質転換された細胞において、コードされた抗原を発現させるこ

とが記載されているのみであるのに対し、本願補正発明は、あらゆる抗原の発現及び提示を含まない、生得の免疫反応を引き起こすことを課題として、これを解決するものであり、その効果も開示されている。このように、本願補正発明と引用発明とでは、解決しようとする課題が異なり、得られる効果も異質であるから、引用発明に基づく本願補正発明の進歩性を判断するに際して、N/P比の値に関する臨界的意義を問題とする必要はない。

(ウ) 被告は、核酸を細胞にトランスフェクションする際、核酸をカチオン性ポリマーとの複合体とすること、及び、そのN/P比については、本願優先日前にすでに多数の文献（乙5ないし7）に記載されていたほか、核酸とカチオン性ペプチドとの複合体のN/P比として、0.5～50の範囲内の数値である、例えば2～3程度の数値が、トランスフェクション効率の点で好ましいことが本願優先日前の周知事項であった（乙4、8、9）から、引用発明においてトランスフェクション効率を高めるために、N/P比を最適化し、0.5～50の範囲内の数値とすることは、当業者であれば容易になし得ることである旨主張する。

しかしながら、被告が挙げる上記各文献に記載されたヌクレオチドは、引用発明のものよりも短かったり（乙7）、トランスフェクトするヌクレオチドがRNAでなくDNAであったり（乙4、8、9）するもので、引用発明の複合体の構成要素とは異なる。そして、トランスフェクションのしやすさは、N/P比だけでは決定されず、複合体の大きさなど様々な要素が影響するものであるから、ある複合体についてトランスフェクションの効率上好ましいとされるN/P比を、トランスフェクションの対象が異なる別のものに適用することはできない。

したがって、被告の上記主張は理由がない。

イ 複合化一本鎖RNAの少なくとも1つのRNA（分子）、対、上記1つ

以上のオリゴペプチドのモル比について、

(ア) 引用例1は、ペプチド対RNA複合体の比が100：1～1：1の範囲にある、つまり、RNA分子1個当たり、最大でもペプチドは100個以下であると明確に記載しており、これ以外に数値範囲についての記載はない。しかも、引用発明における上記数値範囲は、本願補正発明と異なる引用例1記載の発明の目的である、細胞形質転換及び細胞サイトゾル内でのmRNA翻訳（前記(2)ウ）に適合するよう設定されたものである。したがって、上記の数値は単なる例示ではなく、引用発明に接した当業者において、上記の数値を変更することはない。

仮に、引用発明の上記の数値範囲が単なる一例を示したものにすぎないとしても、相違点(2)の構成に係るモル比は、引用例1に記載された、トランスフェクションして生成されるタンパク質抗原による免疫誘導という課題ではなく、引用例1に記載のない、複合体自体がTLRに結合することによる免疫活性という本願補正発明の課題を検討して初めて想到し得るものである。そうすると、引用発明に接した当業者において、引用発明のモル比につき、相違点(2)のモル比に係る構成とする動機付けがない。

したがって、引用発明から本願補正発明との相違点(2)の構成に係るモル比を想到することはできない。

(イ) 前記ア(ア)のとおり、引用例1記載の緑色蛍光タンパク質をコードするmRNAの長さは明らかではない。もっとも、甲4には、1000塩基よりわずかに大きい緑色蛍光タンパク質をコードするmRNAの塩基長の開示があるから、仮に引用例1記載の緑色蛍光タンパク質をコードするmRNAの塩基長としてこれを用いるとしても、引用発明の複合体のN/P比を本願補正発明において特定された0.5～50の範囲とするためには、引用発明におけるRNAとPort-3カチオン性ペプ

チドの複合比は、少なくとも1：62.5以上となり、引用発明の同比1：1～1：100のうち、1：62.5～1：100というわずかな範囲でしか実現されず、それ以外の範囲では実現されない。

引用発明における緑色蛍光タンパク質をコードするmRNAの長さがより長ければ、本願補正発明において特定されたN/P比の範囲を満たすためのRNA 1個に対するペプチドのモル比の範囲はさらに狭くなる。

そうすると、引用発明において、本願補正発明において特定されるようなN/P比の範囲となるようなモル比を選択するための具体的な教示があるということとはできず、そのような選択は後知恵によってのみ可能というべきであるから、当業者は相違点(2)のモル比に係る構成を容易に想到し得ない。

(ウ) a 引用発明における抗原特異的な免疫反応の活性化の効果を奏するためには、RNAを当該RNAがコードしている抗原タンパク質に翻訳することを可能にするために、複合体が、細胞内で、翻訳機構(リボソーム)の存在する細胞質に輸送される必要がある。しかしながら、引用発明におけるRNA複合体のように、RNAに対するペプチドのモル比が250以上(かつ、本願の特許請求の範囲の請求項1に特定するN/P比)であるようにすると、そのような重い複合体は細胞質に到達できず、仮にイン・ビトロ等で人工的に細胞質に到達させたとしても、複合体中のRNAが複合化しているペプチドに「遮蔽」されてしまい、細胞質内のリボソームがRNAに翻訳可能なように結合できず、抗原が全く発現されないことが当業者において知られている。

そうすると、当業者において、引用発明のRNAに対するペプチドのモル比を250以上(かつ、本願の特許請求の範囲の請求項1に特定するN/P比)とすることはない。

なお、本願補正発明に係る免疫活性化複合化一本鎖RNAは、非特異的な（生得の）免疫反応を可能にするために、細胞の細胞質ではなく、TLR7/8の存在する細胞のエンドソーム区画内に輸送される必要があるから、そのような効果を奏するために本願補正発明の構成が採用されているものである。

b 被告は、本願明細書の実施例4及び図8において、ルシフェラーゼ mRNAのノナアルギニン（(Arg)₉）に媒介されるトランスフェクションにおけるルシフェラーゼの発現が示されており、RNAに対するペプチドのモル比が250以上（かつ、本願の特許請求の範囲の請求項1に特定するN/P比）であるような重いRNA複合体であっても、細胞質内のリボソームに到達することが示されている旨主張する。

確かに、イン・ビトロの実験においては、本願明細書の実施例4及び図8に示されるような結果となるものの、イン・ビボの条件では、これと異なり、その理由は不明であるものの、タンパク質は発現しないか、弱い発現が確認されるのみであることは、当業者において周知である（甲10）。そして、実際に問題とすべきは、複合化RNAのイン・ビボにおける挙動であるから、本願明細書の上記記載は、RNAに対するペプチドのモル比が250以上（かつ、本願の特許請求の範囲の請求項1に特定するN/P比）であるような重いRNA複合体であっても、リボソームに到達することを示すものとはいえない。

したがって、被告の上記主張は理由がない。

(エ) a 本件審決は、モル比を1：250以上とすることにつき、臨界的意義は認められない旨判断している。

しかしながら、前記ア(イ)と同様の理由により、モル比の点について臨界的意義を問題とすべきでない。

仮に臨界的意義を問題とすべきとしても、本願明細書の図7には、(Arg)₉:Luc-RNAの質量比1:2(RNA分子1個当たりペプチド192個のモル比に対応する)~10:1(RNA分子1個当たりペプチド3833.8個のモル比に対応する)の複合体において、顕著に優れた生得の免疫活性効果を確認できる反面、質量比1:5(RNA分子1個当たりペプチド76.7個のモル比に対応する)、1:8及び1:10の複合体の場合にはその効果は顕著に低くなること示されている。

さらに、本願明細書の実施例8、図10及び図11において、1個のRNA分子に対してペプチドを250個以上用いるという技術思想によって、極めて高い免疫活性効果が得られることが裏付けられているほか、実施例11、図21及び図22において、引用例1で開示された最大値であるRNA1個当たりペプチド100個というモル比では、対照系であるw/oRNAと比較して免疫活性効果を一切示していない一方、RNA1個当たりのペプチド数を増加させて、500個から5000個とした場合には、TNF α 又はIL-6サイトカインのそれぞれの発現によって示される免疫活性効果が大幅に増加することが示されている。

以上によると、モル比を1:250以上とすることの臨界的意義は明らかである上に、当該モル比によって得られる効果は引用発明から予測される範囲を超えた顕著な効果を奏する。

したがって、本件審決の上記判断は誤りである。

- b 被告は、本願補正発明における複合化一本鎖RNAは、その長さや配列の限定がなく、5~20000という広範囲のヌクレオチドの長さのものを含む任意のRNAであるから、前記aの本願明細書の記載によっても、本願補正発明全体が同様の効果を奏するとはいえない旨

主張する。

しかしながら、TLRに結合するという生得の免疫活性の性質は、RNAの長さに依存するものではなく、本願補正発明の構成に依存するものであるから、被告の上記主張は理由がない。そもそも、審査の過程で述べられなかった理由を進歩性欠如の理由とすることは許容されるべきではない。

また、被告は、本願明細書の実施例8、図10及び11で用いられた免疫活性化複合化一本鎖は、本願補正発明の構成とは異なるものであるから、これらを根拠に本願補正発明の効果を主張することはできない旨主張する。

しかしながら、原告の本願明細書の実施例8、図10及び図11に基づく主張は、ペプチドと複合した一本鎖RNAによって、抗原の発現を求めずに優れた生得の免疫活性を得るという課題について検討したからこそ、ペプチド：モル比が1：250以上という構成に想到したことを説明するためのものにすぎないから、被告の上記主張はその前提を欠くものである。

2 被告の主張

(1) 取消事由1に対し

ア 原告は、引用例1には、多くの形質転換の方法、治療プロトコル及び一般的な技術論が記載されているが、これらの記載を裏付ける実験データの記載はなく、したがって、引用例1の記載は、単に理論上の可能性を示唆するにとどまるのであって、引用例1からは、形質転換できるという効果を奏する複合体が得られることや、仮に複合体が得られたとしても、引用例1に記載された性質を示すことは確認できないから、実施可能なものとして完成した発明が記載されているとはいえない旨主張する。

しかしながら、本件審決は、引用例1の請求項29（甲3の31頁、甲

3の訳文である乙1の27頁)及び実施例1(甲3の27頁15行～28頁2行,甲3の訳文である乙1の26～27頁)に基づいて、「Port-3 (HIV Tat: GRKKRRQRRRPPQ; SEQ ID NO: 29) カチオン性ペプチドと緑色蛍光タンパク質をコードするRNAの非共有結合複合体であって,Portカチオン性ペプチドとRNAの複合比は,100:1～1:1の範囲である複合体。」という物質を「引用発明」として認定したものである

そして,引用例1には,本願優先日前の技術常識に照らして,本件審決が引用発明として認定した複合体が製造できるように記載されており,引用発明は,仮定ではなく実態ある物として把握できる。

また,核酸とカチオン性ペプチドの複合体を用いることにより,トランスフェクションできることは周知技術であり(乙4,8,9),しかも,引用例1の実施例で用いられている緑色蛍光タンパク質(GFP)は,トランスフェクションによる遺伝子発現を観察するためによく用いられるレポータータンパク質であるから,たとえ引用例1に実験的証拠がないとしても,当業者は,引用例1の複合体が形質転換可能なものであることは,十分に理解できる。

したがって,原告の上記主張は理由がない。

イ 原告は,引用例1の記載から配列番号29のペプチドを選択することは困難というほかないから,これに基づいて引用発明を認定することはできない旨主張する。

しかしながら,進歩性の判断は,従来技術における本願発明に最も近似する発明(主たる引用発明)から出発して,これに主たる引用発明以外の引用発明及び技術常識等を総合的に考慮して,当業者において,当該発明における,主たる引用発明と相違する構成に到達することが容易であったか否かによって判断するのが客観的かつ合理的な手法とされているとこ

ろ、本件審決は、進歩性判断の出発点となる引用発明として、「P o r t - 3 (H I V T a t : G R K K R R Q R R R P P Q ; S E Q I D N O : 2 9) カチオン性ペプチドと緑色蛍光タンパク質をコードするRNAの非共有結合複合体であって、P o r t カチオン性ペプチドとRNAの複合比は、1 0 0 : 1 ~ 1 : 1 の範囲である複合体」という、本願補正発明に最も近似する発明を認定したものである。

したがって、原告の上記主張は理由がない。

(2) 取消事由2に対し

原告は、「免疫活性化」は、免疫反応を活性化する生得（抗原非依存性）の効果を指すために一般的に広く用いられる語であり、本願発明における「免疫活性化複合化一本鎖RNA」は、複合化一本鎖RNAがそれ自体で身体に対して非特異的な免疫活性効果を有するものであるのに対し、引用例1には、細胞をトランスフェクションするためにカチオン性ペプチドを用いること、及びトランスフェクトされるRNA又はmRNAから細胞質基質において翻訳されたタンパク質抗原が抗原提示細胞上に提示され、これにより免疫反応を引き起こすこと、すなわち従来から知られている抗原特異的な免疫応答が開示されているにとどまるから、本願補正発明に係る免疫活性化複合化一本鎖RNAと、引用例1に開示されている複合体とでは、免疫を誘導するための機構が全く異なり、当業者が引用例1に基づき本願補正発明の相違点(1)に係る構成を容易に想到し得たものということとはできない旨主張する。

しかしながら、本願の特許請求の範囲の請求項1には、「免疫活性化」を「非特異的免疫応答（抗原非依存性）」の誘導のみに限定する記載は存在しない。

また、「免疫活性化」という用語は、「免疫反応を活性化する」ことを意味し、ここで「免疫反応」とは、「免疫現象に関係のある物質や細胞の生体内および生体外での反応の総体。免疫応答、抗原と抗体や補体との反応、免

疫応答によって生じた機能細胞と抗原との反応など。」（乙3）を意味するから、「免疫活性化」という用語は、細胞に形質転換で導入された核酸にコードされた抗原が発現することにより誘発されるもの、つまり、「抗原特異的免疫応答」の活性化も含むものであるとするのが通常の解釈である。

さらに、本願の特許請求の範囲の請求項10の記載に照らすと、本願補正発明の複合化一本鎖RNAのRNAは、腫瘍抗原をコードするmRNAなどを包含し、本願補正発明の「免疫活性化」が、「抗原特異的免疫応答」による「免疫活性化」を包含することは明らかである。

加えて、本願明細書段落【0092】、【0176】及び【0192】の記載に照らしても、本願補正発明の複合化一本鎖RNAは、「抗原特異的免疫応答」の活性化にも使用し得ることが明らかである。

なお、原告は、「免疫活性化」という表現は、免疫反応を活性化する、生得（抗原非依存性）の効果を指すために一般的に広く使用される旨主張するが、その根拠は何ら示されていない。

したがって、原告の本願発明の免疫活性化複合化一本鎖RNAと引用発明の複合体とでは、免疫系の根本的な免疫学的作用機序の観点から全く異なるとの主張は理由がなく、この主張を前提とする、引用例1から相違点(1)に係る構成を容易に想到することはできないとの主張も理由がない。

(3) 取消事由3に対し

ア N/P比について

(ア) 原告は、引用発明の緑色蛍光タンパク質のmRNAの塩基数が700塩基程度であることが本願優先日当時の技術常識であるとの本件審決の認定は誤りであり、引用例1に基づいて導き出せる事項は、せいぜい、引用発明の緑色蛍光タンパク質のmRNAの長さは、確実に700塩基より極めて大きいであろうということだけにすぎないから、このように緑色蛍光タンパク質をコードするmRNAの長さを特定する記載すらな

い引用例1の開示事項から、本願発明の相違点(2)のN/P比に係る構成が示唆されることはない旨主張する。

しかしながら、本件審決は、引用発明の複合体のN/P比を最適化し、0.5～50の範囲内とすることは当業者が適宜行うことであるとの判断をしているから、原告が誤りであると主張する点は本件審決の結論には影響しない。

また、核酸を細胞にトランスフェクションする際、核酸をカチオン性ポリマーとの複合体とすること、及び、そのN/P比については、本願優先日前にすでに多数の文献(乙5ないし7)に記載されていたほか、核酸とカチオン性ペプチドとの複合体のN/P比として、0.5～50の範囲内の数値である、例えば2～3程度の数値が、トランスフェクション効率の点で好ましいことが本願優先日前の周知事項であった(乙4, 8, 9)。上記のような周知事項を考慮すれば、引用発明の複合体において、緑色蛍光タンパク質をコードするRNAに代えて、腫瘍細胞や病原体由来のmRNAを用いる際においても、トランスフェクション効率を高めるために、N/P比を最適化し、0.5～50の範囲内の数値とすることは、当業者であれば容易になし得ることである。

したがって、原告の上記主張は理由がない。

(イ) 原告は、引用発明と本願補正発明とでは、解決しようとする課題が異なり、得られる効果も異質であることを理由として、引用発明に基づく本願補正発明の進歩性を判断するに際して、臨界的意義は不要であると主張するが、前記(2)と同様の理由により、原告の上記主張はその前提を欠き理由がない。

イ モル比について

(ア) 原告は、引用例1において、ペプチド：RNA複合体比が100：1～1：1の範囲にあることを明確に記載しているから、引用発明の複

合体のRNA：ペプチドのモル比を1：250以上とすることは容易ではない旨主張する。

しかしながら、引用例1（甲3の24頁1～5行、甲3の訳文である乙1の23頁14～20行）には、「RNAの長さ、配列、及び、それらの濃度がカチオン性ペプチドとRNAの比を決定するための関連要因である。効率的な複合体形成や導入のために比や濃度を最適化することは当業者にとって容易である。」という記載に続けて、「好ましい比は、RNA分子に対してカチオン性ペプチドが1－100」と記載していることから、当業者であれば、複合体のRNA：ペプチドのモル比を決定するにあたり、より優先されるべき事項は効率的な複合体形成や導入のための最適化であり、「RNA分子に対してカチオン性ペプチドが1－100」は単なる一例として記載されており、この範囲に限定されないと理解する。

したがって、原告の上記主張は理由がない。

(イ) 原告は、引用例1は本願発明のN/P比の範囲に入るようなモル比を選択するための具体的な教示をしていない旨主張する。

しかしながら、特定のカチオン性ペプチドと特定の核酸の複合体において、N/P比は、複合体を構成するカチオン性ペプチドと核酸との分子数の比、つまり両者のモル比に比例することになる。したがって、N/P比を最適化しようと思えば、必然的にモル比も最適化されることになる（なお、原告も平成27年5月22日付け原告第2準備書面第2(2)において、N/P比がペプチド対RNAのモル比に関連することを認めている。）。

したがって、引用発明におけるPort-3カチオン性ペプチドと緑色蛍光タンパク質をコードするRNAの非共有結合複合体において、緑色蛍光タンパク質をコードするRNAに代えて、腫瘍細胞や病原体由来

の特定のmRNAを用いる際、前記ア(ア)のとおり、トランスフェクション効率を高めるためにN/P比を最適化することが当業者であれば容易になし得ることである以上、それに伴って必然的に行われるペプチド対RNAのモル比の最適化も容易というべきである。

そして、核酸とカチオン性ペプチドとの複合体のN/P比として、例えば2～3程度の数値が、トランスフェクション効率の点で好ましいことが本願優先日前の周知事項であったところ、引用発明のPort-3カチオン性ペプチドは、塩基性アミノ酸を8個含むためカチオン性ペプチド1分子当たりの塩基性アミノ酸の側鎖のNの数は8個であることが特定される。そして、引用発明の複合体において、緑色蛍光タンパク質に代えて、引用例1に示された腫瘍抗原の代表的なもの、例えば、メラノーマ細胞由来の抗原であるgp100、MART-1や、乳癌細胞由来の抗原であるMUC-1などのmRNAに相補的なcDNAは、いずれも1000塩基以上であるから、これらのRNAも1000塩基以上となる(乙10ないし12)。そこで、引用発明の複合体において、緑色蛍光タンパク質に代えて、引用例1に示された腫瘍抗原の代表的なもののmRNAを用いる際、N/P比を2～3程度に最適化しようとするれば、RNA：ペプチドのモル比は1：250以上に最適化される。

また、当業者であれば、核酸1分子当たりのリン酸基のPの数が大きくなるほど、つまりはRNAの長さが長くなるほど、RNAに対するペプチドのモル比も比例して大きくなることが理解できるところ、前記(ア)のとおり、当業者ならば、引用発明において複合体のRNA：ペプチドのモル比を決定するにあたり、より優先されるべき事項は効率的な複合体形成や導入であると理解するはずであるから、例えば、RNAの長さが1000以上と長い場合には、「RNA分子に対してカチオン性ペプチドが1-100」との単なる一例の記載に拘泥することなく、RNA

に対するペプチドのモル比を上記のとおり、1 : 250以上に最適化することに困難性はない。

(ウ) 原告は、RNAに対するペプチドのモル比が250以上（かつ、本願の特許請求の範囲の請求項1に特定するN/P比）である重いRNA複合体は、コードされた抗原を発現するためのRNAを翻訳するリボソームに到達できないことは技術常識であるから、当業者は、引用発明において、RNAに対するペプチドのモル比を250以上（かつ、本願の特許請求の範囲の請求項1に特定するN/P比）とはしない旨主張する。

しかしながら、重い複合体であってもリボソームに到達することは、従来から知られており（乙4, 8, 9）、複合体が重いからといって、リボソームに到達できないとはいえないし、そもそも、原告が主張するような技術常識は存在せず、現に、原告は、この点を裏付ける根拠を何ら示していない。

また、本願明細書の実施例4及び図8において、ルシフェラーゼmRNAのノナアルギニン（(Arg)₉）に媒介されるトランスフェクションにおけるルシフェラーゼの発現が示されており、RNAに対するペプチドのモル比が250以上（かつ、本願の特許請求の範囲の請求項1に特定するN/P比）であるような重いRNA複合体であっても、リボソームに到達することは、本願明細書自体に示されている。

したがって、原告の上記主張は理由がない。

(エ) 原告は、本願明細書の図7、実施例8、図10、図11、実施例11、図21及び図22を根拠として、複合体のRNA：ペプチドのモル比を1 : 250以上とすることは、非特異的免疫応答（抗原非依存性）の誘導という点において、臨界的意義を有する旨主張する。

しかしながら、本願補正発明における一本鎖RNAは、本願の特許請求の範囲の請求項1において長さや配列が限定されておらず、本願明細

書の段落【0047】，【0048】に記載されているように，5～20000という広範囲のヌクレオチドの長さのものを含む任意のRNAであるから，本願明細書の図7，21，22に，ある特定の複合体のRNA：ペプチドのモル比を1：250以上とすることで原告が主張するような効果があることの記載があるからといって，本願発明全体が上記と同様な効果を奏することが示されているとはいえない。また，RNAの長さは，RNAに対するペプチドのモル比に大きく影響を与えるものであるから，このようなRNAの長さが特定されない本願補正発明において，「RNAに対するペプチドのモル比が，1：250以上」との発明特定事項には，技術的意義は認められない。

なお，本願明細書の実施例8，図10及び11で用いられた免疫活性化複合化一本鎖RNAは，本願補正発明の構成とは異なるものであるから，これらを根拠に本願補正発明の効果を主張することはできない。

したがって，原告の上記主張は理由がない。

第4 当裁判所の判断

1 本願補正発明について

- (1) 本件補正後の本願の特許請求の範囲の請求項1の記載は前記第2の2(2)であるところ，本願明細書(甲1)の発明の詳細な説明には，概ね以下の記載がある(下記記載中に引用する図面のうち，図7，8，10，11，21，22については別紙明細書図面を参照)。

ア 【0001】

本発明は，8～15アミノ酸の長さであり，かつ式(A r g)₁(L y s)_m(H i s)_n(O r n)_o(X a a)_xによって表わされる1つ以上のオリゴペプチドと複合体を形成するRNA(分子)を少なくとも1つ含む複合化RNAに関する。さらに，本発明は，上記本発明の複合化RNAを利用することによって，細胞または生体をトランスフェクトする方法に関

する。また、本発明の開示内容には、上記本発明の複合化RNAを包含する薬学的組成物およびキット、ならびに、細胞、組織または生体をトランスフェクトするための上記本発明の複合化RNAの使用、および／または免疫反応を調節、好ましくは免疫反応を誘引または亢進するための上記本発明の複合化RNAの使用を含む。

【0002】

遺伝子を導入する方法によって患者の細胞または組織に核酸をトランスフェクトすることは、分子医学の主要な方法であって、多数の疾病の治療および予防において重要な役割を果たす。核酸のトランスフェクト方法が、組織または生体の免疫刺激を起こすことがある。あるいは、もしくは、さらに、核酸のトランスフェクションに続いて、導入された核酸によりコードされる情報のプロセッシング、つまり所望のポリペプチドまたはタンパク質への翻訳が起こることがある。核酸としてのDNAまたはRNAは、遺伝子治療に代わるアプローチとなる。核酸のトランスフェクションにより、トランスフェクトされた核酸のタイプに依存して、調節、例えば遺伝子発現の抑制または促進が起こることもある。これらの核酸のトランスフェクションは、通常、遺伝子を導入する方法を使って実施される。

【0008】

タンパク質形質導入ドメイン（PTD）は、細胞膜を貫通する能力を有し、それゆえに（マクロ）分子の細胞内への輸送を実現するので、「細胞貫通ペプチド」（…；CPP）とも呼ばれることがある。CPPは低分子ペプチドであって、通常塩基性アミノ酸の含有量が多く、7～30個のアミノ酸の長さを有する。CPPを介して細胞内へ輸送される上述のマクロ分子としては、DNA、siRNA、またはPNA（ペプチド核酸）およびペプチドがあげられ、上記CPPは通常共有結合を介してこれらのマクロ分子に結合しており、細胞にトランスフェクトされる。細胞貫通ペプチ

ド (CPP) は、薬理的な関心の高い多様な分子の細胞内輸送を、*in vitro* および *in vivo* 双方で媒介するために使用され、成果をおさめている。ただし、細胞への取り込みが生じるメカニズムは依然不明である。CPP類は多種多様であり…またはカチオン性かつ親水性のアルギニンリッチ・ペプチド類などからなる。…CPP類が細胞内へ取り込まれる一般的なメカニズムは不明なままであるが、ポリアルギニンの場合の取り込みメカニズムとしてエンドサイトーシスが提案されている。エンドサイトーシスとは、マクロ分子が細胞膜を通過せずに細胞に入る細胞プロセスであり、…。いかなる理論に縛られるわけではないが、エンドサイトーシス中、CPPによって複合化されたマクロ分子は、まず、ヘパラン (HS) を含めた、負に帯電した細胞表面のグリコサミノグリカン (glycosaminoglycan; GAG) に結合する。そして、…エンドサイトーシスによって、例えば細胞外で細胞膜を上記CPP結合マクロ分子を包むように折り畳むことによって、上記CPP結合マクロ分子が細胞内に入る。この結果、CPP結合マクロ分子が中に組み込まれた袋状の小胞が形成される。後期エンドゾームおよび/またはゴルジ体および/または小胞体 (ER) を介するCPP結合マクロ分子の輸送によって、CPP結合マクロ分子が細胞質内へ運搬される。この段階で、CPPが誘引した一過的な孔が脂質二重層に開くことがある。あるいは、CPPによって複合化されたマクロ分子が細胞内の他の場所へ、例えば特定の目的に要求される作用様式によっては、エンドゾーム内へ輸送されることもある。一例としてTLR-7受容体およびTLR-8受容体はエンドゾーム中に位置している。したがって、免疫活性化RNAを細胞にトランスフェクトするとエンドゾームへ輸送され、例えば (具体的な相互作用およびその相互作用のパートナーによっては) 下記のRNAリガンドによって免疫活性化される。なお、上記免疫活性化RNAは、例えば、TLR1からTLR13 (トー

ル様受容体：TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11, TLR12, またはTLR13) のリガンドから選択されたToll (トール) 様受容体 (Toll-like receptor; TLR) のリガンドである。

【0009】

上記において定義された細胞貫通ペプチド (CPP) は当該技術分野において周知であり、広く議論されている。ただし、ペプチド、タンパク質、およびDNAを積荷として輸送するために、これらのCPPを (キャリアとして) 使用することは確立されており、上記CPPは通常共有結合で積荷分子に連結されている。一方、CPPを使った細胞内部へのRNA輸送は、非常に限られた事例数しか報告されておらず、特に低分子RNA配列、例えば二本鎖siRNA配列に限定されている。

【0017】

さらに、細胞へのトランスフェクションは、CPPをRNAと組み合わせて使用することによって実施してもよい。ただし、RNAの細胞への輸送については、実施例がほんのわずかな件数しか実施されていない。その原因は、RNAの劣化が速いことと、複合体の安定性が低いことにあると考えられる。したがって、CPPを使ったRNAのトランスフェクションは、比較的安定している二本鎖RNA、例えばsiRNAに限定されるようである。一例をあげると、Toenges et al. (RNA (2006), 12:1431~1438) は、siRNAと複合体を形成するステアリル化された8-アルギニン (Arg)₈を、低分子二本鎖siRNAを海馬の神経細胞へ*in vitro*導入するために使用した。Toenges et al. (2006, 前掲) の結果によれば、siRNAの輸送またはその他のRNA分子の輸送には、キャリアペプチドの

ステアリル成分が必須であるように思われる。

【0019】

以上を要約すれば、マクロ分子を細胞内へ輸送することを目的としたC P Pまたはその他のキャリアペプチドの使用に関する基本的な事項を、ペプチドおよびDNA分子の場合について示した。二本鎖s i RNAの細胞貫通特性を開示した具体的な報告はほとんどない。

【0020】

RNA導入は現代の分子医学では重要な道具である。また、DNA分子は重大な問題を起こす可能性があるため、DNA細胞トランスフェクションと比較して優れた性質を示す。例えば、DNA分子を適用すると、そのDNAが宿主ゲノムに組み込まれる危険性がある。…逆に、これらの危険性は、DNAの代わりにRNA、特にmRNAを使用すれば発生しない。例えば、mRNAは宿主ゲノムに組み込まれない。また、転写の実行にはプロモーターなどのウイルス性配列が一切不要である。RNAの使用によって生じる欠点があるとすれば、DNAに比較して不安定であることがその原因となるかもしれない…。

イ **【0021】**

RNA分子自身は、上述のようにDNAに比べて有利な特性を有するので、本発明の目的は、細胞内へのRNA輸送に適しており、かつ効率的なキャリアを提供することである。したがって、本発明は、効率的な細胞内へのRNAトランスフェクションを可能にする溶液を提供する。

【0023】

本発明の文脈において、複合化RNAとは、本発明において定義するように、実験式 $(A r g)_1; (L y s)_m; (H i s)_n; (O r n)_o; (X a a)_x$ によって表わされる1つ以上のオリゴペプチドでもって、RNAとオリゴペプチドとの間で非共有複合体を形成することによって複合化

された，RNA（分子），好ましくはmRNAであると理解すべきである。ここで，“非共有的”とは，RNAとオリゴペプチドとが，これらの分子の非共有的な相互作用によって可逆的に連結しており，上記分子は共有結合以外の任意のタイプの電子相互作用によって，例えばファンデルワールス結合（つまり，上記複合化分子の不特定な引力から発生する弱い静電性の引きつけあい）によって，互いに連結していることを意味している。RNAと少なくとも1つのオリゴペプチドとの連結は，複合体の解離平衡状態にある。細胞内については，理論に縛られるわけではないが，RNAとオリゴペプチドとが解離した状態の方で平衡であるように思われる。

ウ 【0037】

別の好適な実施形態によれば，本発明の複合化RNAのオリゴペプチドは，上述の実験式 $(A r g)_1 ; (L y s)_m ; (H i s)_n ; (O r n)_o ; (X a a)_x$ によって表わされ，一般式 $A r g_9 (R 9$ とも称される)， $A r g_9 H i s_3 (R 9 H 3$ とも称される)， $H i s_3 A r g_9 H i s_3 (H 3 R 9 H 3$ とも称される)， $T y r S e r S e r A r g_9 S e r S e r T y r (Y S S R 9 S S Y$ とも称される)， $H i s_3 A r g_9 S e r S e r T y r (H 3 R 9 S S Y$ とも称される)， $(A r g L y s H i s)_4 ((R K H) 4$ とも称される)， $T y r (A r g L y s H i s)_2 A r g (Y (R K H) 2 R$ とも称される) からなる小群より選択される。一層好ましくは，これらの一般式は以下のように定義される。すなわち，

$A r g_9 : A r g - A r g - A r g - A r g - A r g - A r g - A r g - A r g - A r g - A r g$ (配列番号2)

$A r g_9 H i s_3 : A r g - A r g - A r g - A r g - A r g - A r g - A r g - A r g - A r g - A r g - H i s - H i s - H i s$ (配列番号39) …

エ 【0047】

本発明の複合化RNAの少なくとも1つのRNA（分子）は，（好まし

くは、本発明に係る複合化RNAとして適用されるRNAのタイプに依存して) 任意の長さを有していてもよい。上記少なくとも1つのRNA (分子) は、トランスフェクトされるRNAのタイプに応じて、5~20000ヌクレオチドの長さ、さらに好ましくは5~10000ヌクレオチドの長さ、または300~10000ヌクレオチドの長さ、一層好ましくは5~5000ヌクレオチドの長さ、最も好ましくは20~5000ヌクレオチドの長さ、50~5000ヌクレオチドの長さ、100~5000ヌクレオチドの長さ、または300~10000ヌクレオチドの長さであってもよいが、これに限定されるものではない(下記の開示を参照)。

【0048】

本発明の複合化RNAの少なくとも1つのRNA (分子) は、任意のRNAであってもよく、好ましくは、低分子RNAオリゴヌクレオチド(好適な長さは5~80、さらに好ましくは20~80ヌクレオチド)、コーディングRNA、免疫活性化RNA、siRNA、アンチセンスRNA、またはリボスイッチ、リボザイム、またはアプタマーである。ただしこれに限定されるものではない。さらに、本発明の複合化RNAの少なくとも1つのRNA (分子) は、一本鎖RNAまたは二本鎖RNA(後者は2本の一本鎖RNA(複数分子)が非共有的に連結しているのであるから、一種のRNA(単一分子)であるともみなすことができる)であってもよいし、あるいは、部分的な二本鎖RNA(これは通常、長めの一本鎖RNA分子と比較的低分子の一本鎖RNA分子とによって形成されるか、あるいは、長さがほぼ等しく、一方の一本鎖RNA分子がもう一方の一本鎖RNA分子に対して部分的に相補的であり、それゆえ両者がこの領域において二本鎖RNA分子を形成する2本の一本鎖RNA分子によって形成される)であってもよい。好ましくは、本発明の複合化RNAの少なくとも1つのRNA (分子) は、一本鎖RNAである。本発明の複合化RNAの少

なくとも1つのRNA（分子）は、さらに、環状RNAまたは直鎖RNAであってもよく、好ましくは直鎖RNAである。さらに好ましくは、本発明の複合化RNAの少なくとも1つのRNA（分子）は、（直鎖）一本鎖RNAである。本発明の複合化RNAの少なくとも1つのRNA（分子）は、リボゾームRNA（rRNA）、トランスファーRNA（tRNA）、メッセンジャーRNA（mRNA）、またはウイルスRNA（vRNA）、好ましくはmRNAである。本発明では、これらのRNAのどれが細胞にトランスフェクトされてもよい。本発明において、mRNAは通常いくつかの構造的要素からなるRNAであり、例えば、必要に応じて5' - UTR領域が存在し、この上流にリボゾーム結合部位が配置され、さらにコード領域と、必要に応じて3' - UTR領域とが続き、さらにポリA尾部（および／またはポリC尾部）が続く。mRNAは、モノシストロン性RNA、ジシストロン性RNA、さらに多シストロン性RNAとして、つまり、1つ、2つ、またはそれ以上の個数のタンパク質のコード配列を担持するRNAとして発現してもよい。ジシストロン性mRNAまたは多シストロン性mRNA中のこのようなコード配列は、例えばここで定義されるように、少なくとも1つのIRES配列によって離間している。

【0049】

低分子RNAオリゴヌクレオチド

第1の実施形態において、本発明の複合化RNAの少なくとも1つのRNA（分子）は低分子RNAオリゴヌクレオチドであってもよい。本発明において、低分子RNAオリゴヌクレオチドは、上記において定義された任意のRNAを備えていてもよい。上記低分子RNAオリゴヌクレオチドは、好ましくは一本鎖または二本鎖RNAオリゴヌクレオチドであり、さらに好ましくは一本鎖RNAオリゴヌクレオチドである。上記低分子RNAオリゴヌクレオチドは、一層好ましくは、直鎖一本鎖RNAオリゴヌク

レオチドである。

【0050】

好ましくは、ここで使用される上記低分子RNAオリゴヌクレオチドは、一般にRNA分子に対して上記において定義された長さを有し、さらに好ましくは、5～100、5～50、または5、30ヌクレオチドの長さ、あるいは、20～100、20～80、一層好ましくは20、60ヌクレオチドの長さである。低分子RNAオリゴヌクレオチドは、各種目的のために、例えば、（非特異的）免疫活性化、遺伝子の転写／翻訳の低減／抑制のために使用されてもよい。

【0051】

コーディングRNA

第2の実施形態において、本発明の複合化RNAの少なくとも1つのRNA（分子）は、コーディングRNAであってもよい。本発明の複合化RNAのコーディングRNAは、上記において定義された任意のRNAであってもよい。上記コーディングRNAは、好ましくは一本鎖RNAまたは二本鎖RNAであり、さらに好ましくは一本鎖RNA、および／または環状RNAまたは直鎖RNA、さらに好ましくは直鎖RNAである。上記コーディングRNAは、一層好ましくは（直鎖）一本鎖RNAである。上記コーディングRNAは、最も好ましくは（（直鎖）一本鎖）メッセンジャーRNA（mRNA）である。

【0052】

上記コーディングRNAは、さらに、タンパク質またはペプチドをコードしていてもよい。ただし、上記タンパク質またはペプチドは、例えば、治療上有効なタンパク質またはペプチド、腫瘍抗原、抗体、免疫活性化タンパク質またはペプチドなどから選択されたもの、もしくは特定の（治療目的の）用途に適した任意の他のタンパク質またはペプチドから選択され

たものであって、タンパク質をコードする上記少なくとも1つのRNA(分子)が細胞、組織、または生体に輸送され、それに続いてこの細胞、組織、または生体中でタンパク質が発現するものである(ただしこれに限定されるものではない)。

オ 【0057】

本発明において定義される複合化RNAの少なくとも1つのRNA(分子)によってコードされた治療上有効なタンパク質は、さらに、中心的な役割を果たす細胞内プロセス(例えばアポトーシス、細胞成長など)に対して、特に生体の免疫系に関連して影響を与え得るシグナル伝達の調節(抑制または活性化)などを通じて各種細胞内経路を調節する、タンパク質から選択されてもよい。これにより、例えばサイトカイン、リンフォカイン、モノカイン、インターフェロンなどの免疫調節物質が、本発明において定義される複合化RNAによって効率よく発現する。…

【0058】

また、本発明において定義される複合化RNAの少なくとも1つのRNA(分子)によってコードされた治療上有効なタンパク質は、さらに、抗原特異的T細胞受容体をコードしていてもよい。T細胞受容体、すなわちTCR(T cell receptor)とは、一般に、主要組織適合性複合体(major histocompatibility complex; MHC)分子に結合した抗原を認識する役目を担う、Tリンパ球(またはT細胞)の表面上で見られる分子である。T細胞受容体は、T細胞の95%においては α 鎖および β 鎖からなるヘテロ二量体であり、一方、T細胞の5%は γ 鎖および δ 鎖からなるTCRを有する。TCRが抗原およびMHCと結合すると、関連する酵素、共受容体、および固有アクセサリ分子によって媒介される一連の生化学的現象を介して、該TCRのTリンパ球が賦活化される。したがって、これらのタンパク質は、特定

の抗原を特異的に標的とすることを可能にし、その標的指向性によって免疫系の機能性を支援する。したがって、これらの受容体をコードしている、本発明において定義される複合化RNAの少なくとも1つのRNA(分子)を投与することによって、*in vivo*で細胞にトランスフェクトする手法、または、好ましくは、*ex vivo*で細胞にトランスフェクトする(例えば、ある免疫細胞を特異的にトランスフェクトする)手法の採用を検討する。導入されたT細胞受容体分子はMHC分子上の特定の抗原を認識し、これにより攻撃すべき抗原に対する免疫系の認識を支援する。

【0059】

本発明において定義される複合化RNAの少なくとも1つのRNA(分子)によってコードされた治療上有効なタンパク質は、さらに、アジュバントタンパク質を含んでいてもよい。この文脈において、アジュバントタンパク質は、好ましくは、本発明において定義される生来の免疫反応を誘発できる任意のタンパク質であると理解すべきである。好ましくは、この生来の免疫反応には、パターン認識受容体の賦活化が含まれ、パターン認識受容体としては、例えば、ヒトのトール様受容体TLR1~TLR10またはマウスのトール様受容体TLR1~TLR13から選択されたトール様受容体を含む、トール様受容体(Toll-like receptor; TLR)ファミリーから選択された受容体があげられる。好ましくは、生来の免疫反応が哺乳類において、さらに好ましくはヒトにおいて誘発される。好ましくは、上記アジュバントタンパク質は、ヒトアジュバントタンパク質または病原性アジュバントタンパク質、特に細菌性アジュバントタンパク質から選択される。さらに、アジュバント効果に関与するヒトタンパク質をコードするmRNAが共に使用されてもよい。

【0060】

ヒトアジュバントタンパク質は、本発明において定義される複合化RN

Aの少なくとも1つのRNA（分子）によってコードされていてもよく、通常、生来の免疫反応、例えば、外因性TLRリガンドがTLRに結合する反応を（哺乳類において）誘発できる任意のヒトタンパク質を含む。さらに好ましくは、本発明の複合化RNAによってコードされたヒトアジュバントタンパク質は、以下に列挙するものからなる群より選択される（ただしこれに限定されるものではない）。すなわち、IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, CCL21, GM-CSF, およびTNF α を含む、生来の免疫反応を誘引または亢進するサイトカイン；IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, およびTNF α を含む、マクロファージから放出されるサイトカイン；C1q…を含む補体系の成分；TLRおよびIL-1R1を含む、上記パターン認識受容体のシグナル伝達ネットワークの成分であるタンパク質…；IL-1RI, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, およびTLR11を含む受容体；…である。

【0061】

病原性アジュバントタンパク質は、本発明において定義される複合化RNAの少なくとも1つのRNA（分子）によってコードされていてもよく、通常、生来の免疫反応を（哺乳類において）誘発することが可能な任意の病原性（アジュバント）タンパク質を含む。さらに好ましくは、上記病原性アジュバントタンパク質は、細菌、原虫、ウイルス、または菌類、動物などに由来する病原性（アジュバント）タンパク質から選択され、一層好ましくは、細菌性タンパク質、原虫タンパク質（例えば、トキソプラズマ原虫のプロフィリン様タンパク質）、ウイルス性タンパク質、または真菌タンパク質、動物タンパク質などからなる群（ただしこれに限定されるものではない）より選択される病原性アジュバントタンパク質から選択される。

カ 【0070】

他の構成としては、本発明の複合化RNAの少なくとも1つのRNA(分子)は、抗原をコードしていてもよい。本発明では「抗原」という用語は、免疫系によって認識され、例えば抗体を形成することによって抗原特異的な免疫応答を誘発できる物質を指す。抗原はその起源によって分類できる。この分類によれば、抗原には、外因性抗原と内因性抗原の2つの主なクラスがある。外因性抗原は、例えば、吸入、摂取、または注射などによって(細胞または身体の)外部から細胞または身体に入る抗原である。これらの抗原は、抗原提示細胞(antigen-presenting cell; “APC”, 例えば樹状細胞またはマクロファージ)によって内在化され、処理されて断片を形成する。そしてAPCは、その表面上においてMHC II分子を使用することによって、ヘルパーT細胞(例えばCD4⁺)に断片を提示する。これらの抗原断片がT細胞によって認識されると、T細胞が活性化され、サイトカインが分泌される。サイトカインとは、免疫細胞、例えば細胞傷害性T細胞、B細胞、またはマクロファージの増殖を賦活する物質である。一方、内因性抗原とは、例えば正常な細胞の代謝の結果として細胞内部で生成された抗原である。これらの抗原の断片がAPCの表面上のMHC II分子に提示される。これらの抗原は、賦活化された抗原特異的な細胞傷害性CD8⁺T細胞によって認識される。認識後、上記T細胞は、抗原提示細胞の溶解またはアポトーシスを引き起こす異なる毒素を分泌しながら反応する。内因性抗原としては、抗原、例えば、その細胞自身の遺伝子情報によってコードされたタンパク質またはペプチドだけではなく、細胞内部の外来性核酸によってコードされたタンパク質またはペプチドをも含み、さらに、細胞内で発生するウイルス起源の抗原をも含む。内因性抗原の分類の1つが、腫瘍抗原の分類である。これらの抗原は、腫瘍細胞の表面上のMHC II分子によって提示される。

この分類は、さらに、腫瘍特異的抗原 (tumor-specific antigen; TSAs) と腫瘍関連抗原 (tumor-associated antigen; TAA) とに分類され得る。TSAは腫瘍細胞によってのみ提示され、正常で“健康な”細胞によって提示されることは決してない。TSAは通常、腫瘍特異的な変異の結果生じる。TAAは、TSAより一般的に見られ、通常、腫瘍細胞と健康な細胞の双方によって提示される。これらの抗原は認識され、抗原提示細胞は細胞傷害性T細胞によって破壊され得る。また、腫瘍抗原は、腫瘍の表面上においても、例えば変異型受容体の形態で発生可能である。この場合、腫瘍抗原は抗体によって認識され得る。

【0073】

抗原は、本発明の複合化RNAの少なくとも1つのRNA (分子) によってコードされていてもよく、典型的には、例えば特定の目的に適した任意の抗原 (例えば本発明において定義される例えば特定の感染性疾病に関連した (または該感染性疾病を引き起こす) 抗原)、癌抗原 (例えば腫瘍特異的な表面抗原)、癌疾患において発現する抗原、癌疾患において発現する変異抗原、または、その他の疾病 (例えば自己免疫疾患、アレルギーなど) の原因に関わるタンパク質抗原から選択されてもよいが、これに限定されるものではない。例えば、患者にアレルギーまたは自己免疫性状態を引き起こす抗原を投与することによって患者を脱感作するために、これらの抗原を使用してもよい。

キ 【0092】

免疫活性化RNA

第3の実施形態によれば、本発明の複合化RNAの少なくとも1つのRNA (分子) は、免疫活性化RNAであってもよい。こうすることによって、免疫活性化RNAは、上記において定義された式 (I) (判決注 式

(A r g)₁; (L y s)_m; (H i s)_n; (O r n)_o; (X a a)_x
のこと【0034】)によって表わされる本発明のオリゴペプチドでRNAを複合化する以前に、すでに免疫活性効果を示す。または、さらに好ましくは、ここで使用される上記RNAの免疫活性効果は、上記において定義された式(I)によって表わされる本発明のオリゴペプチドでRNAを複合化することによって、亢進またはさらに誘引される。本発明の複合化RNAの免疫活性化RNAは、任意のRNA、例えば上記において定義されたコーディングRNAであってもよい。好ましくは、上記免疫活性化RNAは、一本鎖RNA、二本鎖RNA、または部分的二本鎖RNAであり、さらに好ましくは、一本鎖RNA、および/または環状RNAまたは直鎖RNA、さらに好ましくは直鎖RNAである。さらに好ましくは、上記免疫活性化RNAは、(直鎖)一本鎖RNAである。一層好ましくは、上記免疫活性化RNAは、((直鎖)一本鎖)メッセンジャーRNA(mRNA)である。免疫活性化RNAは、さらに、上記において定義された低分子RNAオリゴヌクレオチドとしても生じる。

【0093】

ここで使用される免疫活性化RNAは、さらに、天然にみられるか、または合成によって調整され、かつ免疫応答を誘引する任意のクラスのRNA分子から選択されてもよい。この文脈において、免疫応答は様々な仕組みで現れる。適切な免疫応答にとって大きな要素は、異なるT細胞小グループの活性化である。Tリンパ球は通常、ヘルパーT1(Th1)細胞とヘルパーT2(Th2)細胞の2つの小グループに分類され、免疫系はこの2つの小グループを使って、細胞内(Th1)病原体(例えば抗原)および細胞外(Th2)病原体(例えば抗原)を破壊できる。上記2つのTh細胞グループは、それぞれが生成するエフェクタータンパク質(サイトカイン)のパターンにおいて異なる。したがって、Th1細胞は、マクロ

ファージと細胞傷害性T細胞の賦活によって細胞性免疫応答を補助する。一方、Th2細胞は、B細胞を活性化して血漿細胞に転換すること、および（例えば抗原に対抗する）抗体を形成することによって、体液性免疫応答を促進する。したがって、免疫応答においてTh1/Th2比は非常に重要である。本発明の関連においては、免疫応答のTh1/Th2比は、好ましくは細胞性応答（Th1応答）側に向かってシフトして、その結果、細胞性免疫応答が誘引される。一例としては、免疫系はトール様受容体（TLR）のリガンドによって賦活される。TLRとは、病原体関連分子パターン（pathogen-associated molecular pattern; PAMP）を認識する、高度に保存的なパターン認識受容体（pattern recognition receptor; PRR）ポリペプチドのファミリーである。TLRは、さらに、哺乳類の先天的免疫において重要な役割を果たす。現在少なくとも13のファミリーメンバーが確認され、それぞれTLR1～TLR13（トール様受容体：TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11, TLR12, およびTLR13）と称されている。さらに、複数の特異的TLRリガンドが確認されている。例えば、非メチル化細菌性DNAおよびその合成類似体（CpG DNA）はTLR9のリガンドであることが見出されている…。さらに、あるTLRに対するリガンドが、ある核酸分子を含んでいること、およびあるタイプのRNAが、配列から独立してまたは配列に対して依存的に免疫活性を有していて、これらの各種免疫活性化RNAが例えばTLR3, TLR7, TLR8, または細胞内受容体（例えばRIG-I, MDA-5など）を活性化することも報告されている…。Lipford et al. に記載の免疫活性G, U含有オリゴヌクレオチドは、リボゾームRNA, トランスファーRNA, メッセンジャーRNA,

およびウイルスRNAを含むRNA由来のものであると考えられる。

【0094】

本発明によれば、例えば、実験式 $(\text{A r g})_1; (\text{L y s})_m; (\text{H i s})_n; (\text{O r n})_o; (\text{X a a})_x$ (式I) によって表わされるキャリアペプチドで複合化された、上記において定義された任意のRNA (分子) は、(具体的な長さ、一本鎖もしくは二本鎖の状態、修飾、および/またはヌクレオチド配列には無関係に) 免疫活性を有する、つまり免疫応答を亢進することが見出された。それゆえ、実験式 $(\text{A r g})_1; (\text{L y s})_m; (\text{H i s})_n; (\text{O r n})_o; (\text{X a a})_x$ (式I) によって表わされるキャリアペプチドで複合化され、上記において定義されたRNAは、特定の治療に対して適しており、かつ、そうすることが望ましいのであれば、(非特異的) 免疫活性化を亢進するために使用できる。したがって、式(I) によって表わされるペプチドで任意のRNAを複合化することで免疫活性化効果を奏することは、本発明の複合化RNAが内在する特性であると言える。

【0095】

本発明の複合化RNAの少なくとも1つの(免疫活性) RNA (分子) は、それゆえ、TLRのリガンドを表わすおよび/またはTLRのリガンドをコードするRNA配列(ただしこれに限定されるものではない)を含む、免疫活性を有することが知られている任意のRNA配列を含んでいる。なお、前記TLRのリガンドは、好ましくはTLR1~TLR13からなるファミリーから選択され、さらに好ましくはTLR7およびTLR8、つまりRNA(例えばRIG-IまたはMAD-5など)またはその他の任意の免疫活性化RNA配列の細胞内受容体のリガンドから選択される…。さらに、免疫活性化RNAとして使用されるRNA分子(のクラス)は、免疫応答を誘発可能なその他の任意のRNAを含んでいてもよい。こ

のような免疫活性化RNAとしては、リボゾームRNA (rRNA)、トランスファーRNA (tRNA)、メッセンジャーRNA (mRNA)、およびウイルスRNA (vRNA) などがあげられるが、これに限定されるものではない。

【0098】

好ましくは、本発明の複合化RNAの少なくとも1つのRNA (分子) としてここで使用される免疫活性化RNA分子は、一般的に本発明の複合化RNAのRNA分子について上記において定義された長さを有し、さらに好ましくは5~5000、500~5000、さらに好ましくは1000~5000、あるいは5~1000、5~500、5~250、5~100、5~50、さらに好ましくは5~30ヌクレオチドの長さを有する。

ク **【0139】**

本発明に係わるRNA複合体の成分の質量比またはモル比とは、1つ以上のオリゴペプチドに対するRNA (一本鎖でも二本鎖でもよい) の質量比またはモル比の意味であり、通常、いかなる制限を受けるものではなく、特定の適用に対して適切なものが選ばれる。ただし、上記1つ以上のオリゴペプチドとRNAとの質量比またはモル比は、1:1未満、1:2未満、1:3未満、1:4未満、1:5未満、1:6未満、1:7未満、1:8未満、1:9未満、1:10未満、1:11未満、1:12未満、1:13未満、1:14未満、1:15未満、1:16未満、1:17未満、1:18未満、または1:20未満であってもよい。あるいは、上記1つ以上のオリゴペプチドとRNAとの質量比またはモル比は、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1、15:1、16:1、17:1、18:1、19:1、または20:1を超えてもよい。好ましくは、上記1つ以上のオリゴペプチドとRNAとの質量比またはモル比は、上記

1つ以上のオリゴペプチドの含有量に対して1：5以上でもよい。さらに好ましくは、上記1つ以上のオリゴペプチドとRNAとの（モル比または）質量比は1：5～20：1，さらに好ましくは1：3～15：1である。

【0140】

特定の好適な実施形態によれば、本発明に係るRNA複合体の成分の質量比、特に、上記1つ以上のオリゴペプチドに対する複合化RNAの少なくとも1つのRNA（分子）の質量比は、好ましくは約1：100～約1：0.5の範囲であり、さらに好ましくは約1：50～約1：1の値を有し、一層好ましくは、複合体におけるRNA：ペプチドの比に関して約1：100，約1：90，約1：80，約1：70，約1：60，約1：50，約1：45，約1：40，約1：35，約1：30，約1：25，約1：20，約1：15，約1：10，約1：5，約1：4，約1：3，約1：2，または約1：1，さらに約1：0.5に達する値を有する。なお、上記の具体的に示した値を2つ組み合わせることによって、任意の範囲を形成してもよい。最も好ましくは、上記1つ以上のオリゴペプチドに対する複合化RNAの少なくとも1つのRNA（分子）の質量比は、約1：50～約1：1の範囲であってもよい。

【0141】

同様に、本発明に係るRNA複合体の成分のモル比、特に、上記1つ以上のオリゴペプチドに対する複合化RNAの少なくとも1つのRNA（分子）のモル比は、好ましくは、特定の好適な実施形態によれば、約1：20000～約1：500の範囲であり、さらに1：250に達する値でもよく、さらに好ましくは約1：10000～約1：1000の範囲、一層好ましくは、複合体におけるRNA：ペプチドの比に関して約1：9500，約1：9000，約1：8500，約1：8000，約1：7500，約1：7000，約1：6500，約1：6000，約1：5500，約

1 : 5 0 0 0, 約 1 : 4 5 0 0, 約 1 : 4 0 0 0, 約 1 : 3 5 0 0, 約 1 : 3 0 0 0, 約 1 : 2 5 0 0, 約 1 : 2 0 0 0, 約 1 : 1 5 0 0, 約 1 : 1 0 0 0, 約 1 : 5 0 0, 約 1 : 4 5 0, 約 1 : 4 0 0, 約 1 : 3 5 0, 約 1 : 3 0 0, または約 1 : 2 5 0 の値を有する。なお, 上記の具体的に示した値を 2 つ組み合わせることによって, 任意の範囲を形成してもよい。最も好ましくは, 上記 1 つ以上のオリゴペプチドに対する複合化 RNA の少なくとも 1 つの RNA (分子) のモル比は, 約 1 : 1 0 0 0 0 ~ 約 1 : 1 0 0 0 の範囲である。免疫活性化のためには, 本発明に係わる RNA 複合体の成分のモル比は, 約 1 : 1 0 0 0 0 ~ 約 1 : 1 0 0 の範囲であってもよく, さらに, 約 1 : 1 0 0 0 0 ~ 約 1 : 5 0 0 に達する範囲であってもよい。

【 0 1 4 2 】

本発明の文脈において, 上記モル比および質量比は, 通常互いに関連しており, 各比は, 例えば RNA の長さやペプチドの長さなどの要素によって影響を受けることがある。ただし, 判定の際には質量比およびモル比を平均複合体サイズに対して算出してもよく, 約 1 : 5 0 ~ 1 : 1 の質量比が約 1 : 1 0 0 0 0 ~ 1 : 1 0 0 0 のモル比にほぼ対応する。モル比および質量比の代表的な例は, 実施例において示す。この代表的な値はさらに計算の際に使用してもかまわない。

【 0 1 4 3 】

さらに, 本発明に係る RNA 複合体の成分の比, 特に, 上記 1 つ以上のオリゴペプチドに対する複合化 RNA の少なくとも 1 つの RNA (分子) の比は, さらに, 全ての RNA 複合体の窒素 / リン酸塩比 (N / P 比) に基づいて算出されてもよい。例えば, 1 μ g の RNA は, RNA が塩基の統計的分布を示すと仮定すれば, 通常約 3 n m o l のリン酸塩残基を含有している。また, 1 μ g のペプチドは, 分子量および塩基性アミノ酸の個

数に依存して、通常約 $x \text{ nmol}$ の窒素残基を含有している。好適な一例として、 $(\text{Arg})_9$ (分子量 1424 g/mol , 窒素原子9個) の場合について算出すると、 $1 \mu\text{g}$ の $(\text{Arg})_9$ が約 700 pmol の $(\text{Arg})_9$ を含有し、それゆえ、 $700 \times 9 = 6300 \text{ pmol}$ の塩基性アミノ酸、つまり 6.3 nmol の窒素原子を含有する。質量比 $\text{RNA}/(\text{Arg})_9$ が約 $1:1$ の場合、 N/P 比の計算結果は約 2 になる。好適な一例として、質量比が約 $2:1$ であり、 $2 \mu\text{g}$ の RNA を含むプロタミン (分子量約 4250 g/mol , サケのプロタミンを使用した場合、窒素原子は 21 個) の場合について算出すると、この RNA については、リン酸塩が 6 nmol であることが計算の結果得られる。 $1 \mu\text{g}$ のプロタミンは約 235 pmol のプロタミン分子を含有し、それゆえ、 $235 \times 21 = 4935 \text{ pmol}$ の塩基性窒素原子、つまり 4.9 nmol の窒素原子を含有する。 $\text{RNA}/\text{プロタミン}$ の質量比が約 $2:1$ の場合、 N/P 比の計算結果は約 0.81 になる。 $\text{RNA}/\text{プロタミン}$ の質量比が約 $8:1$ の場合、 N/P 比の計算結果は約 0.2 になる。本発明の文脈において、 N/P 比は、好ましくは約 $0.2 \sim 50$, 好ましくは約 $0.5 \sim 50$, 最も好ましくは約 $0.75 \sim 25$, または $1 \sim 25$ の範囲である (複合体中の $\text{RNA}:\text{ペプチド}$ 比について、一層好ましくは、約 $10 \sim 50$ の範囲、最も好ましくは約 $25 \sim 50$ の範囲である)。

【0144】

本発明の別の一実施形態は、本発明に係る複合化 RNA , ならびに必要なに応じて (薬学的に) 適切なキャリアおよび/または別の補助的物質および添加剤を備えた組成物、好ましくは薬学的組成物に関する。…

ケ 【0174】

特に好適な実施形態によれば、血液細胞および/または造血細胞、またはその部分的な集団、つまり、血液 (全血) から単離される任意のタイプ

の細胞および／またはこれらの細胞に由来する培養株化細胞に由来する任意のタイプの細胞に、本発明において定義される複合化RNAが上記トランスフェクション法を使ってトランスフェクトされてもよい。…本発明において定義されるmRNAによってコードされたある抗原に対して治療を受ける患者に接種する場合には、個々人、特に治療を受ける実際の患者の例えば血液から得られる血液細胞（例えばPBMC）を、手間と時間と費用のかかる細胞培養手法を使って、プロフェッショナルな抗原提示細胞（APC）（特に樹状細胞（DC））を高い比率で含んだ細胞の集団に分化させることが不要なのである。翻って、血液細胞、特に上述した血液細胞の部分的な集団を採取する例えば実際の患者において、適切な免疫活性化を実現する薬学的組成物を得るために、1つ以上の抗原をコードするmRNAを直接血液細胞にトランスフェクトすれば、免疫活性化を成功させるには充分なのである。なお、この免疫活性化は、好ましくは腫瘍からの1つ以上の抗原、もしくは病原菌または薬剤からの1つ以上の抗原に対して向けられる。本発明において定義される複合化RNAを血液細胞または血液細胞に由来する（血液細胞から単離、または各培養株化細胞から単離される）細胞にトランスフェクトすることは、抗原に限定されるものではなく、当然、複合化RNAを得るために使用される、本発明において定義される任意のRNA、例えば本発明において定義される任意の他の免疫活性化RNAや任意のコーディングRNAなどに関連する。

【0176】

また、*in vitro*または*ex vivo*で使用されてもよいトランスフェクション法は、例えば本発明において言及される各種疾病の治療法として*in vivo*で使用しても非常に適切である。…特定の疾病の治療および／または予防は、通常、本発明の複合化RNAのRNAによってコードされた適切なタンパク質の選択に左右される。…

【0177】

…疾病または病状の例としては、例えば以下に列挙する疾病から選択される癌または腫瘍疾患があげられるが、これに限定されるものではない。

…

【0178】

この文脈において、疾病または病状のさらに別の例としては、例えば以下に列挙する疾病から選択されるウイルス性感染症から選択される感染症などがあげられるが、これに限定されるものではない。…

コ **【0192】**

一実施形態によれば、本発明は、上記において定義された組織または生体において免疫反応を調節する、好ましくは誘引または亢進するために（薬剤を調製するために）、さらに好ましくは本発明において言及される疾病または状態を支援するために、本発明に係わる少なくとも1つの複合化RNAを使用することをさらに含む。こうすることによって、本発明の複合化RNAは、免疫系を非特異的に賦活化するために、例えばあるサイトカインの生成を誘発するために使用されてもよい。したがって上記複合化RNAは、例えば病原体または腫瘍に由来する抗原によって誘発される特異的免疫反応を支援するために使用されてもよい。この文脈において薬剤は、例えば上記において定義された薬学的組成物であっても、または本発明において定義され、本発明の複合化RNA、ワクチンなどを含んだ注射用緩衝液であってもよい。上記免疫反応は、8～15アミノ酸の長さを有し、かつ実験式 $(A r g)_1$; $(L y s)_m$; $(H i s)_n$; $(O r n)_o$; $(X a a)_x$ によって表わされる1つ以上のオリゴペプチドに起因する少なくとも1つの複合化RNAによって調節されてもよく、および/または上記複合化RNAのRNAによってコードされたタンパク質の免疫活性特性によって調節されてもよい。

【0193】

したがって、本発明は、必要に応じて、様々な目的を実現するのに非常に役立つ。複合化RNAは、そのまままたは本発明の組成物の成分として、それ自体が、本発明の複合体の成分としてのRNAのトランスフェクション性を改善する。本発明の複合化RNAのこの根底にある性質は、様々な応用にとって有益である。細胞にRNAを導入したい時には、本発明によって、トランスフェクション効率の改善が必ず保証される。この特性そのものが、多種多様な疾病の治療、上記において定義された例えば単遺伝子疾患または遺伝子疾患を治療するための本発明の使用を可能にする。

【0194】

さらに、本発明は、免疫障害、例えばアレルギー性疾患または自己免疫疾患の治療が予想される場合はいつでも使用されてもよい。また、本発明は、患者の免疫系の非特異的または特異的免疫反応を亢進することによって、該免疫系を賦活化してもよい。したがって、本発明は、適切な場合は、疾病を治療するために非特異的免疫反応を誘発してもよい。また、必要に応じて、（例えば本発明の複合体の成分としてのRNAによって抗原をコードすることによって）特異的免疫反応をそのまま誘発してもよく、または本発明の複合化RNAと抗原とを例えば同一組成物として組み合わせることによって誘発してもよい。…

サ 【0199】

図面

以下の図は、本発明をさらに説明するためのものであり、図面に示した範囲に本発明の主題を限定するものではない。

【0206】

図7は、hPBMCにおいてノナアルギニン（(Arg)₉）またはポリ-L-アルギニンで複合化されたRNAのそれぞれの免疫活性効果を、

比較例において比較した結果を示す。有利な効果として、1 : 5 (RNA : ノナアルギニン) 未満の質量比の場合 (1 : 10, 1 : 8, 1 : 5, 1 : 2, 1 : 1, 2 : 1) に、非常に高い免疫活性効果が観察される。ただし、RNA : ノナアルギニン質量比が5 : 1の場合には、観察されるTNF α 生成量はあまり多くない。ノナアルギニン ((Arg)₉) またはmRNAを単独で使用した活性化実験についても、同じことが言える。また、ノナアルギニン ((Arg)₉) と比較すると、mRNAをポリ-L-アルギニンで複合化することによって、TNF α 生成の誘引が大幅に減少することが観察された。ポリ-L-アルギニンの濃度が高いと、そのポリ-L-アルギニンがトランスフェクトされる細胞にとって有害であるようである。ポリ-L-アルギニン : RNAの質量比が1 : 2以上の場合、細胞が溶解するので特に有害なようである。

【0207】

図8は、ノナアルギニン ((Arg)₉) を使ったRNAの複合体を、HeLa細胞にトランスフェクトすると発現するルシフェラーゼを示す。図8から読み取れるように、2 : 1 (RNA : ノナアルギニン) 未満の質量比が有利なようである。対照的に、(高分子) ポリ-L-アルギニンで複合化しても、低いルシフェラーゼ活性しか生じない。したがって、(高分子) ポリ-L-アルギニンは、mRNAのトランスフェクションには適していないようである。

【0209】

図10は、hPBMC細胞におけるヘプタアルギニン ((Arg)₇) で複合化されたRNAの免疫活性効果を、IL-6生成量を測定することによって示している。図から読み取れるように、hPBMC細胞のIL-6生成量は非常に大きい。つまり、ヘプタアルギニン ((Arg)₇) で複合化されたRNAの免疫活性効果は非常に高い。

【0220】

図21は、hPBMCにおけるTNF α の分泌に対する、R9H3で複合化されたRNAの免疫活性効果を示す。

【0221】

図22は、hPBMCにおけるIL-6の分泌に対する、R9H3で複合化されたRNAの免疫活性効果を示す。

シ 【0240】

(実施例4：HeLa細胞における、配列番号35または配列番号36によって表わされる安定化されたルシフェラーゼmRNA (Luc-RNA Active) の、ノナアルギニン ((Arg)₉) によって媒介されるトランスフェクションおよび発現)

トランスフェクションの1日前に、HeLa細胞 (150×10³/穴) を24穴のマイクロタイターのプレートに播種し、トランスフェクション実施時に70%コンフルエントの状態にした。トランスフェクションをするために、実施例3に開示した上記RNA/(ペプチド) 溶液 (40 μ l) 50 μ lを、血清を含まない培地250 μ lと混合し、上記細胞 (最終RNA濃度：13 μ g/ml) に添加した。トランスフェクション溶液の添加に先立って、上記HeLa細胞を、一穴について1mlのオプティメン (OptiMen; Invitrogen) で穏やかかつ慎重に2度洗浄した。そして、上記トランスフェクション溶液 (300 μ l/穴) を上記細胞に添加し、細胞を37 $^{\circ}$ Cで4時間培養した。その後、10%FCSを含んだ300 μ lのRPMI培地 (Camprex) を各穴に添加し、上記細胞を37 $^{\circ}$ Cでさらに20時間培養した。上記トランスフェクション溶液を、トランスフェクションの24時間後に吸引によって排出し、上記細胞を300 μ lの溶解緩衝液 (25mMのTris-PO₄, 2mMのEDTA, 10%のグリセロール, 1%のTriton-X100, 2m

MのDTT)に溶解させた。そして、その上清をルシフェリン緩衝液(2.5 mMのグリシルグリシン, 15 mMのMgSO₄, 5 mMのATP, 6.25 μMのルシフェリン)と混合し、ルミノメーター(Lumat LB 9507 (Berthold Technologies, ドイツ, Bad Wildbad))を使って蛍光を検出した。これらの実験の結果を図8および図12~図18に示す。

【0241】

(実施例5: ノナアルギニン((Arg)₉)またはポリ-L-アルギニン(比較例)を用いたRNA複合体の、トランスフェクション時の免疫活性化)

a) トランスフェクション実験

健康なドナーの末梢血から得られたHPBMC細胞を、フィコール勾配を使って単離し、その後1xPBS(リン酸塩を緩衝液とする生理食塩水)で洗浄した。そして上記細胞を96穴のマイクロタイタープレート(200×103/穴)に播種した。上記hPBMC細胞を、実施例4に記載の手順で、10 μlの上記RNA/ペプチド複合体(RNA最終濃度: 6 μg/ml, 同量のRNAを使用)とともに、X-VIVO 15培地(BioWhittaker)(最終RNA濃度: 10 μg/ml)において24時間培養した。hPBMC細胞に対する免疫活性効果を、サイトカインの生成(インターロイキン6と腫瘍壊死因子α)を検出することによって測定した。したがって、ELISAマイクロタイタープレート(Nunc Maxisorb)を、特異的なサイトカイン抗体をさらに含んだ結合緩衝液(0.02%のNaN₃, 15 mMのNa₂CO₃, 15 mMのNaHCO₃, pH9.7)とともに一晩(o/n)培養した。そして1%のBSA(ウシ血清アルブミン)を含んだ1xPBSで細胞を封止した。上記細胞の上清を添加し、37°Cで4時間培養した。その後、上記マイク

ロタイタープレートに1 x PBSおよび0.05%のTween-20で洗浄し、ビオチンで標識した二次抗体 (BD Pharmingen, ドイツ, ハイデルブルグ) と共に培養した。ストレプトアビジン結合した西洋わさびペルオキシダーゼを上記プレートに添加した。そして、そのプレートを、0.05%のTween-20を含んだ1 x PBSで再度洗浄し、ABTS (2, 2'-アジノービス (3-エチルーベンズチアゾリン-6-スルホン酸) を基質として添加した。サイトカインの量は、Sunrise ELISAリーダー (Tecan, ドイツ, クライルスハイム) を用いて組み換えサイトカイン (BD Pharmingen, ドイツ, ハイデルブルグ) と共に標準曲線を使用し、405 nm (OD405) における吸光度を測定することによって決定した。

【0242】

b) 結果

i) ノナアルギニン ((Arg)₉) で複合化したRNAの免疫活性効果

i 1) HPBMC細胞を、上記において開示したように、ノナアルギニン ((Arg)₉) で複合化したRNAとともに24時間培養した。ここで、RNA : (Arg)₉の質量比は1 : 1であった。次に、上記細胞上清内におけるIL-6の生成量をELISAを使って測定した。その結果、HPBMC細胞のIL-6生成量は非常に大きかった。つまり、ノナアルギニン ((Arg)₉) (図5を参照) で複合化したRNAの免疫活性効果は非常に高かった。

【0243】

i 2) HPBMC細胞を、上記において開示したように、ノナアルギニン ((Arg)₉) で複合化したRNAとともに24時間培養した。ここで、RNA : (Arg)₉の質量比は1 : 1であった。次に、上記上清

細胞内における $\text{TNF } \alpha$ の生成量をELISAを使って測定した。その結果、HPBMC細胞の $\text{TNF } \alpha$ 生成量は非常に大きかった。つまり、ノナアルギニン（(Arg)₉）（図6を参照）で複合化したRNAの免疫活性効果は非常に高かった。

【0244】

i i) ノナアルギニン（(Arg)₉）またはポリ-L-アルギニンで複合化したRNAそれぞれの免疫活性効果の比較結果（比較例）

hPBMCを、RNAの複合体およびノナアルギニン（(Arg)₉）またはポリ-L-アルギニンなどを用いて、異なるRNA：ノナアルギニンの質量比（1：10，1：8，1：5，1：2，1：1，2：1，5：1，8：1および10：1）の条件でそれぞれ24時間培養した。その後、 $\text{TNF } \alpha$ の生成量をELISAを使って測定した。

【0245】

有利な効果として、5：1（RNA：ノナアルギニン）未満の質量比の場合（1：10，1：8，1：5，1：2，1：1，2：1）（図7を参照）に、非常に高い免疫活性効果が観察された。RNA：ノナアルギニン質量比が5：1の場合には、観察される $\text{TNF } \alpha$ 生成量はあまり多くない。ノナアルギニン（(Arg)₉）またはmRNAを（図7の左側を参照）単独で使用した活性化実験についても、同じことが言える。

【0246】

また、ノナアルギニン（(Arg)₉）（図7の右側を参照）と比較すると、ポリ-L-アルギニンによってmRNAを複合化することによって、 $\text{TNF } \alpha$ の生成の誘引が大幅に減少する。さらに、観察によると、ポリ-L-アルギニンの濃度が高いと、ポリ-L-アルギニンがトランスフェクトされる細胞にとって有害であるようである。RNA：ポリ-L-アルギニンの質量比が1：2以下の場合、細胞が溶解するので特に有害なようである。

ある。

【0247】

(実施例6：ノナアルギニン ((Arg)₉) またはポリ-L-アルギニンを用いたRNA複合体をトランスフェクトする際における, HeLa細胞におけるそれぞれのルシフェラーゼの発現 (比較例))

a) ノナアルギニン ((Arg)₉) を用いたRNA複合体をHeLa細胞にトランスフェクトする際における, ルシフェラーゼの発現。異なる比率のノナアルギニンまたはポリ-L-アルギニンでそれぞれ複合化したルシフェラーゼをコードするRNA c t i v eを, HeLa細胞にトランスフェクトした。24時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。RNA : ノナアルギニンの質量比は, 2 : 1未満が有利なようである (図8を参照)。

【0248】

b) 比較すると, (高分子) ポリ-L-アルギニンで複合化しても, ルシフェラーゼ活性が高いレベルにまで増加することはないようである。したがって, (高分子) ポリ-L-アルギニンは, mRNA (図8参照) のトランスフェクションには適していないようである。

【0250】

(実施例8：ヘプタアルギニン ((Arg)₇) を用いたRNA複合体をトランスフェクトする際における免疫活性化 (比較例))

a) トランスフェクション実験

ヘプタアルギニン ((Arg)₇) について, 上述の実施例5の実験と同様にトランスフェクション実験を実施した。

【0251】

b) ヘプタアルギニン ((Arg)₇) で複合化したRNAの免疫活性化効果の結果

i) HPBMC細胞を, 上記において開示したように, ヘプタアルギニ

ン（（A r g）₇）で複合化したRNAとともに24時間培養した。ここで、RNA：（A r g）₇の質量比は1：1であった。次に、細胞上清内におけるIL-6の生成量を、ELISAを使って測定した。その結果、HPBMC細胞のIL-6生成量は非常に大きかった。つまり、ヘプタアルギニン（（A r g）₇）で複合化されたRNAの免疫活性効果は非常に高かった（図10参照）。

【0252】

i i) HPBMC細胞を、上記において開示したように、ヘプタアルギニン（（A r g）₇）で複合化したRNAとともに24時間培養した。ここで、RNA：（A r g）₇の質量比は1：1であった。次に、細胞上清内におけるTNF α の生成量をELISAを使って測定した。その結果、HPBMC細胞のTNF α 生成量は非常に大きかった。つまり、ヘプタアルギニン（（A r g）₇）で複合化したRNAの免疫活性効果は非常に高かった（図11参照）。

【0256】

（実施例11：hPBMCにおけるR9H3を用いた免疫活性化）

hPBMCにおける免疫活性化に対するR9H3の効果を試験した。したがって、上述の実施例3のR9H3とRNAとの複合体を調製した。さらに、健康なドナーの末梢血から得られたHPBMC細胞を、フィコール勾配を使って単離し、その後1×PBS（リン酸塩を緩衝液とする生理食塩水）で洗浄した。そして上記細胞を96穴のマイクロタイタープレート（ 200×10^3 /穴）に播種した。上記hPBMC細胞を、実施例4に記載の手順で、 $10 \mu\text{l}$ の上記RNA/ペプチド複合体（最終RNA濃度： $6 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、同量のRNAを使用）とともに、X-VIVO 15培地（BioWhittaker）において24時間培養した。hPBMC細胞に対する免疫活性効果を、サイトカインの生成（インターロイキン6

と腫瘍壊死因子 α)を検出することによって測定した。したがって、ELISAマイクロタイタープレート(Nunc Maxisorb)を、特異的なサイトカイン抗体をさらに含んだ結合緩衝液(0.02%のNaN₃, 15mMのNa₂CO₃, 15mMのNaHCO₃, pH9.7)とともに一晚(o/n)培養した。そして1%BSA(ウシ血清アルブミン)を含んだ1×PBSで細胞を封止した。上記細胞の上清を添加し、37℃で4時間培養した。その後、上記マイクロタイタープレートを1×PBSおよび0.05%のTween-20で洗浄し、ビオチンで標識した二次抗体(BD Pharmingen, ドイツ, ハイデルブルグ)と共に培養した。ストレプトアビジン結合した西洋わさびペルオキシダーゼを上記プレートに添加した。そして、そのプレートを、0.05%のTween-20を含んだ1×PBSで再度洗浄し、ABTS(2,2'-アジノービス(3-エチルーベンズチアゾリン-6-スルホン酸)を基質として添加した。サイトカインの量は、Sunrise ELISAリーダー(Tecan, クライルスハイム, ドイツ)を用いて組み換えサイトカイン(BD Pharmingen, ドイツ, ハイデルブルグ)と共に標準曲線を使用し、405nm(OD405)における吸収度を測定することによって決定した。結果は図21および図22に示す。図から読み取れるように、RNA:R9H3の比が1:5000のときに、免疫活性化が非常に高かった。

(2) 前記(1)によれば、本願明細書には、本願補正発明に関し、次の点が開示されていることが認められる。

ア 本願補正発明は、8~15アミノ酸の長さであり、かつ式(A1g)₁(Lys)_m(His)_n(Orn)_o(Xaa)_xによって表わされる一つ以上のオリゴペプチドと複合体を形成するRNA(分子)を少なくとも一つ含む、免疫反応を誘引又は亢進するための複合化RNAに関する(【請

求項1】，段落【0001】）。

イ 細胞又は組織に核酸をトランスフェクト（導入）することは，分子医学の主要な方法であって，多数の疾病の治療及び予防において重要な役割を果たしている（段落【0002】）。核酸をトランスフェクトする方法として，例えば，細胞貫通ペプチド（CPP）を用いる方法が周知である。CPPは，通常，塩基性アミノ酸が多い7～30個のアミノ酸からなる低分子ペプチドであって，DNA等のマクロ分子と共有結合により複合体を形成する。CPPがポリアルギニンの場合，CPPによって複合化されたマクロ分子は，負に帯電した細胞表面のグリコサミノグリカンに結合し，エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれることが提案されている（段落【0008】）。

RNAは，DNAと異なり宿主ゲノムに組み込まれる危険性がないためDNAに比べて有利であるが（段落【0020】），CPPを使った細胞内部へのRNAの輸送は，RNAの劣化が速いこと，及び複合体の安定性が低いことから，特に低分子RNA，例えば二本鎖siRNAに限定され，非常に限られた事例数しか報告されていない（段落【0017】，【0019】）。

ウ そこで，本願補正発明は，細胞内へのRNA輸送に適した，効率的なキャリアを提供し，腫瘍，循環器病や感染症などの特定の疾病の治療用複合化RNAを提供することを目的（課題）とし（【請求項1】，段落【0021】），その目的を達成する手段（課題を解決する手段）として，8～15アミノ酸の長さであり，かつ式 $(Alg)_1(Lys)_m(His)_n(O rn)。(Xaa)_x$ によって表わされる1つ以上のオリゴペプチドと，少なくとも1つの一本鎖RNA（分子）とが，非共有的な相互作用によって連結した免疫活性化複合化一本鎖RNAであって，RNA（分子）のオリゴペプチドに対する窒素／リン酸塩比（N/P比）が，0.5～50の

範囲であり、かつ、RNA（分子）対オリゴペプチドのモル比（以下、単に「モル比」ということがある。）が1：250以上である複合化RNAを採用したものである（【請求項1】）。

エ 本願補正発明に係る複合化RNAは、正電荷を帯びたオリゴペプチドと、負電荷を帯びたRNAとの間の非共有的な相互作用により可逆的に連結したものであり、細胞内においては、RNAとオリゴペプチドとが解離した状態で平衡であるように思われる（段落【0023】）。

本願補正発明のRNAは、一本鎖RNAであれば、任意のRNAであってよく、長さも任意である。例えば、①低分子RNAオリゴヌクレオチド、②コーディングRNA、③免疫活性化RNAなどを使用できる（段落【0048】）。

①低分子RNAは、5～100ヌクレオチドの長さであり、例えば、（非特異的）免疫活性化のために使用される（段落【0049】、【0050】）。②コーディングRNAは、タンパク質をコードするmRNAであり、細胞内でタンパク質に翻訳されるものである。コードされるタンパク質として、アジュバントタンパク質（TNF α やIL-6などサイトカイン）などの生来の免疫反応（例えば、外因性リガンドがTLRに結合する反応）を誘発するもの、ウイルスや腫瘍に由来する抗原などの抗原特異的免疫応答を誘発するものがある（段落【0051】、【0052】、【0057】～【0061】、【0070】、【0073】）。③免疫活性化RNAは、オリゴペプチドでRNAを複合化する以前に、既に免疫活性化効果を示すが、複合化することによってその免疫活性効果が亢進又は誘引される。免疫活性化RNAは、好ましくは、mRNAや低分子RNAオリゴヌクレオチドであってもよい。また、TLR7やTLR8などのTLRのリガンドであってよい（段落【0092】～【0095】、【0098】）。

オ 本願明細書の実施例5の図7、実施例11の図21、図22では、hP

BMC（ヒト末梢血単核球）を、(A r g)₉あるいは(A r g)₉(H i s)₃とルシフェラーゼをコードするmRNAとを、様々な割合（図7では質量比，図21，22ではモル比）で混合したRNA／ペプチド複合体と共に24時間培養することにより，hPBMCに対する免疫活性効果を，サイトカイン（TNF α ，IL-6）の産生を検出することによって測定しており，本願補正発明の範囲に含まれるN／P比とモル比（質量比からの換算による）を有する複合体は，サイトカインの産生量が多いことが示されている（段落【0241】～【0246】，【0256】，図7，21，22）。

また，実施例6の図8では，(A r g)₉とルシフェラーゼをコードするmRNAとを，様々な割合（質量比）で混合したRNA／ペプチド複合体を，HeLa細胞にトランスフェクトしたところ，本願補正発明の範囲に含まれるN／P比とモル比（質量比からの換算による）を有する複合体は，mRNAから翻訳されたルシフェラーゼの発現量が多いことが示されている（段落【0247】，【0248】，図8）。

カ 本願補正発明の複合化RNAを用いることにより，RNAのトランスフェクション効率を改善し，抗原によって誘発される特異的免疫反応，又は非特異的免疫反応を亢進することによって，免疫系を賦活化することができ，それにより腫瘍または癌疾患，（感染性）ウイルス性疾患などの疾病の治療及び／又は予防を行うことができるという効果を奏する（段落【0177】，【0178】，【0192】～【0194】）。

2 取消事由1（引用発明の認定の誤り）について

(1) 引用例1の記載事項等について

ア 引用例1（甲3。訳文は乙1）には，次のような記載がある。

(ア) 請求項

「29. 単離されたカチオン性ペプチドとRNAの非共有結合複合体

からなる組成物。」（甲3添付の訳文最終頁，乙1，27頁）

「43. 前記RNAがmRNA，アンチセンスRNA，RNAi，増幅されたRNAやリボザイムから選択される，請求項29または30の組成物。」（甲3添付の訳文最終頁）

「45. 前記RNAが1以上の腫瘍細胞や病原体から単離される，請求項29または30の組成物。」（甲3添付の訳文最終頁）

(イ) 発明の分野

「本発明は細胞を形質転換する方法に関する。より具体的には，本発明は，細胞内へのRNAのカチオン性ペプチドを介した形質転換の方法，かかる方法に有用なカチオン性ペプチド，関連するカチオン性ペプチド核酸複合体，およびかかる複合体で形質転換された細胞に関する。」（乙1，1頁6～9行目）

(ウ) 発明の背景

「核酸で細胞を形質転換する従来の方法には，脂質を介した形質転換，ポリ-L-リジン，デンドリマーまたはポリエチレンイミンなどのカチオンに結合するポリマーDNAを用いたトランスフェクション，エレクトロポレーション，リン酸カルシウム形質転換，およびウイルスを介したトランスフェクションが含まれる。

現在では，様々なペプチド，特に，カチオン性ペプチドは細胞内に移行することができ，またタンパク質の細胞内への転座を仲介することもできることが知られている。…」（乙1，1頁11～16行目）

「いくつかのグループは，共有結合したDNAとRNAに対するペプチドを介したトランスフェクションを報告している。たとえば，アンチセンスオリゴデオキシヌクレオチドのAntPとTatに対する結合体が標的遺伝子発現を減少させることが示された…。さらに，Schmitzらは，…，ジスルフィド結合によりAntPに共有結合したsiR

NAによる哺乳類細胞のトランスフェクションおよびmRNA発現の低減を説明している。

さらに、非共有結合で結合した核酸に対するペプチドを介したトランスフェクションが報告されている。」（乙1，2頁下から15～6行目）

「RNAトランスフェクションの方法は、DNAトランスフェクションの方法ほど開発されていない。抗原提示細胞のRNAローディングなどの技術の重要性が高まるにつれてRNAトランスフェクションの進んだ方法を開発することは決定的に重要となる。しかし、ペプチドを介したRNAトランスフェクションに成功した報告はほとんどなかった。…

したがって、細胞の生存率を保持しつつ、細胞に効率的にRNAを送達する進んだ方法を開発する必要性がある。本発明はこの必要性を満たし、また、関連する利点を提供する。」（乙1，4頁4行目～下から5行目）」

（エ） 発明の概要

「出願人らは、カチオン性ペプチドが、RNAとペプチドとの共有結合またはPEI-ペプチド複合体を必要とすることなく効率的なRNAによる細胞のトランスフェクションを仲介することができることを発見した。

したがって、本発明は、細胞をカチオン性ペプチドおよびRNAに接触させることを含む細胞を形質転換する方法を提供する。該接触は*in vivo*または*in vitro*のどちらでも行うことができる。好ましい実施形態では、細胞はカチオン性ペプチドとRNAとを含む非共有結合複合体と接触される。好ましくは、該非共有結合複合体は、細胞に接触される前に、（a）カチオン性ペプチドをRNAに添加して混合物を形成するステップ、および（b）該混合物をカチオン性ペプチドとRNAとの間で非共有結合複合体が形成できるのに十分な時間培養するス

テップによって形成される。

また、本発明は細胞をトランスフェクトするのに役立つカチオン性ペプチドの提供も行う。好ましくは、該ペプチドは長さで8～24個のアミノ酸である。より好ましくは、該ペプチドは長さで10～22個のアミノ酸であり、もっとも好ましくは、該ペプチドは長さで12～20個のアミノ酸である。本発明の一実施例では、本発明のカチオン性ペプチドは核局在化シグナルを含まない。好ましくは、該カチオン性ペプチドは本質的にペプチド形質導入ドメインからなる。好ましい実施形態では、カチオン性ペプチドは前記細胞の細胞質に優先的に局在化される。

本発明のさらなる実施形態では、カチオン性ペプチドは、AntP (RQIKIWFQNRRMKWKK; SEQ ID NO: 3), HIV Tat (GRKKRRQRRRPPQ; SEQ ID NO: 29) または HIV Tat dimer (CGRKKRRQRRRPPQGRKKRRQRRRPPQ; SEQ ID NO: 30), およびそれらの組み合わせから成るグループから選択される。好ましくは、カチオン性ペプチドは、MHCクラスIヘルパー・エピトープまたはMHCクラスIIヘルパー・エピトープなどのMHCヘルパー・エピトープを含む。一実施形態では、ヘルパー・エピトープはカチオン性ペプチドに埋め込まれている。カチオン性ペプチドに埋め込まれたヘルパー・エピトープの好ましい実施形態は、RRKAQYIKANSKF I G I T E L K R H (SEQ ID NO: 31), KKKHIEKYL K K I K N S K K K (SEQ ID NO: 32), KKKVIKG G R H L I F C H S K K K C D K K K (SEQ ID NO: 33), KKKPKYVRQNTLKLATKKK (SEQ ID NO: 34), およびKKKKALENKKKQLGAGGKNKKK (SEQ ID NO: 35) である。

カチオン性ペプチドは、任意のRNAの任意のタイプの細胞の中へのトランスフェクションを仲介するのに役立つ。好ましいRNAは、mRNA、アンチセンスRNA、RNAi、増幅RNAおよびリボザイムである。好ましくは、RNAは翻訳性RNAである。一実施形態では、RNAは癌細胞などの1つまたは複数の腫瘍（新生物）細胞から単離される。別の実施形態では、RNAはHIVまたはHCVなどの1つまたは複数の病原体から単離される。

さらに、本発明は、非共有結合性のカチオン性ペプチド-RNA複合体とカチオン性ペプチド-RNA複合体でトランスフェクトされた細胞とを含む組成物を提供する。

本発明のカチオン性ペプチドとRNAの複合体は、未成熟樹状細胞と成熟樹状細胞のような免疫系の抗原提示細胞の変換のために特に利用される。」（乙1、4頁下から3行目～6頁2行目）

(オ) 発明の詳細な説明

「用語「抗原」は、当該技術においてよく理解されており、免疫原性の物質、つまり、免疫原を含む。また、任意の抗原を使用することは本発明の使用に想定されており、したがって、限定はされないが、自己抗原（正常なものまたは疾病関連のものを問わず）、感染抗原（たとえば、細菌抗原、ウイルス抗原等）、または他のいくつかの外来抗原（たとえば、食物成分、花粉等）を含むことは理解されるべきであり認められるであろう。用語、「抗原」または代わりに「免疫原」は、複数の免疫原への免疫応答を同時に調整できるような2以上の免疫原の集合に適用する。さらに、該用語は、免疫原または抗原の任意の様々な異なる配合物を含む。」（乙1、6頁13～20行目）

「抗原提示細胞（APC）との用語は、1以上の抗原を、免疫系の特異的エフェクタ細胞によって認識される抗原-MHC複合体として提示

し、それによって、提示された抗原に対して効果的な細胞性免疫反応を誘導することができる細胞集団のことをいう。多くのタイプの細胞がT細胞認識のためにその細胞表面上に抗原を提示することができるかもしれないが、樹状細胞（プロフェッショナルAPC）だけが有効な量の抗原を提示しさらに細胞障害性Tリンパ球（CTL）応答のためにナイーブT細胞を活性化させる能力を有している。

APCは、限定はされないが、B細胞、およびマクロファージ、未成熟樹状細胞、成熟樹状細胞およびランゲルハンス細胞などの樹状細胞を含む。」（乙1、6頁下から6行目～7頁2行目）

「用語「樹状細胞」（DC）は、様々なリンパ系組織および非リンパ系組織で見つかった形態学的に類似した多種多様な細胞タイプを指す（Steinman（1991）Ann. Rev. Immunol. 9：271－296）。樹状細胞は生体内に最も強力に好ましいAPCを構成する。樹状細胞は単球から分化することができるが、別個の表現型を持っている。たとえば、単球が持っている特別の分化マーカー（CD 14抗原）は、樹状細胞内で見つからない。また、成熟した樹状細胞は貪食細胞ではないが、単球は貪食性の強い細胞である。成熟したDCはT細胞の活性化および増殖に必要なシグナルをすべて提供することができるが示されてきている。」（乙1、8頁10～16行目）

「本明細書で使用される「対象物に免疫応答を誘導すること」という用語は、当該技術において理解された用語であり、対象に抗原（またはエピトープ）を導入した後で、抗原（またはエピトープ）に対する検出または測定可能な応答が、対象に抗原（またはエピトープ）を導入する前に比べて少なくとも約2倍、または少なくとも約5倍、または少なくとも約10倍、または少なくとも約100倍、または少なくとも約50

0倍，または少なくとも約1000倍，またはそれ以上増大することを意味する。抗原（またはエピトープ）に対する免疫応答には，抗原特異的（またはエピトープ特異的）な抗体の産生，および自身の表面に抗原（またはエピトープ）に特異的に結合する分子を発現させる免疫細胞の産生が含まれる。」（乙1，8頁下から4行目～9頁4行目）

「本発明の目的の場合，「非共有結合で複合体化される」とは，共有結合とは対照的にペプチドと核酸との間で電子が共有されない本発明のペプチドと核酸との間の非共有結合性化学結合または凝集を指す。好ましくは，非共有結合性複合体は正に帯電したカチオン性ペプチドと負に帯電したポリヌクレオチドによって形成される。…」（乙1，10頁2～5行目）

「本発明は，カチオン性ペプチドを介したRNAによる細胞のトランスフェクションの新しい方法を提供する。本発明の該ペプチドは任意の細胞へのRNAの形質転換を仲介することができる。従来技術とは対照的に，本発明の方法は，RNAとペプチドの共有結合やペプチドのポリエチレンジイミン（PEI）への共有結合も必要としない。したがって，核酸は，細胞の内部でその生物学的機能を一旦保持する可能性が高く，共有結合させる余分なステップの必要性がなくなる。さらに，エレクトロポレーション，カチオン性脂質または dendriマーなどの従来技術の形質転換法との比較では，本発明の形質転換法は，細胞の生存率および形質転換効率をより高める。

このように，本発明は，細胞をカチオン性ペプチドおよびRNAを含む複合体と接触させることを含む細胞の形質転換法であって，前記ペプチドと前記RNAが非共有結合で複合体化している方法を提供する。本明細書で用いられる「形質転換すること」および「トランスフェクションすること」という用語は，交互に用いられて，RNAを細胞内に導入

することを指す。」（乙1，11頁下から3行目～12頁10行目）

「本発明のカチオン性ペプチド

本発明に関するカチオン性ペプチドは、好ましくは長さで8～40のアミノ酸、より好ましくは、長さで9～30のアミノ酸、さらにより好ましくは、長さで10，11，12，13，14，15，16，17，18，19，20，21，22，23，または24のアミノ酸、最も好ましくは、長さで10～20のアミノ酸である。ポリエチレンイミンに接合したペプチドは、本発明のカチオン性ペプチドから明確に除外される。…

本発明のカチオン性ペプチドはそれらの塩基性（カチオン性）アミノ酸成分によりpH7で最終的に正の電荷を有しているが、帯電していないアミノ酸残基および負に帯電したアミノ酸残基を含有することもできる。塩基性側鎖を有するアミノ酸はpH7で正に帯電（カチオン性）しており、リジン（K）、アルギニン（R）およびヒスチジン（H）を含む。本発明のカチオン性ペプチドに使用される好ましい塩基性アミノ酸残基はリジンとアルギニンである。

酸性の側鎖を有するアミノ酸はpH7で負に帯電（酸性）しており、アスパラギン（N）、グルタミン（Q）、セリン（S）、トレオニン（T）およびチロシン（Y）を包含する。無極性の側鎖を有するアミノ酸は、アラニン（A）、ロイシン（L）、プロリン（P）、メチオニン（M）、グリシン（G）、バリン（V）、イソロイシン（I）、フェニルアラニン（F）、トリプトファン（W）およびシステイン（C）を包含する。」

（乙1，12頁11行目～下から2行目）

「細胞内へ移行する能力を持つ多数のカチオン性ペプチドは、当業者に公知であり、本発明の方法、カチオン性ペプチド-RNA複合体、および形質転換細胞に役立つ。これらには、限定はされないが、ポリアル

ギニン（例えば，7～15のアルギニン，好ましくは，8，9，10，11，または12のアルギニン）（Matsuiら，Current Protein and Peptide Science（2003）4：151－157参照）・・・，またはそれらの組み合わせ任意のものから成るグループから選択される。」（乙1，14頁下から5行目～15頁下から9行目）

「当業者なら，当業者らに公知の方法で付加的なカチオン性ペプチドがRNAトランスフェクションを仲介する能力を容易に決定することができる。好ましくは，遺伝子導入されたRNAにコードされた1または複数のポリペプチドのタンパク質産生が測定される。タンパク質を検出する方法は，当業者らに公知であり，それらの方法には，限定はされないが，ウェスタン・ブロット法，細胞外染色，抗生物質耐性などのマーカーの検出，ルシフェラーゼ， β ガラクトシダーゼ等が包含される。代わりに本発明では，標識を付けたRNA（例えば，蛍光標識されたRNA，または32Pで標識付けしたRNA）を関心のあるカチオン性ペプチドと前もって混合し，次に細胞培養に加え，約30～60分間インキュベートし，培地を取り除き細胞を洗浄し，次いで細胞に残った標識を標準的な技術で測定する。」（乙1，15頁下から8行目～16頁1行目）

「好ましい実施形態では，RNAは翻訳可能なRNAであり，そして本発明のカチオン性ペプチドおよびカチオン性ペプチド-RNA複合体は，選択的に，細胞質を標的とするか，または細胞質内に局在する。細胞質で翻訳が生じるので細胞質を標的とするのが好ましい。一実施形態では，該カチオン性ペプチドは本質的にペプチド形質導入ドメインからなる。

RNAから翻訳されたタンパク質は，本発明の方法で細胞に送達され，

当該技術分野で公知の方法で検出することができる。タンパク質分析には当該技術分野で様々な技法が利用可能であり、それらの技法には、限定はされないが、放射免疫測定法、ELISA（酵素結合免疫放射測定法）、「サンドイッチ」免疫測定法、免疫蛍光分析法、およびPAGE-SDSが含まれる。

本発明の目的の場合、ペプチド形質導入ドメインは、他の細胞小器官（例えば、細胞膜、核、ミトコンドリア、色素体、小胞体、ゴルジ装置など）とは対照的に、選択的に細胞質内に局在するアミノ酸配列を指す。好ましくは、本発明のカチオン製ペプチドの少なくとも50%、60%、70%、80%、または少なくとも90%は、細胞質に局在する。」（乙1、16頁7～19行目）

「本発明のペプチドは、Perkin Elmer / Applied Biosystems社、モデル430Aまたは431A（米国、カリフォルニア州、フォスター市）で製造されたもののような、市販の自動ペプチド合成器を用いた化学合成などの当業者に公知の様々な方法によって得ることができる。」（乙1、19頁下から11～9行目）

「RNA

本発明のカチオン性ペプチドは、限定はしないが、一次RNA転写物、mRNA、rRNA、tRNA、dsRNA、siRNA（RNAi）、リボザイム、アンチセンスRNA、増幅RNA等を含む任意のタイプのRNAを持つ任意のタイプの細胞の形質転換に使用することができる。好ましい実施形態では、RNAは翻訳可能なRNAである。翻訳可能なRNAという用語は、RNAがオープン・リーディング・フレームの両側に位置する機能的な翻訳開始シグナルおよび翻訳終結シグナルを含むこと、および、RNAが、細胞内に導入された際に、翻訳開始シグナルおよび翻訳終結シグナルを認識する翻訳機構でペプチドまたはポリペプ

チドに翻訳されることを意味する。

RNAは、一つまたは複数の細胞から抽出でき、または従来の分子技術を用いて *in vitro* で産生することができる。RNAは、cDNAへの逆転写、続いてPCR増幅および *in vitro* での転写により増幅することができる。かかる方法は当業者には公知である。…

好ましい実施形態では、RNAは病原体、または、癌細胞などの新生物（腫瘍）細胞からのものである。好ましい実施形態では、抗原は腫瘍細胞または病原体からのものである。好ましくは、腫瘍細胞は腎癌の癌細胞、多発性骨髄腫細胞、慢性リンパ性白血病細胞、またはメラノーマ細胞である。好ましい病原体は、HTVおよびHCVである。好ましい実施形態では、抗原は、癌細胞または病原体から単離された、または由来するRNAの形で、抗原提示細胞に送達される。」（乙1、20頁5行目～下から4行目）

「標的細胞

本発明の方法および組成物は、原核細胞および真核細胞、培地内の細胞、組織断片内の細胞、またはヒトを含む動物内の細胞を含む任意のタイプの細胞を形質転換するのに使用することができる。好ましい実施形態では、細胞は真核細胞である。

本発明の一実施例では、標的細胞は抗原提示細胞である。抗原提示細胞には、限定はされないが、肺胞マクロファージ、腹腔マクロファージおよび脾臓マクロファージを含むマクロファージ；単球；ランゲルハンス細胞、未成熟樹状細胞および成熟樹状細胞を含む樹状細胞が含まれる。

好ましい実施形態では、標的細胞は樹状細胞である。「樹状細胞（DC）」という用語は、様々なリンパおよび非リンパ組織に見られる形態学的に類似した細胞形態の多様な個体群を表す…。樹状細胞は、APCのうちで最も強力であり、T細胞の活性化および増殖に必要なシグナル

を提供する。樹状細胞は骨髄先祖細胞に由来し、少数が末梢血中を循環し、未成熟ランゲルハンス細胞または最終分化した成熟細胞のいずれかとして出現する。また、樹状細胞は単球から分化することもできる。抗原提示細胞（APC）を単離する方法、ならびに樹状細胞前駆体および成熟樹状細胞を産生する方法は当業者に公知である。」（乙1，21頁5～20行目）

「未成熟樹状細胞または成熟樹状細胞は、本発明のカチオン性ペプチド-RNA複合体を使用してトランスフェクトされることができる。トランスフェクトされた樹状細胞は、腫瘍および病原体感染などの疾病の治療に役立つ。」（乙1，23頁2～4行目）

「カチオン性ペプチド-RNA複合体

本発明はさらに、カチオン性ペプチドとRNAの単離された非共有結合複合体からなる組成物を提供する。正電荷を持つカチオン性ペプチドと負電荷を持つRNAは、イオン結合を介して非共有結合複合体を形成する。本発明のカチオン性ペプチド-RNA複合体は、一つのカチオン性ペプチドと複数のRNA、複数のカチオン性ペプチドと一つのRNA、一つのカチオン性ペプチドと一つのRNAで形成される複合体を包含する。カチオン性ペプチドの長さ、配列、電荷は、RNAの長さ、配列、及び、それらの濃度と同様に、カチオン性ペプチドとRNAの比を決定するための関連要因である。効率的な複合体形成や導入のために、カチオン性ペプチドとRNAの比や濃度を最適化することは当業者にとって容易である。好ましい比は、RNA分子に対してカチオン性ペプチドが1-100である。

本発明のカチオン性ペプチド-RNA組成物は、カチオン性脂質、中性脂質、デンドリマー、クロロキン、リソソーム親和性薬剤、または、かかる混入物がないときのカチオン性ペプチド-RNAのトランスフェ

クション効率と比べ、カチオン性ペプチド-RNAのトランスフェクション効率が5%以上増加するのに十分な他の薬剤の量を含んではならない。

カチオン性ペプチド-RNA複合体は、カチオン性ペプチドおよびRNAを、トランスフェクションのための標的細胞を含む環境に添加する前に形成することができ、または複合体はトランスフェクションのための標的細胞を含む環境で形成される。たとえば、組織培養中の標的細胞であれば、予め形成したカチオン性ペプチド-RNA複合体を組織培地に添加してよく、またはRNAおよびカチオン性ペプチドを別個に添加し培地中で結合させてよい。より高次の生命体中の標的細胞であれば、予め形成したカチオン性ペプチド-RNAを生命体に導入することが好ましい。1つの実施形態で、カチオン性ペプチドおよびRNAをPBS中で混合し、室温で1~60分間または一晩インキュベートし、ペプチド:RNA複合体を形成させる。インキュベーションの温度は決定的ではないが、好ましい実施形態では1~50°Cの範囲内である。

本発明は、また、カチオン性ペプチド-RNA複合体からなる医薬組成物、および薬学的に許容可能な担体を提供する。」(乙1, 23頁9行目~24頁4行目)

「標的細胞の形質転換

カチオン性ペプチドと核酸は*in vivo*または*ex vivo*で細胞に送達することができる。カチオン性ペプチドと核酸は、RNAまたはカチオン性ペプチド-RNA複合体の細胞内への取り込みに帰着するのに効果的な任意のRNA濃度で使用することができる。かかる有効な濃度は、一般的に、細胞培養内のRNAで1ナノグラム/ml~1mg/mlまでの範囲にある。

当業者なら、*in vitro*および*in vivo*での使用のため

の最適な濃度を決定することができる。

好ましい実施形態では、カチオン性ペプチドとRNAを水溶液中で混合し、その後、共に細胞培地に加えるか、または動物、好ましくは、ヒトに投与する。好ましくは、混合液を細胞培地に加えるか、または投与する前に、カチオン性ペプチドとRNAを複合体が形成可能になる十分な時間インキュベートする。あるいは、カチオン性ペプチドとRNAをどちらの順序でも、組織培養、またはヒトあるいは動物の対象などを含む環境に別々に加えることができる。

組織培養内の細胞のトランスフェクションの場合、カチオン性ペプチドとRNAを加える前に細胞をPBSなどの生理的緩衝溶液で洗浄することができる。これらの細胞をカチオン性ペプチドとRNA（好ましくは予め形成した複合体）に任意の時間接触させることができる。好ましくは、少なくとも1分、好ましくは、5分から2時間、これらの細胞をカチオン性ペプチドとRNAに接触させることができる。トランスフェクション培地を使用する場合は、該トランスフェクション培地を接触期間の後に除去し、適切な細胞培地と取り替えることができる。

本発明は、上述のロードした抗原提示細胞を含むワクチンをさらに提供する。」（乙1，24頁9行目～下から4行目）

「抗原提示細胞を単離し、調製し、トランスフェクトし、配合し、患者に投与するする方法は、当該技術分野で公知である。」（乙1，25頁6～7行目）

(カ) 実施例

「実施例1

ヒーラ細胞へのカチオン性ペプチドを介したGFP-RNAの導入

Port-2 (AntP: RQIKIWFQNRRMKWKK; SEQ ID NO: 3), Port-3 (HIV Tat: G

RKKRRQRRRPPQ; SEQ ID NO: 29), または Port-4 (Port-3 dimer: CGRKKRRQRRRPPQGGRKKRRQRRRPPQ; SEQ ID NO: 30) カチオン性ペプチドが、ヒーラ細胞に緑色蛍光タンパク質 (GFP) をコードする RNA を導入するために使用される。Port カチオン性ペプチドと RNA の複合比は、100:1~1:1 の範囲である。Port カチオン性ペプチドと RNA の複合比は、RNA 分子数へのペプチド分子数の割合として、分子間の電荷比によって算出される。Port ペプチドは、所望の割合で適切な濃度に PBS 中に希釈される。Port ペプチド 100 μ l は、RNA 100 μ l (20 μ g/ml) と混合され、室温にて 30 分間培養されることで複合体を形成する。接着ヒーラ細胞は、4 ml PBS で洗浄される。200 μ l の Port:RNA 複合体が、洗浄された細胞に滴下され、続いて 400 μ l の無血清培地 (DMEM) が滴下される。Port:RNA 複合体溶液で被覆された細胞は、37°C で 1 時間培養され、1 ml の完全ヒーラ培地 (10% FBS 添加の DMEM) が細胞に添加される。細胞は 37°C で一昼夜培養され、トリプシン消化処理により採取され、フローサイトメトリーで緑色蛍光タンパク質の発現を測定される。」

(乙1, 26 頁下から 13 行目~27 頁 3 行目)

イ 上記アの引用例 1 の記載によれば、引用例 1 には、前記第 2 の 3 (2) アの引用発明が記載されているものと認められる。

ウ これに対し、原告は、①引用例 1 には実験結果の記載がなく、形質転換できるという効果を奏する複合体が得られることや、仮に複合体が得られたとしても、引用例 1 に記載された性質を示すことは確認できないのであるから、実施可能なものとして完成した発明が記載されているとはいえない、②引用例 1 の記載から配列番号 29 のペプチドを選択することは当業

者において容易ではないから、引用例1の記載に基づいて引用発明を認定することはできず、本件審決の認定は誤りである旨主張する。

(ア) しかしながら、まず①についていうと、特許法29条2項、同条1項3号所定の「刊行物に記載された発明」というためには、特許出願当時の技術水準を基礎として、当業者が当該刊行物を見たときに、特許請求の範囲の記載により特定される特許発明等の内容との対比に必要な限度において、その技術的思想を実施し得る程度に技術的思想の内容が開示されていることが必要であり、かつ、それで足りると解するのが相当である。

そこで、上記の観点から引用例1に上記の程度の開示がされているかどうかを検討すると、引用例1には、核酸で細胞を形質転換する従来の方法には、脂質を介した形質転換、ポリ-L-リジン、デンドリマーまたはポリエチレンジアミンなどのカチオンに結合するポリマーDNAを用いたトランスフェクション、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム形質転換、及びウイルスを介したトランスフェクションが含まれ、様々なペプチド、特に、カチオン性ペプチドは細胞内に移行することができ、またタンパク質の細胞内への転座を仲介することもできることが知られており、さらに、非共有結合で結合した核酸に対するペプチドを介したトランスフェクションが報告されていたが、RNAトランスフェクションの方法は、DNAトランスフェクションの方法ほど開発されていなかったこと（前記(1)ア(ウ)）、引用例1記載の発明が、細胞の生存率を保持しつつ、細胞に効率的にRNAを送達する進んだ方法を提供するものであること（前記(1)ア(ウ)）、出願人らは、カチオン性ペプチドが、RNAとペプチドとの共有結合又はPEI-ペプチド複合体を必要とすることなく効率的なRNAによる細胞のトランスフェクションを仲介することができることを発見したこと（前記(1)ア(エ)）が記載されており、

これらをまとめれば、DNAを用いてされていたトランスフェクションにつき、RNAについても、カチオン性ペプチドを用いることにより効率的になし得ることを発見したことが記載されている。

さらに、引用例1の「標的細胞の形質転換」の項には、カチオン性ペプチドと核酸は*in vivo*又は*ex vivo*で細胞に送達することができること、カチオン性ペプチドと核酸は、RNA又はカチオン性ペプチド-RNA複合体の細胞内への取り込みに帰着するのに効果的な任意のRNA濃度で使用することができること、かかる有効な濃度は、一般的に、細胞培養内のRNAで1ナノグラム/ml～1mg/mlまでの範囲にあるが、当業者であれば、*in vitro*又は*in vivo*での使用のための最適な濃度を決定できること、好ましい実施形態としてカチオン性ペプチドとRNAを水溶液中で混合し、その後、共に細胞培地に加えるか、または動物、好ましくは、ヒトに投与する形態があること、組織培養内の細胞のトランスフェクションを行う場合の手法がそれぞれ記載されており（前記(1)ア(オ)）、形質転換を行う場合の手法が開示されている。

その上で、引用例1には、「実施例1」として、RNAと組み合わせるカチオン性ペプチドとして、配列番号3、29及び30のPortカチオン性ペプチドが記載され、そのうちの、Port-3カチオン性ペプチドが引用発明の認定の基礎とされているものであるところ、実施例1では、上記Portカチオン性ペプチドと緑色蛍光タンパク質（GFP）をコードするRNAの複合比を100：1～1：1とした非共有結合複合体を、ヒラ細胞へ滴下し、培養したのち、緑色蛍光タンパク質の発現を測定すること、上記の複合比は、RNA分子数へのペプチド分子数の割合として、分子間の電荷比によって算出されるものであることが記載されており（前記(1)ア(カ)）、具体的な複合体に用いられるカチ

オン性ペプチドの内容及び複合の際のカチオン性ペプチドとRNAの複合比やその算出方法も記載されている。

以上の引用例1の記載に照らすと、引用例1には、RNAトランスフェクションの方法は、DNAトランスフェクションの方法ほど開発されていなかったところ、RNAについて、DNAと同様にトランスフェクションを行うに際し、Port-3カチオン性ペプチドと緑色蛍光タンパク質をコードするRNAの非共有結合複合体であって、Port-3カチオン性ペプチドとRNAの複合比が100：1～1：1の範囲である複合体を採用し、引用例1記載の方法により、RNAを細胞内へ導入し、形質転換することにより、細胞の生存率を保持しつつ、細胞に効率的にRNAを送達することができるという技術的思想が、当業者にとって、実施し得る程度に、かつ、特許発明と対比するに必要な程度に開示されていることが認められる。したがって、原告の上記①の主張は理由がない。

(イ) また、②についても、引用例1に他の本願補正発明の構成を有しないペプチドが開示されていたとしても、前記(ア)のとおり、引用例1には実施例1として、Port-3カチオン性ペプチドと緑色蛍光タンパク質をコードするRNAの非共有結合複合体であって、Port-3カチオン性ペプチドとRNAの複合比が100：1～1：1の範囲である複合体、すなわち引用発明が技術思想として開示されている以上、これを引用発明として認定することに誤りはない。原告は、引用例1の記載からPort-3カチオン性ペプチドを選択することが当業者において容易でない旨主張し、容易想到性を問題とするかのようであるが、引用例1に本願補正発明の構成と一致しない他のペプチドが開示されているとしても、上記複合体が引用例1に前記(ア)のとおり技術思想として記載されている以上、上記開示が上記複合体を引用発明として認定する

ことの妨げとなるものではないし、引用発明の認定の場面において、選択が容易かどうかを問題とすべきものでもない。

したがって、原告の上記②の主張も理由がない。

(2) 以上によれば、引用例1から引用発明した本件審決に誤りはなく、原告主張の取消事由1は理由がない。

3 取消事由2（相違点(1)の容易想到性の判断の誤り）について

原告は、本願発明における「免疫活性化複合化一本鎖RNA」は、免疫反応を活性化する生得（抗原非依存性）の効果を有するものであり、かつ、それ自体が免疫活性化効果を有するという性質を有するものであるのに対し、引用例1には、トランスフェクトされるmRNAから細胞質基質において翻訳されたタンパク質抗原が抗原提示細胞上に提示され、これにより免疫反応を引き起こすこと、すなわち従来から知られている抗原特異的な免疫応答が開示されているにとどまるから、本願補正発明に係る免疫活性化複合化一本鎖RNAと、引用例1に開示されている複合体とでは、免疫を誘導するための機構が全く異なり、当業者が引用例1に基づき相違点(1)に係る構成を容易に想到し得たものということはできない旨主張する。

(1) 本願補正発明の「免疫活性化」の意義について

ア 本願の特許請求の範囲（請求項1）には、「免疫活性化」に関し、本願発明の「複合化一本鎖RNA」が、「1つ以上のオリゴペプチドと複合化された少なくとも1つのRNA（分子）を包含する免疫活性化複合化一本鎖RNA」であること、及び、上記「複合化一本鎖RNA」が「腫瘍または癌疾患、循環器病、感染症、（感染性）ウイルス性疾患、自己免疫疾患、（単）遺伝子疾患、および／またはアレルギーから選択される疾病の処置および／または予防における治療用」であることが規定されているが、「免疫活性化」の意義につき、非特異的な免疫反応を誘発することにより免疫活性化をすることを指すのか、抗原によって誘発される特異的な免疫反応

を誘発することにより免疫活性化をすることを指すのかを特定する記載はなく、また、具体的にどのような機序により「免疫活性化」がされ、上記の疾病の処置及び／又は予防における治療に用いられるかについて特定する記載もない。ましてや、「免疫活性化複合化一本鎖RNA」それ自体が、非特異的な免疫反応を誘発することを明示した記載はない。

イ 次に、本願明細書（甲1）には、「免疫活性化」の語を定義した記載はない。

そして、確かに、前記1(1)オ及び(2)エのとおり、本願明細書の段落【0059】ないし【0061】には、本願補正発明におけるRNAとして、生来の免疫反応を誘発できるアジュバントタンパク質をコードするRNAを用いると、mRNAの翻訳を介して生来の免疫反応を活性化することもできることが記載されているほか、段落【0092】ないし【0095】には、TLRのリガンドを表すRNA配列を含む免疫活性化RNAが、非特異的な免疫活性化（免疫応答）を亢進するために使用できることが記載されていることなどから、本願明細書には、本願補正発明の「複合化一本鎖RNA」を用いて、非特異的な免疫反応を誘発することにより免疫活性化をする複合化一本鎖RNAが記載されていることが認められる。

しかしながら、他方で、前記1(1)カ及び(2)エのとおり、本願明細書段落【0070】には、「本発明の複合化RNAの少なくとも1つのRNA（分子）は、抗原をコードしていてもよい。本発明では「抗原」という用語は、免疫系によって認識され、例えば抗体を形成することによって抗原特異的な免疫応答を誘発できる物質を指す。…内因性抗原としては、…細胞内で発生するウイルス起源の抗原をも含む。内因性抗原の分類の1つが、腫瘍抗原の分類である。」の記載があり、段落【0174】には「適切な免疫活性化を実現する薬学的組成物を得るために、1つ以上の抗原をコードするmRNAを直接血液細胞にトランスフェクトすれば、免疫活性化を

成功させるには充分なのである。」の記載があり、段落【0176】には「また、*in vitro*または*ex vivo*で使用されてもよいトランスフェクション法は、例えば本発明において言及される各種疾病の治療法として*in vivo*で使用しても非常に適切である。…特定の疾病の治療および／または予防は、通常、本発明の複合化RNAのRNAによってコードされた適切なタンパク質の選択に左右される。」との記載がある。また、本願明細書段落【0247】及び【0248】の実施例6及び図8では、本願補正発明に係る複合体をHeLa細胞に作用させると、ルシフェラーゼmRNAが翻訳されてルシフェラーゼ（タンパク質）が産生されることが記載されており、これは、抗原をコードするmRNAを用いれば、mRNAの翻訳を介した抗原特異的な免疫が活性化されることを示すものといえる。

そして、前記1(2)カのとおり、本願明細書には、本願補正発明の複合一本鎖RNAを用いることにより、RNAのトランスフェクション効率を改善し、抗原により誘発される特異的免疫反応、又は非特異的免疫反応を亢進することによって、免疫系を賦活化することができ、それにより腫瘍または癌疾患、（感染性）ウイルス性疾患などの疾病の治療及び／又は予防を行うことができるという効果を奏する（段落【0177】、【0178】、【0192】～【0194】）ことが記載されている。

以上によると、本願明細書には、抗原をコードするRNAを用いると、複合化されたmRNAが細胞内にトランスフェクトされた後、mRNAがタンパク質に翻訳されて抗原が産生され、特異的な免疫反応を誘発することにより免疫活性化をするという作用をする複合一本鎖RNAも記載されているものと認められる。

さらに、本願明細書の段落【0023】に、「本発明の文脈において、複合化RNAとは、本発明において定義するように、実験式(Arg)₁

； (L y s)_m； (H i s)_n； (O r n)_o； (X a a)_xによって表わされる1つ以上のオリゴペプチドでもって、RNAとオリゴペプチドとの間で非共有的複合体を形成することによって複合化された、RNA（分子）、好ましくはmRNAであると理解すべきである。…RNAと少なくとも1つのオリゴペプチドとの連結は、複合体の解離平衡状態にある。細胞内については、理論に縛られるわけではないが、RNAとオリゴペプチドとが解離した状態の方で平衡であるように思われる。」との記載があること、前記実施例6及び図8において、本願補正発明に係る複合体をHeLa細胞に作用させると、ルシフェラーゼmRNAが翻訳されてルシフェラーゼ（タンパク質）が産生されることが記載されており、これは、抗原をコードするmRNAを用いれば、mRNAの翻訳を介した抗原特異的な免疫が活性化されることが示されていることに照らすと、本願明細書には、オリゴペプチドと解離した状態のmRNAが、抗原特異的な免疫活性化の効果をもたらす「免疫活性化複合化一本鎖RNA」も記載されていることが認められる。

ウ 「免疫」の一般的な語義についてみても、「岩波生物学辞典第4版」（平成8年3月21日発行）（乙3）の「免疫反応」の項には「免疫現象に関係のある物質や細胞の生体内および生体外での反応の総体。免疫応答、抗原と抗体や補体との反応、免疫応答によって生じた機能細胞と抗原との反応など。」の記載があり、「免疫反応」につき抗原によって誘発されるものも含むことが認められることに照らすと、「免疫」の一般的な意味としては、非特異的なものに限られるものとは解されない。

これに対し、原告は、「免疫活性化」とは、免疫反応を活性化する生得（抗原非依存性）の効果を指すために一般的に広く用いられるものであるとして、「免疫」につき、非特異的な免疫を指すことが一般的である旨主張するが、これを裏付ける証拠の提出はなく、原告の上記主張は採用する

ことができない。

エ 以上によると、本件補正発明における「免疫活性化」は、その機序を問わず単に「免疫」を「活性化」することを特定するにとどまるのであって、非特異的な免疫（生得の免疫）と抗原特異的な免疫の両方の免疫の活性化を包含するものであり、非特異的な免疫（生得の免疫）に限定されることを意味するものと解することはできないし、本件補正発明の「免疫活性化複合化一本鎖RNA」それ自体が、非特異的な免疫活性化をもたらすもののみ限定されるものと解することもできない。

オ これに対し、原告は、本願補正発明が、「免疫活性化複合化一本鎖RNA」自体が、非特異的な免疫反応をもたらすもののみを特定することの根拠として、本願明細書の段落【0060】、実施例5（段落【0241】～【0246】）及び図7の記載を挙げる。

確かに、本願明細書の実施例5及び図7ではルシフェラーゼmRNAとノナアルギニンとの複合体によりhPBMC（ヒト末梢血単核球）からのTNF α の産生が誘導されており、これは非特異的な免疫反応が生じていることを裏付けるものである。

しかしながら、本願明細書には、抗原をコードするRNAを用いると、複合化されたmRNAが細胞内にトランスフェクトされた後、mRNAがタンパク質に翻訳されて抗原が産生され、特異的な免疫反応を誘発することにより免疫活性化をするという複合化一本鎖RNAも記載されていること、オリゴペプチドと解離した状態のmRNAが免疫活性化の効果をもたらす「免疫活性化複合化一本鎖RNA」も記載されていることは前記イのとおりであるから、本願明細書の段落【0060】、実施例5及び図7の記載は、本願補正発明が、非特異的な免疫（生得の免疫）活性化の効果をもたらす物を包含することを示す一例の記載にすぎないというほかなく、これらの記載が上記エの認定を覆すものではない。

なお、本願明細書の段落【0094】には、本願補正発明の「免疫活性化複合化一本鎖RNA」それ自体が非特異的免疫活性を有することが記載されているように理解し得る記載もあるが、上記に説示したところに照らせば、この記載も本願補正発明の一例を示すにすぎないものと認められる。

以上によると、原告の上記主張は理由がない。

(2) 引用例1記載の「免疫」の意義について

前記2(1)のとおり、引用例1には、「本明細書で使用される「対象物に免疫応答を誘導すること」という用語は、…抗原（またはエピトープ）に対する検出または測定可能な応答が…少なくとも約2倍、…またはそれ以上増大することを意味する。抗原（またはエピトープ）に対する免疫応答には、抗原特異的（またはエピトープ特異的）な抗体の産生、および自身の表面に抗原（またはエピトープ）に特異的に結合する分子を発現させる免疫細胞の産生が含まれる。」（前記2(1)ア(オ)。乙1，8頁下から4行～9頁4行），「好ましい実施形態では、RNAは翻訳可能なRNAである。」（前記2(1)ア(オ)。乙1，20頁9行目），「好ましい実施形態では、RNAは病原体、または、癌細胞など新生物（腫瘍）細胞からのものである。好ましい実施形態では、抗原は腫瘍細胞または病原体からのものである。…好ましい実施形態では、抗原は、癌細胞または病原体から単離された、または由来するRNAの形で、抗原提示細胞に送達される。」（前記2(1)ア(オ)。乙1，20頁24～29行目），「未成熟樹状細胞または成熟樹状細胞は、本発明のカチオン性ペプチド-RNA複合体を使用してトランスフェクトされることができ。トランスフェクトされた樹状細胞は、腫瘍および病原体感染などの疾病の治療に役立つ。」（前記2(1)ア(オ)。乙1，23頁2～4行目）との記載がある。

上記の各記載に照らすと、引用例1に記載された「免疫」は、細胞に、抗原をコードするmRNAを用いた複合体をトランスフェクトすることによ

り、mRNAの翻訳を介して抗原が産生され、その抗原により誘導される抗原特異的免疫を意図していること、特に、腫瘍細胞又は病原体の抗原をコードするmRNAを用いた複合体を、腫瘍又は病原体感染等の疾病の治療に役立てるものであることが理解できる。

(3) 相違点(1)の容易想到性の判断について

前記(1)及び(2)によると、本願補正発明と引用例1に記載された「免疫」とは、いずれも、抗原特異的免疫を含む点で一致している。

そして、前記(2)の引用例1の記載に接した当業者であれば、腫瘍や病原体感染等の疾病の治療に用いるために、引用発明に係る複合体において、緑色蛍光タンパク質をコードするmRNAに代えて、腫瘍細胞や病原体の抗原をコードするmRNAを用いることにより、mRNAの抗原への翻訳を介して免疫反応を誘導（免疫を活性化）し、引用発明において、相違点1に係る本願補正発明の構成とすることは、容易に想到することができたものと認められる。

したがって、本件審決の判断に誤りはなく、原告の主張の取消事由2は理由がない。

4 取消事由3（相違点(2)の容易想到性の判断の誤り）について

(1) 本願優先日当時の技術水準について

ア 本願優先日前に頒布された文献には以下の記載がある。

(ア) Basic peptide system for efficient delivery of foreign genes, *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1640, p. 129-136 (平成15年) (乙4)

「本研究で我々は、様々な細胞株を効率的にトランスフェクトするDNA複合体を形成するアルギニンペプチドについて報告した。ペプチドのトランスフェクション能力が、293T, HeLa, Jurkat, 及びCOS-7細胞における緑色蛍光タンパク質とβガラクトシダーゼ

の遺伝子発現により観察された。」（要約の3～5行）

「3. 1 ペプチド/DNA複合体の構造

ペプチド/DNA複合体の構造を評価するため、正のペプチド/負のDNAの電荷比に応じた複合体間の静電相互作用を測定するのにゲル電気泳動遅延が使用された。」（131頁右欄21～25行）

「β-ガラクトシダーゼの最高のトランスフェクションと発現は、ペプチド/DNA電荷比3：1で得られ、293TとHeLa細胞株でのペプチド濃度1μMに対応する（図3）。」（132頁右欄9～12行）

「図3 ペプチド/DNA複合体のトランスフェクションにおける電荷比の影響。細胞（293TまたはHeLa）は、試作されたペプチド/DNA複合体（ペプチド/DNAの電荷比が最大16：1まで変化）の存在下で2時間培養され、その後、それらは完全培地で置換された。48時間後、細胞抽出物を作成し、β-ガラクトシダーゼ活性が材料、方法の項に記述されるとおり決定された。実験はそれぞれのサンプルで少なくとも3回実施された。示された結果は、それぞれの測定において、平均値と標準偏差である。」（133頁図3の説明文）

(イ) 特表2006-519026号公報(乙5)

「【請求項14】

標的物質を細胞内へ導入するための組成物であって、A) 標的物質、B) アクチン作用物質、を含む、組成物。

【請求項15】

前記標的物質は、DNA、RNA、ポリペプチド、糖およびこれらの複合体からなる群より選択される物質を含む、請求項14に記載の組成物。」

「【0285】

…予想したように、高いトランスフェクション効率を実現するため

の重要な因子は、ポリマー内の窒素原子（N）の数とプラスミドDNA内のリン酸残基（P）の数との間の電荷バランス（N/P比率），ならびにDNA濃度である。一般的に，N/P比率および濃度における増大は，トランスフェクション効率の増大を生じる。並行して，本発明者らは，hMSCの溶液トランスフェクション実験における高いDNAおよび高いN/P比率の場合に，細胞生存率の有意な低下を観察した。…SPTAの場合，10のN/P比率が最適であることが見出され，細胞毒性を最小化しながら十分なトランスフェクションレベルを提供する。…」

(ウ) 国際公開第2006/085664号(乙6)

「本発明にいう核酸は，限定するものでないが，それが動物細胞デリバリーされたときに細胞に対して何らかの作用を及ぼしうる核酸または核酸関連物質を指す。化学構造により分類すると，所謂，オリゴまたはポリマーの範疇に入る，DNA，RNA及び核酸アナログ…が本発明にいう核酸に包含される。」（9頁4～10行目）

「本発明の組成物では，核酸とポリカチオン荷電性ポリマーとの混合比は，ポリマー中のカチオンと核酸分子内のリン酸基との比率（N/P比）で表すことができる。N/P比とは，次式によって定義される量であり，以後断りの無い限り，N/P比とはこの量のことを指す。

$$N/P \text{ 比} = \frac{\text{[溶液中のポリマー中のカチオンの総数]}}{\text{[溶液中の核酸中のりん酸基の総数]}}$$

本発明において，N/P比は，ポリイオンコンプレックスを形成できる限り限定されず，ポリマーに含まれる非荷電性セグメントまたは荷電性セグメントの性質によって異なる。本発明における適当なN/P比は，当業者であれば，適宜選択することができる。」（14頁19行目～15頁4行目）

「実施例1：DET，PEG-DETを用いた培養細胞（株化細胞）

への遺伝子導入

この実施例では、DET及びPEG-DETの細胞への遺伝子導入能を株化細胞に対するルシフェラーゼ遺伝子導入により評価する。・・・

<結果>

図1（判決注 N/P比を1～100まで変化させてルシフェラーゼ遺伝子発現を観察するものである。）に示すように、いずれの細胞においても、DET/pDNA complexでは、特に、N/P比10以上で高いルシフェラーゼ遺伝子発現が確認された。

PET-DET/pDNA complexでは、N/P比20以上で高い遺伝子発現が観察された。…また、DET、PEG-DETともN/P比が80を越える条件では発現が低下した。」（18頁下から11行目～20頁9行目）

「請求の範囲

1. ポリカチオン荷電性ポリマーを核酸のキャリアーとして含んでなる標的細胞または組織への核酸デリバリー用組成物であって、ポリカチオン荷電性ポリマーが、ポリ（アミノ酸）、多糖、…をベースとする主鎖を有し、かつ、側鎖として…を含む荷電性ポリマー…、核酸デリバリー用組成物。」（28頁1～14行目）

(エ) 特表2006-517793号公報（乙7）

「【請求項1】

標的遺伝子の発現を減少させるための方法であって、一本鎖オリゴリボヌクレオチドおよびPEIに細胞を曝すことを含み、該一本鎖オリゴリボヌクレオチドが該標的遺伝子によりコードされるmRNAと相補的な50未満のリボヌクレオチド領域を含み、該標的遺伝子がRNA干渉により下方制御されるものである、方法。」

「【0027】

標的遺伝子の下方制御のために必要な s s RNA の量は、経験的に決定され得、そして当業者の技術の範囲内である。カチオンポリマーの量は使用される s s RNA の量に依存する。P E I について、例えば、P E I の全窒素原子の数と s s RNA のリン酸基の数との比 (N/P 比) は、s s RNA の所定の量を効果的に送達するための P E I の量を決定するための好適なパラメータである。好ましい態様において、該 N/P 比は 2 ~ 10、さらに好ましくは 3 ~ 8 である。とりわけ好ましい比は 5 である。好ましい比は、取り込み後のエンドソームから複合体の取り込みおよび放出を可能にするために、オリゴヌクレオチドを効果的に複合体化させるのに必要な直鎖状 P E I の量 (すなわち窒素原子の量) である。」

(オ) Binding of Cationic α -Helical Peptides to Plasmid DNA and Their Gene Transfer Abilities into Cells, THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 272, p. 15307-15312 (平成 9 年) (乙 8)

「正の (ペプチド) / 負の (DNA) の電荷比は、それぞれ 0, 0. 10, 0. 25, 0. 50, 1. 0, 2. 0, 4. 0 と 8. 0 だった (図 2 A)。」 (15308 頁右欄末行 ~ 15309 頁 2 行目)

「トランスフェクション効率における 4_6 とプラスミド DNA の量の影響は図 7 に示される。最高のトランスフェクション効率は、 $2.5 \mu\text{g}$ のプラスミド DNA の量と 2.6 nmol の 4_6 が混合された場合に生じた。さらに、どれだけの量の DNA でも、ペプチド : DNA 混合比は 2.0 で最適化される。ペプチド : DNA 電荷比が 2.0 以下である場合、効率は下がった。」 (15311 頁右欄 11 ~ 17 行目)

「ペプチドとプラスミド DNA の最適な混合
細胞は、 16-mm ディッシュ毎に $0.66\text{--}5.3 \text{ nmol}$ の 4_6 と $1.3\text{--}10 \mu\text{g}$ のプラスミド DNA からなるペプチド-DNA 複合

体の存在下で培養された。培養した後、効率が後述の実験手順で解析された。上部のボックスの数値は、電荷比（ペプチド：DNA）を示す。」
(15311頁図7の説明文)

(カ) Stearylated Arginine-Rich Peptides: A New Class of Transfection Systems, Bioconjugate Chem., vol. 12, p. 1005-1011 (平成13年) (乙9)

「最高のルシフェラーゼ活性は、2：1のカチオン：アニオン電荷比で処理された細胞から得られた(図4A)。」(1008頁左欄23～25行目)

「(A) ステアリル化R₈を用いたプラスミドDNA (PGV-C2, 2.5 μg) でトランスフェクトされたCOS-7細胞からのルシフェラーゼ活性におけるカチオン：アニオン電荷比の影響。それぞれの棒は3つの結果の平均値を示す。今回の標準偏差はとても小さいので、誤差は図に表れていない。」(1008頁図4(A)の説明文)

イ 以上によると、DNAやRNA等の核酸を細胞に導入(トランスフェクト)するに当たり、リン酸(P)により負に帯電した核酸と塩基性アミノ酸(N)などにより正に帯電したカチオン性分子とを組み合わせることで複合体とすること、その際の核酸とカチオン性分子との混合比は窒素原子の数とリン酸基の数との比(N/P比)で表されるところ、N/P比がトランスフェクション効率に影響すること、そのため、核酸とカチオン性分子の組合せに応じて、N/P比を変化させて、トランスフェクション効率が高くなるN/P比を最適化すること、その際には、例えば前記ア(イ)ないし(カ)で示されるような0.1～100といった幅広い数値が検討されることは、本願優先日当時の周知技術であったものと認められる。

(2) 相違点(2)の容易想到性の判断について

ア N/P比について

(ア) 引用例1には、「本発明のカチオン性ペプチド-RNA複合体は、一つのカチオン性ペプチドと複数のRNA、複数のカチオン性ペプチドと一つのRNA、一つのカチオン性ペプチドと一つのRNAで形成される複合体を包含する。カチオン性ペプチドの長さ、配列、電荷は、RNAの長さ、配列、及び、それらの濃度と同様に、カチオン性ペプチドとRNAの比を決定するための関連要因である。効率的な複合体形成や導入のために、カチオン性ペプチドとRNAの比や濃度を最適化することは当業者にとって容易である。」の記載があり(乙1, 23頁12~18行目)、実施例1においても、「Portカチオン性ペプチドとRNAの複合比は、RNA分子数へのペプチド分子数の割合として、分子間の電荷比によって算出される。」の記載がある(乙1, 26頁下から6~5行目)。そうすると、引用発明においても、複合体の効率的な細胞内への導入のために、カチオン性ペプチドとRNAの混合比について検討する必要があるものといえる。

そして、前記(1)の周知技術を踏まえると、引用発明において、最適なトランスフェクション効率を達成するために、複合性のカチオン性ペプチドの正電荷とRNAの負電荷のバランスに着目して、複合体の「1つのRNA(分子)の、1つ以上のオリゴペプチドに対する窒素/リン酸塩比(N/P比)」に着目し、これを変化させて最適化し、その値を、0.1~100の範囲内の値である0.5~50とすることは当業者において適宜行うことができたものと認められる。

(イ) a これに対し、原告は、引用例1には、緑色蛍光タンパク質をコードするmRNAの長さについて一切記載がない上に、緑色蛍光タンパク質をコードするmRNAの長さは、コード領域のヌクレオチドの数に依存するだけでなく、mRNAの5'非翻訳領域及び3'非翻訳領域の長さにも依存することに照らすと、引用発明の緑色蛍光タンパク

質のmRNAの塩基数が700塩基程度であることが本願優先日当時の技術常識であるとの本件審決の認定は誤りであり、引用例1に基づいて導き出せる事項は、せいぜい、引用発明の緑色蛍光タンパク質をコードするmRNAの長さは、確実に700塩基より極めて大きいであろうということだけにすぎないから、このような引用例1の開示事項から、本願発明の相違点(2)に係る構成が示唆されることはない旨主張する。

確かに、本件審決は、引用発明の緑色蛍光タンパク質のmRNAの塩基数が700塩基程度であることが技術常識であることを前提に、引用発明におけるN/P比が1.14である旨の認定をしているが、他方で、相違点(2)の容易想到性の判断に当たり、上記のN/P比の値を根拠とすることなく、N/P比を最適化し0.5～50の範囲内とすることは適宜行うことであると判断しているものであるから、上記技術常識が誤りであるかどうかは、本件審決の判断の誤りの有無に影響を及ぼすものではない。

そして、引用発明に基づき相違点(2)のN/P比の構成を容易に想到し得ることは、前記(ア)のとおりである。

したがって、原告の上記主張は理由がない。

- b 原告は、トランスフェクションのしやすさは、N/P比だけでは決定されず、当然、複合体の大きさなど、様々な要素が影響し、ある複合体について、トランスフェクションの効率上好ましいとされるN/P比を、トランスフェクションの対象が異なるものに適用することはできないところ、前記(1)アの各文献に記載されたヌクレオチドは、引用発明のものよりも短かったり(乙7)、トランスフェクトするヌクレオチドがRNAでなくDNAであったり(乙4, 8, 9)するもので、引用発明の複合体の構成要素とは異なるから、これらの文献を根

拠に引用発明から相違点(2)のN/P比の構成を容易に想到し得るとはいえない旨主張する。

しかしながら、前記(1)ア(イ)ないし(エ)のとおり、DNAの場合のみならずRNAとカチオン性ペプチドの複合体をトランスフェクションする場合にもN/P比を考慮する必要があるところ、その際、前記(1)ア(イ)及び(ウ)のように、DNAとRNAが同様に挙げられているように、DNAとRNAは同じ核酸に属する負電荷を持つ物質なのであるから、RNAとカチオン性ペプチドとの混合比を検討するに当たり、DNAを対象としてカチオン性ペプチドとの混合比の指標として認識されているN/P比を参考にして、引用発明のようなRNAとカチオン性ペプチドの混合比を適宜設定することは、当業者において十分になし得ることといえる。

また、乙7に記載されたヌクレオチドの長さが引用発明におけるものよりも短いものであるとしても、前記(1)ア(エ)のとおり、乙7も、核酸とカチオン性分子の組合せに応じてN/P比を変化させ、トランスフェクション効率が高くなるN/P比を最適化することを開示するものであって、その手法に本質的な違いがあるわけではないから、前記周知技術を認定する根拠とすることに問題はない。

よって、原告の上記主張は理由がない。

- c 原告は、本件審決が、本願補正発明のN/P比について臨界的意義が認められないとしたことにつき、引用発明では、免疫反応に関して、抗原をコードする核酸で形質転換された細胞において、コードされた抗原を発現させることが記載されているのみであるのに対し、本願補正発明は、あらゆる抗原の発現及び提示を含まない、生得の免疫反応を引き起こすことを課題として、これを解決するものであり、その効果も開示されており、このように、本願補正発明と引用発明とでは、

解決しようとする課題が異なり，得られる効果も異質であるから，引用発明に基づく本願補正発明の進歩性を判断するに際して，N/P比の値に関する臨界的意義を問題とする必要はない旨主張する。

しかしながら，原告の本願補正発明と引用発明との解決課題や効果が異なるとの主張に理由がないことは前記3のとおりであるから，原告の上記主張はその前提を欠き理由がない。

イ モル比について

(ア) ある特定の核酸とカチオン性ペプチドの複合体において，N/P比が定まればモル比も当然に定まるし，N/P比が変化すればモル比も変化するなど，N/P比とモル比とは互いに連動するものであって，両者を独立して制御することはできない。

引用例1には，「好ましい実施形態では，RNAは病原体，または，癌細胞などの新生物（腫瘍）細胞からのものである。好ましい実施形態では，抗原は腫瘍細胞または病原体からのものである。好ましくは，腫瘍細胞は腎癌の癌細胞，多発性骨髄腫細胞，慢性リンパ性白血病細胞，またはメラノーマ細胞である。好ましい病原体は，HTVおよびHCVである。」の記載があるところ（前記2(1)ア(オ)），例えば，メラノーマ細胞由来の抗原であるgp100，MART-1や，乳癌細胞由来の抗原であるMUC-1などの代表的な腫瘍抗原のmRNAに相補的なcDNAは，いずれも1000塩基以上であり（乙10の図6，乙11の図1，及び乙12の図3），これらのRNAも1000塩基以上となること，引用発明で用いられる緑色蛍光タンパク質のmRNAの長さも1000塩基以上となるものが知られていること（甲4）に照らすと，mRNAにつき，その長さが1000塩基以上のものが想定可能であることは本願優先日当時の技術常識であるといえることができる。そして，ヌクレオチド1塩基につきリン酸基（P）は一つであるから，長さが10

00塩基以上のmRNAにおけるPの数も1000以上となる。

また、Port-3カチオン性ペプチドは、1分子当たり8個の塩基性アミノ酸を含むことが明らかである。

そうすると、引用発明において長さが1000塩基以上のmRNAを採用し、N/P比として前記アの0.5～50の値を用いて最適化をすれば、mRNA1分子当たりのPort-3カチオン性ペプチドは62.5分子以上～6250分子以上（ $0.5 \times 1000 \div 8 = 62.5 \sim 50 \times 1000 \div 8 = 6250$ ）となり、本願補正発明におけるモル比の構成を包含することになる。

以上のとおり、N/P比が変化すればモル比も変化するなど、N/P比とモル比とは互いに連動するものであること、引用発明において、N/P比として前記アの0.5～50の値を用いれば、技術常識として知られたmRNAの長さを前提とした場合、当然にそのモル比が相違点(2)のモル比の構成を包含することになることに照らすと、引用発明においても、当業者はそのモル比を適宜選択することができたものと認められる。

(イ) a これに対し、原告は、引用例1には、ペプチド：RNA複合体比が100：1～1：1の範囲にある、つまり、RNA分子1個当たり、最大でもペプチドは100個以下であると明確に記載しており、これ以外に数値範囲についての記載はなく、しかも、引用発明における上記数値範囲は、本願補正発明と異なる引用例1記載の発明の目的である、細胞形質転換及び細胞サイトゾル内でのmRNA翻訳に適合されたものであるから、単なる例示ではなく、引用発明において上記の数値範囲とする動機付けがない旨主張する。

しかしながら、前記2(1)ア(オ)のとおり、引用例1には、「本発明のカチオン性ペプチド-RNA複合体は、一つのカチオン性ペプチド

と複数のRNA，複数のカチオン性ペプチドと一つのRNA，一つのカチオン性ペプチドと一つのRNAで形成される複合体を包含する。カチオン性ペプチドの長さ，配列，電荷は，RNAの長さ，配列，及び，それらの濃度と同様に，カチオン性ペプチドとRNAの比を決定するための関連要因である。効率的な複合体形成や導入のために，カチオン性ペプチドとRNAの比や濃度を最適化することは当業者にとって容易である。」の記載がある。

しかも，前記(1)のとおり，N/P比がトランスフェクション効率に影響し，核酸とカチオン性分子の組合せに応じて，N/P比を変化させて，トランスフェクション効率が高くなるN/P比を最適化すること，その際には，0.1～100といった幅広い数値が検討されることは周知のことであったところ，前記(ア)のとおり，N/P比が変化すればモル比も変化するなど，N/P比とモル比とは互いに連動するものである。

そうすると，当業者は引用例1におけるPort-3カチオン性ペプチドとRNAの複合比100：1～1：1の数値範囲についても，これに限定されるものではないものと理解するものといえ，引用例1における上記数値範囲の記載は，引用発明においてこれ以外の数値を採用することの妨げとなるものということとはできない。

また，原告は，仮に，引用発明の上記の数値範囲が単なる一例を示したものにすぎないとしても，引用例1に記載された，トランスフェクションして生成されるタンパク質抗原による免疫誘導という課題ではなく，引用例1に記載のない複合体自体がTLRに結合することによる免疫活性という本願補正発明の課題を検討して初めて，相違点(2)の構成に係るモル比を想到し得るものである旨主張するが，その前提（本願補正発明と引用発明の課題や効果が全く異なるとの前提）に疑

間があるのみならず（前記ア(イ)）、当業者において引用発明のモル比を適宜設定できたといえることは前記(ア)のとおりである。

したがって、原告の上記主張は理由がない。

b 原告は、仮に引用例1記載の緑色蛍光タンパク質をコードするmRNAの塩基長として甲4記載の1000塩基よりわずかに大きい緑色蛍光タンパク質をコードするmRNAの塩基長を用いたとしても、引用発明の複合体のN/P比を本願補正発明において特定された0.5～50の範囲とするためには、引用発明におけるRNAとPorter-3カチオン性ペプチドの複合比（モル比）は、少なくとも1:62.5以上とならねばならず、結局、引用発明の同比1:1～1:100のうち、1:62.5～1:100というわずかな範囲で実現されるのみであって、それ以外の範囲では実現されず、引用発明における緑色蛍光タンパク質をコードするmRNAの長さがより長ければ、本願補正発明において特定されたN/P比の範囲を満たすためのRNA1個に対するペプチドのモル比の範囲は更に狭くなるから、引用発明において、本願補正発明において特定されるようなN/P比の範囲となるようなモル比を選択するための具体的な教示があるということではできない旨主張する。

しかしながら、原告の上記主張は、引用発明におけるPorterカチオン性ペプチドとRNAの複合比（モル比）につき100:1～1:1に限定されることを前提とするものであると解されるが、その前提が採用できないことは前記aのとおりである。

したがって、原告の上記主張はその前提を欠き理由がない。

c 原告は、引用発明におけるRNA複合体につき、RNAに対するペプチドのモル比が250以上（かつ、本願の特許請求の範囲の請求項1に特定するN/P比）であるようにすると、そのような重い複合体

は細胞質に到達できず、仮にイン・ビトロ等で人工的に細胞質に到達させたとしても、複合体中のRNAが複合化しているペプチドに「遮蔽」されてしまい、細胞質内のリボソームがRNAに翻訳可能なように結合できず、抗原が全く発現されないことが当業者において知られているから、当業者において、引用発明のRNAに対するペプチドのモル比を250以上（かつ、本願の特許請求の範囲の請求項1に特定するN/P比）とすることはない旨主張する。

しかしながら、本願の優先日当時、モル比が250以上となるような一つのRNA分子に対して多くのペプチドが複合したRNA複合体につき、細胞質内のリボソームに到達できないとか、複合体中のRNAが複合化しているペプチドに遮蔽されてしまい、細胞質内のリボソームがRNAに翻訳可能なように結合できないとの技術的知見が存在したことを示す証拠の提出はない。

かえって、本願明細書の実施例4（段落【0240】）及び図8には、ルシフェラーゼmRNAを用いて、(Arg)₉: luc-RNAの質量比が10:1～1:1（モル比が1:384以上）の重いRNA複合体とした場合も、HeLa細胞においてmRNAの翻訳が行われルシフェラーゼが産生されたことが示されている。

なお、原告は、上記の本願明細書の実施例4及び図8の実験結果はイン・ビトロのものであり、イン・ビボでは発現量が低く、同様の結果は得られないことは当業者において周知であるとし、その根拠として甲10（試験報告書）を提出するが、甲10には試験の具体的条件等の記載もなく、これを上記の原告の主張の裏付けとすることはできない。そして、他に原告の上記主張を裏付ける証拠もない。

以上によると、原告の上記主張は理由がない。

d 原告は、本件審決が、モル比を1:250以上とすることにつき、

臨界的意義が認められない旨判断していることに対し、前記ア(イ) c の N/P 比の場合と同様の理由により、モル比の点について臨界的意義を問題とすべきでない旨主張するが、前記ア(イ) c と同様の理由により原告の主張は理由がない。

また、原告は、本願明細書の図 7、実施例 8、図 10 及び図 11、実施例 11、図 21 及び図 22 によれば、本願補正発明は、モル比を 1 : 250 以上とすることにより引用発明から予測される範囲を超えた顕著な効果を奏する旨主張する。

しかながら、原告の上記主張は、本願補正発明が、免疫活性化複合化一本鎖 RNA それ自体が非特異性の免疫反応のみを誘発するものであると認定されることを前提に、その効果について主張するものであるが、本願補正発明が、免疫活性化複合化一本鎖 RNA それ自体が非特異性の免疫反応を誘発する物のみに限定されるものではないことは、前記 3 のとおりである以上、原告の上記主張はその前提を欠き理由がない。

なお、本願明細書の実施例 8、図 10 及び図 11 で用いられた免疫活性化複合化一本鎖 RNA (ヘプタアルギニン (Arg)₇) は、オリゴペプチドの長さが 7 であり、本願補正発明の構成 (ペプチドの長さが 8 ~ 15) とは異なる複合体を用いたものであるから、上記実施例等を本願補正発明の効果を裏付けるものということとはできない。

ウ 以上によると、引用発明において N/P 比及びモル比につき相違点 (2) の範囲内とすることは、当業者が適宜行うことであり、そのような数値限定をすることの臨界的意義は認められないとした本件審決の判断に誤りはなく、原告主張の取消事由 3 は理由がない。

5 結論

以上の次第であるから、原告主張の取消事由はいずれも理由がなく、本件審

決にこれを取り消すべき違法は認められない。

したがって、原告の請求は棄却されるべきものである。

知的財産高等裁判所第3部

裁判長裁判官 鶴 岡 稔 彦

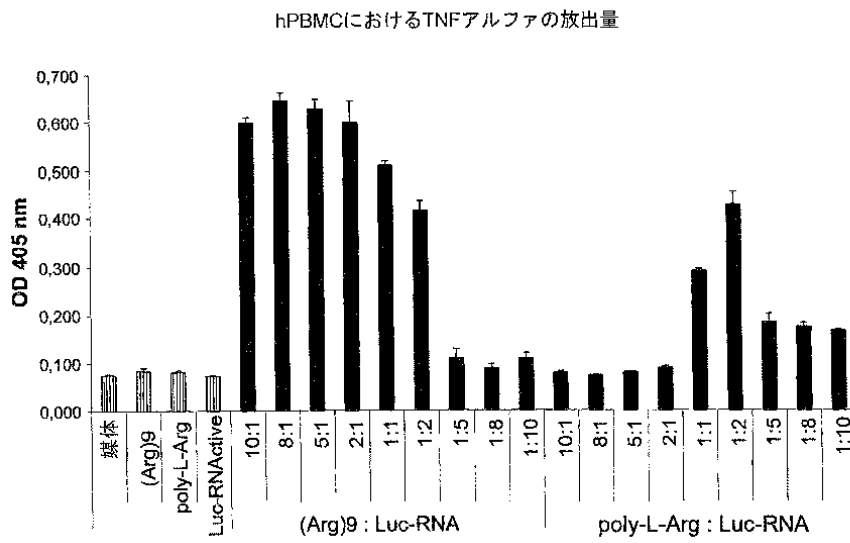
裁判官 大 西 勝 滋

裁判官 神 谷 厚 毅

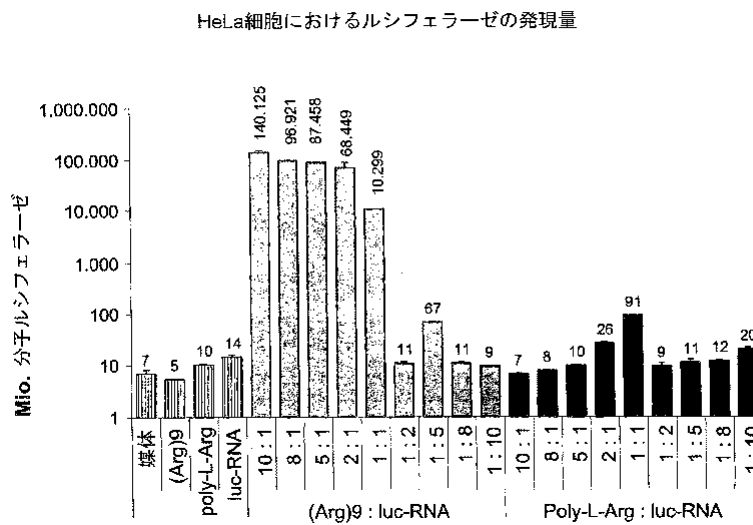
(別紙)

明細書図面

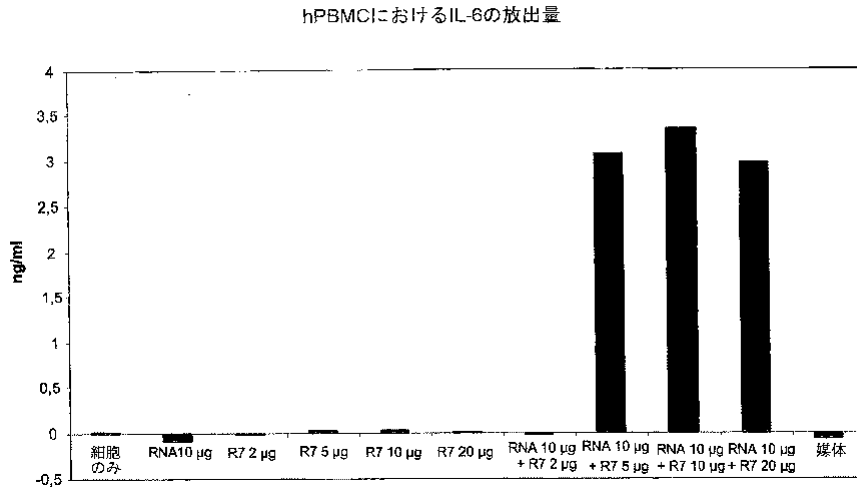
【図 7】



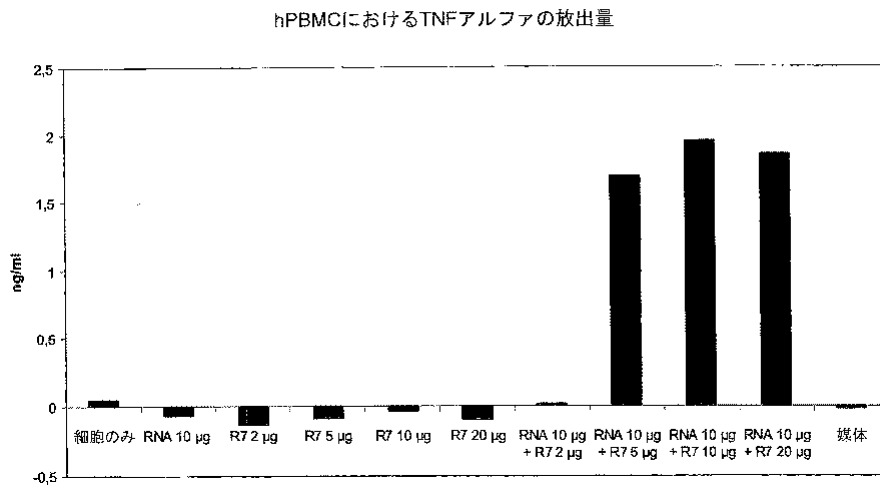
【図 8】



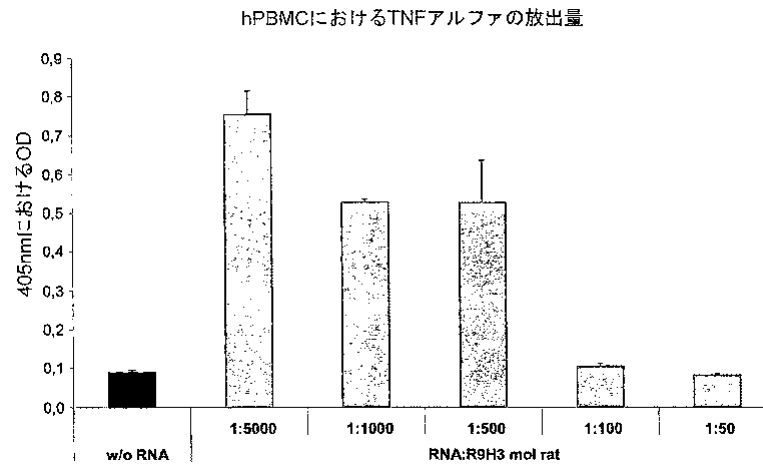
【図10】



【図11】



【図 2 1】



【図 2 2】

