

令和4年11月30日判決言渡

令和3年（行ケ）第10135号 審決取消請求事件

口頭弁論終結日 令和4年9月28日

判 決

5

原 告 ザ・チルドレンズ・ホスピタル
・オブ・フィラデルフィア

10

同訴訟代理人弁護士 笠 継 正 勲
同訴訟代理人弁理士 村 越 智 史

15

被 告 特 許 庁 長 官
同 指 定 代 理 人 伊 藤 良 子
同 福 井 悟
同 吉 森 晃
同 井 上 千 弥 子
主 文

20

- 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

25

特許庁が不服2019-6665号事件について令和3年6月23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（当事者間に争いが無い。）

- 5 (1) 原告は、発明の名称を「スタッファー／フィラーポリヌクレオチド配列を含むベクターおよびその使用方法」とする発明について、平成26年3月14日に国際出願（特願2016-502935号。優先日平成25年3月15日、優先権主張国米国。以下「本願」という。）をした。
- (2) 原告は、平成31年1月17日付けで拒絶査定を受けたため、同年5月22日付けで拒絶査定不服審判（不服2019-6665号事件）を請求するとともに、同日付けで特許請求の範囲について手続補正をした。
- 10 (3) 原告は、令和2年9月2日付けで拒絶理由通知を受けたため、令和3年3月3日付けで特許請求の範囲について手続補正をし、また、同月4日付けで特許請求の範囲について手続補正をした（以下、同日付けの補正を「本件補正」という。）が、特許庁は、同年6月23日、「本件審判の請求は、成り立たない。」との審決（以下「本件審決」という。）をし、その謄本は、同
- 15 年7月13日に原告に送達された（附加期間90日）。
- (4) 原告は、令和3年11月9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

20 本件補正後の特許請求の範囲は、請求項1ないし50からなり、その請求項1及び30の記載は、次のとおりである（以下、本件補正後の請求項30に係る発明を「本願発明30」といい、請求項1に係る発明と併せて「本願発明」ということがある。）。

【請求項1】

25 異種ポリヌクレオチド配列を含むベクターゲノムと、
第1の不活性のフィラーまたはスタッファーポリヌクレオチド配列を含んでなり、

前記異種ポリヌクレオチド配列が4.7 Kbを下回る長さを有し、かつアデノ随伴ウイルス(AAV)の二つのITR配列の内側に位置し、前記不活性のフィラーまたはスタッパーポリヌクレオチド配列はアデノ随伴ウイルス(AAV)の二つのITR配列の外側に位置し、該第1の不活性のフィラーまたはスタッパーポリヌクレオチド配列が7.0ないし10.0 Kbの長さを有する組換えベクタープラスミド。

【請求項30】

請求項1ないし27のいずれかの組換えベクタープラスミドのベクターゲノムを含んでなるAAV粒子。

3 本件審決の要旨

(1) 本願発明30

本願発明30は、本願の請求項1ないし27を引用する形式で記載されているところ、そのうちの請求項1を引用する部分に係る発明は以下のとおりである。

- a 異種ポリヌクレオチド配列を含むベクターゲノムと、
- b 第1の不活性のフィラーまたはスタッパーポリヌクレオチド配列を含んでなり、
 - a-1 前記異種ポリヌクレオチド配列が4.7 Kbを下回る長さを有し、かつアデノ随伴ウイルス(AAV)の二つのITR配列の内側に位置し、
 - b-1 前記不活性のフィラーまたはスタッパーポリヌクレオチド配列はアデノ随伴ウイルス(AAV)の二つのITR配列の外側に位置し、該第1の不活性のフィラーまたはスタッパーポリヌクレオチド配列が7.0ないし10.0 Kbの長さを有する組換えベクタープラスミドのベクターゲノムを含んでなるAAV粒子。

(2) 本件優先日（平成25年3月15日）前に日本又は外国において頒布された刊行物（Molecular Therapy. (2009) vol.17, no.1, p.144-152。以下「引用例1」という。）に記載された発明（以下「引用発明」という。）

「アンピシリン耐性遺伝子を含む6980bpのバックボーン、及びヒト凝固第IX因子をコードする4297ntの導入遺伝子を有するITR含有ベクタープラスミドをHEK293細胞にトランスフェクションして調製された、当該ITR含有ベクタープラスミド由来のDNA不純物が有意に減少した組換えAAV。」

(3)ア 新規性欠如

10 本願発明30に係る「AAV粒子」は、本願発明30における「組換えベクタープラスミド」の、AAVの二つのITR配列と、その内側に位置し、4.7Kbを下回る長さを有する異種ポリヌクレオチド配列を含む領域と、当該領域の外側、すなわち、AAVの二つのITR配列の外側に位置する領域に由来する残存プラスミドDNAをごく少量（60pg/10⁹vg程度）含む「ベクターゲノム」を含んでなるものである。

引用発明に係る「組換えAAV」は、引用発明における「ITR含有ベクタープラスミド」のAAVの二つのITR配列と、その内側に位置し、
「ヒト凝固第IX因子をコードする4297ntの遺伝子」を含む領域と、当該二つのITR配列の外側に位置する6980bpの領域に由来する
20 DNA不純物を少量含む「ベクターゲノム」を含んでなるものである。

ここで、引用発明における「ヒト凝固第IX因子をコードする4297ntの遺伝子」は、本願発明30における「4.7Kbを下回る長さを有する異種ポリヌクレオチド配列」に相当する。

また、引用発明における「DNA不純物」は、引用発明における「ITR含有ベクタープラスミド」の二つのITR配列の外側に位置する6980bpの領域に由来するものであるから、本願発明30における「残存プ
25

ラスミドDNA」に相当する。そして、引用例1に記載された「オーバーサイズ（6980bp）のバックボーンを有するベクタープラスミドを用いて調製された5つのロット（ロット06002、003A、NHP、0802、0803）」は、ITR含有ベクタープラスミド由来のDNA不純物を11～17.7pg/10⁹vg（平均14.2±2.6pg/10⁹vg）含んでいるところ、この数値は、本願明細書で示されている残存プラスミドDNAの量（60pg/10⁹vg程度）と同等であるから、引用発明に係る「組換えAAV」のベクターゲノムに含まれている「DNA不純物」、すなわち、「残存プラスミドDNA」は、本願発明30と同程度にごく少量であるといえる。

そうすると、本願発明30に係る「AAV粒子」に含まれている「ベクターゲノム」と、引用発明に係る「組換えAAV」に含まれている「ベクターゲノム」とは、いずれも、AAVの二つのITR配列と、その内側に位置し、4.7Kbを下回る長さを有する異種ポリヌクレオチド配列を含む領域と、当該二つのITR配列の外側に位置する領域に由来する残存プラスミドDNAをごく少量含む点で相違ないから、そのような「ベクターゲノム」を含むAAVである、本願発明30に係る「AAV粒子」と引用発明に係る「組換えAAV」との間にも相違はないことになる。

したがって、本願発明30は、引用例1に記載された発明である。

イ 進歩性欠如

仮に、本願発明30に係る「AAV粒子」と、引用発明に係る「組換えAAV」との間に差異があったとしても、そのような差異はわずかであるといえ、本願発明30は、引用発明、引用例1の記載、及び本願優先日当時のAAVに関する周知技術に基づいて、当業者が容易になし得た発明であって、本願の願書に添付した明細書（甲2。以下、図面を含めて「本願明細書」という。）の記載を参酌しても、本願発明30が奏する効果に顕

著な点があるとはいえない。

したがって、本願発明30は、引用発明、引用例1の記載及び本願優先日当時のAAVに関する周知技術に基づいて、当業者が容易になし得た発明である。

- 5 (4) 以上のとおり、本願発明30は、特許法29条1項3号及び2項に該当し、特許を受けることができないから、他の請求項に係る発明について検討するまでもなく、本願は拒絶されるべきものである。

4 取消事由

10 本願発明30の新規性及び進歩性に係る判断の誤り（引用発明との相違点の看過、一致点の認定の誤り）

第3 当事者の主張

1 原告の主張

- (1) 相違点(不活性のフィラー又はスタッファーポリヌクレオチド配列の長さ)の看過

15 ア 本願発明30と引用発明を対比すると、本願発明の組換えベクタープラスミドは、7.0ないし10.0Kbの長さを有する第1の不活性のフィラー又はスタッファーポリヌクレオチド配列を有するのに対し、引用発明のITR含有ベクタープラスミドは、6.98Kbよりも短い不活性のフィラー又はスタッファーポリヌクレオチド配列を有する点で相違する。本
20 件審決には、この点を相違点として認定していない誤りがある。

すなわち、本願発明30に係る請求項30は、「請求項1のベクタープラスミドのベクターゲノムを含んでなるAAV粒子」であるとの発明特定事項を含むものであり、請求項1は「異種ポリヌクレオチド配列を含むベクターゲノム」との発明特定事項を含むから、本願発明30のベクターゲ
25 ノムは、「異種ポリヌクレオチド配列」を含む。また、本願発明30の「ベクターゲノム」は、異種ポリヌクレオチド配列のほかには微量ではあるが残

存DNA不純物を含むものであるところ、AAV粒子に含まれる残存DNA不純物の量は、組換えベクタープラスミドに含まれるバックボーン長さによって変わる（【0172】、【0177】、図5、図6）。そして、本願明細書の【0083】、図5に記載されているように、第1の不活性のフィラー又はスタッパーポリヌクレオチド配列は、ベクタープラスミドのバックボーンに存在するから、AAV粒子に含まれる残存DNA不純物の量は、組換えベクタープラスミドに含まれるバックボーン中の第1の不活性のフィラー又はスタッパーポリヌクレオチド配列の長さ（本願発

5

10

15

他方、引用発明の組換えAAVは、アンピシリン耐性遺伝子を含む6980bpのバックボーンを含むベクタープラスミドをトランスフェクションすることで調製されるものであり、バックボーンのサイズは6980bpであるから、そのバックボーン中のフィラー又はスタッパーポリヌクレオチド配列のサイズは、当然ながら6980bp（6.98Kb）よりも短くなる。そうすると、引用発明の組換えAAVは、6980bpより短い長さのフィラー又はスタッパーポリヌクレオチド配列に応じた量の残存DNA不純物を有する。

20

また、後記(2)のとおり、本願発明30と引用発明における各AAV粒子に含まれる残存DNA不純物の量の相違は、上記の不活性のフィラー又はスタッパーポリヌクレオチド配列の長さの相違によるものであるといえるから、不活性のフィラー又はスタッパーポリヌクレオチド配列の長さの相違は実質的な相違点であるといえる。

25

したがって、不活性のフィラー又はスタッパーポリヌクレオチド配列の長さの違いが相違点として認定されるべきである。

イ これに対して、被告は、後記2(1)アのとおり、不活性の7.0ないし10.0Kbの長さを有するフィラー又はスタッパーポリヌクレオチド配

列は、本願発明30のAAV粒子に含まれる構成要素ではない旨主張する。

しかし、本願明細書の【0172】には、「ベクタープラスミド『バックボーン』DNAのパッケージングが、ITRからの『逆転パッケージング』を介してかなりの程度で起こり」との記載があるように、組換えベクタープラスミドのITR外側にあるバックボーンは、逆転パッケージングというメカニズムによりAAV粒子に残存DNA不純物としてパッケージングされる。

また、前記アのとおり、AAV粒子に含まれる残存DNA不純物（残存プラスミドDNA）の量は、バックボーンの長さに応じて変わるものであり、バックボーンの長さは「不活性のフィラーまたはスタッファーポリヌクレオチド配列」の長さによって規定されるものであるから、本願発明30における「第1の不活性のフィラーまたはスタッファーポリヌクレオチド配列が7.0ないし10.0Kbの長さを有する」という点は、引用発明との相違点と判断する際にAAV粒子に残存DNA不純物がどの程度含まれるかという観点から考慮されるべき発明特定事項である。

したがって、被告の主張は誤りである。

(2) 一致点（残存DNA不純物量が同程度である。）の認定の誤り

ア(ア) 本件審決は、前記第2の3(3)アのとおり、本願発明におけるDNA不純物の含有量とされている $60 \text{ pg} / 10^9 \text{ vg}$ と引用発明におけるDNA不純物の含有量である $14.2 \pm 2.6 \text{ pg} / 10^9 \text{ vg}$ とを比較してDNA含有量が同程度にごく少量であると結論づけている。しかし、以下のとおり、6.9Kbの長さのサイズ超過バックボーンを用いて調製されたベクター中のプラスミドDNA不純物の量の平均が $60 \text{ pg} / 10^9 \text{ vg}$ であることを理由にして、このような一致点の認定をすることは誤りである。

(イ) 本願明細書には、7.0ないし10.0Kbの長さの第1の不活性の

ファイラー又はスタッパーポリヌクレオチド配列を含む組換えベクタープラスミドをパッケージ化したAAV粒子に含まれる残存DNA不純物の量について直接の記載はないものの、本願明細書の図5には、2.5 Kbのバックボーンを含むベクタープラスミドがパッケージ化された比較例としてのAAVベクターのマップ（図5の上側）、7.1 Kbのバックボーンを有するベクタープラスミドがパッケージ化された実施例2に係るAAVベクターのマップ（図5の下側）が示されており、実施例2に係るAAVに含まれるDNA不純物の量は、2.5 Kbのバックボーンを有するベクタープラスミドを用いて調製されたAAVに含まれるDNA不純物の量の約40分の1にまで減少することが開示されている。そして、図5には、AAV粒子に残存するDNA不純物の量は記載されていないが、比較例のバックボーンの長さは、引用例1に示されている2620 bp又は2638 bp（2.62 Kb又は2.638 Kb）と近い2.5 Kbであるため、比較例におけるAAV粒子に含まれるDNA不純物の量は、引用例1に示されているDNA不純物の数値（2620 bp又は2638 bpのバックボーンを有するベクタープラスミドを用いて調製されたAAVには平均値 $107.6 \pm 27.6 \text{ pg} / 10^9 \text{ vg}$ のDNAが含まれていたことが記載されている（別紙2の1-2）。）と同程度のDNAと考えられる。そうすると、7.1 Kbのバックボーンを有するベクタープラスミドをパッケージ化された実施例2に係るAAV粒子に含まれるDNA不純物の量は、引用例1に示される値の40分の1である $2.69 \pm 0.69 \text{ pg} / 10^9 \text{ vg}$ 程度であると推定される。

また、本願明細書の【0177】、図6には、サイズ超過バックボーンを含まないベクタープラスミドを用いて調製されたベクター中のプラスミドDNA不純物の平均は、 $301 \text{ pg} / 10^9 \text{ vg}$ であり、このDN

A不純物の量は、6.9 Kbの長さのサイズ超過バックボーンを用いて調製されたベクター中のプラスミドDNA不純物の量の平均である60 pgと比較して5倍であったことが開示されているが、図5には、図6で示されている6.9 Kbよりも長い7.1 Kbの長さのサイズ超過バックボーンを用いることで残存DNA不純物の量が1/40減少することが記載されているから、本願明細書の記載により、サイズ超過バックボーンの長さを長くすることで残存DNA不純物の量の減少幅が大きくなると当業者は理解することができる。そして、本願発明30の組換えベクタープラスミドは、7.0ないし10.0 Kbの長さの第1の不活性のフィラー又はスタッパーポリヌクレオチド配列を含むから、バックボーンの長さは7.1 Kbを超えるものであり、7.1 Kbよりも長いバックボーンを含む組換えベクタープラスミドをパッケージ化した本願発明30のAAV粒子に含まれる残存DNA不純物の減少割合は、実施例2で説明される1/40よりも大きいと理解できる。したがって、本願発明30のAAV粒子に含まれる残存DNA不純物の量は、 $2.69 \pm 0.69 \text{ pg} / 10^9 \text{ vg}$ よりも更に少なくなると理解することができる。

(ウ) 他方、引用文献1には、6980 bpのバックボーンを有するベクタープラスミド（ロット 06002、003A、NHP、0802、0803）で測定された平均残留プラスミドDNAレベルは、 $14.2 \pm 2.6 \text{ pg} / 10^9 \text{ vg}$ であったことが記載されている（別紙2の1-2）。

(エ) 以上を前提として、本願発明30と引用発明とを対比すると、引用発明のAAV粒子には、 $14.2 \pm 2.6 \text{ pg} / 10^9 \text{ vg}$ 程度のDNA不純物が含まれるのに対し、本願発明30のAAV粒子に含まれるDNA不純物の量は、 $2.69 \pm 0.69 \text{ pg} / 10^9 \text{ vg}$ 程度かそれよりも少

なく、本願発明30のAAV粒子に含まれるDNA不純物の量と引用発明の組換えAAVに含まれる残存DNA不純物の量は相違している。

本願発明30の組換えベクタープラスミドは7.0ないし10.0Kbの長さの第1の不活性のフィラー又はスタッパーポリヌクレオチド配列を有しており、本願明細書の【0177】に記載されている6.9Kbの長さのバックボーンを有するベクタープラスミドを用いて調製したAAV粒子は本願発明30の技術的範囲外であるから、6.9Kbの長さのバックボーンを有するベクタープラスミドを用いて調製されたAAV粒子に含まれる残存DNA不純物の量である60pg/10⁹vgと、引用発明におけるDNA不純物の含有量を比較して同程度にごく少量であると結論付けた本件審決の判断は、その前提において誤りがある。

イ(ア) これに対して、被告は、後記2(2)ア(エ)のとおり、本願明細書には、本願発明30の実施例は記載されておらず、加えて、DNA不純物の量は、同じバックボーンでもバッチによって差異が生じるから、本願発明30のAAV粒子が有するDNA不純物の量を具体的に特定することも引用発明との間に差異を見出すこともできない旨主張する。

確かに、本願明細書には、第1の不活性のフィラー又はスタッパーポリヌクレオチド配列が7.0ないし10.0Kbの長さを有する組換えベクタープラスミドを用いて調製したAAV粒子に含まれるDNA不純物を定量化したデータは含まれていないが、前記ア(イ)のとおり、引用例1には、本願明細書の図5で比較例とされている2.5Kbのバックボーンと近い長さを有する2.62Kb又は2.638Kbの長さのバックボーンの長さを有するベクタープラスミドを用いて調製されたDNA不純物の量の平均値が記載されているから、図5の実施例2(バックボーンの長さが7.1Kbの場合)におけるDNA不純物の量は推定できる。

また、同じバックボーンサイズでも実験条件によってDNA不純物の量に差異が生じるが、バックボーンサイズで得られた複数のDNA不純物の量の平均値を用いて比較を行えば問題はなく、被告の主張は理由がない。

5 (イ) 被告は、後記2(2)イのとおり、本願明細書の図5には、DNA不純物の量が約40分の1になるとの結論を導いた実験条件や元データの詳細は記載されておらず、「約40分の1」という数字には根拠がない旨主張する。

10 しかし、本願明細書の実施例（【0161】ないし【0177】）では、分子生物学の分野での標準的な手法に従ってDNA不純物の量を定量している。本願明細書の図5には具体的な実験データは記載されていないが、当業者は、実施例3（【0173】ないし【0177】）に関して明記されているAAV粒子の産生方法やDNA不純物の定量方法を参照し、図5に示されている結果はこれと同様の標準的な手法に従って
15 定量されたDNA不純物の量に基づいて減少幅を1/40と評価していると理解できるのであるから、被告の主張は理由がない。

(3) 小括

20 以上のとおり、本件審決には、前記(1)のとおり、不活性のフィラー又はスタッパーポリヌクレオチド配列の長さに係る実質的な相違点を看過した誤り、及び前記(2)のとおり、残存DNA不純物量が同程度であるとした一致点に関する認定の誤りがあるから、このような誤った相違点及び一致点を前提にしてされた新規性及び進歩性の判断も誤りである。

2 被告の主張

25 (1) 相違点(不活性のフィラー又はスタッパーポリヌクレオチド配列の長さ)の看過の主張について

AAVベクターは、「2つのITR配列及びその間に目的の遺伝子（治療

遺伝子) が挟まれたゲノム」を含むものであり、上記ゲノムとバックボーンを含むベクタープラスミドそのものを丸ごと含むものではないから、ITR外側のバックボーン配列は、実質的にはAAVベクターに含まれないものである。そうすると、引用発明のAAVベクターゲノムである「組換えAAV」
5 においてパッケージングされている「ベクターゲノム」は、「アンピシリン耐性遺伝子を含む6980bpのバックボーン、及びヒト凝固第IX因子をコードする4297ntの導入遺伝子を有するITR含有ベクタープラスミド」のうち、「アンピシリン耐性遺伝子を含む6980bpのバックボーン」を除いたものであり、2つのITRとその間に挟まれた目的遺伝子である「ヒ
10 ト凝固第IX因子をコードする4297ntの導入遺伝子」であることは当業者に明らかである。

他方、本願発明30の「AAV粒子」に含まれている「ベクターゲノム」は、「二つのITR配列」及びその「内側に位置し」「4.7Kbを下回る長さを有」する「異種ポリヌクレオチド配列」である。そして、引用発明の
15 「ヒト凝固第IX因子」は本願発明30の「異種ポリヌクレオチド配列」に相当し、引用発明の「4297nt」は本願発明30の「4.7Kbを下回る長さ」に相当する。

そうすると、引用発明の「ヒト凝固第IX因子をコードする4297ntの導入遺伝子を有するITR」は、本願発明の「二つのITR配列」とその「内
20 側に位置し」「4.7Kbを下回る長さを有」する「異種ポリヌクレオチド配列」である「ベクターゲノム」に相当するから、本願発明と引用発明は、「二つのITR配列」とその「内側に位置し」「4.7Kbを下回る長さを有」する「異種ポリヌクレオチド配列」である「ベクターゲノム」を含む観点において、構成要素が相違しない。

25 (2) 一致点(残存DNA不純物量が同程度である。)の認定の誤りの主張について

5
10
15
20
25

ア(ア) 本願明細書の【0035】の記載から、本願発明30の課題は、残存DNA不純物量を少なくするか、又はこれを含まない組換えAAV粒子の提供にあるといえる。これに対して、引用例1には、DNA不純物を最小限に抑えることが記載され（別紙2の1-1）、「ベクタープラスミドのバックボーンサイズがDNAの不純物レベルに与える影響」、「ベクタープラスミドのバックボーンサイズが、組換えAAV2及びAAV6に残留するプラスミドDNA不純物の量に及ぼす影響が評価された。」、「ベクター製造用プラスミドに特大のバックボーンを使用することで、プラスミド由来のDNA不純物の大幅な削減が達成された」（別紙2の1-2）との記載があるから、引用発明の解決しようとする課題も、組換えAAVにおけるDNA不純物量を最小限に抑えることであるといえる。そうすると、本願発明30と引用発明は、DNA不純物を減少させるという同じ課題を有するものである。

15
20

イ) 本願明細書の【0171】、図1によると、AAV粒子に含まれる残存プラスミドDNAは、導入遺伝子カセットサイズが2.7Kbでは164pg/10⁹vg、サイズが3.7Kbでは42.7pg/10⁹vg、サイズが4.3Kbでは14.0pg/10⁹vgであることが記載されており、導入遺伝子カセットサイズがパッケージング許容限界サイズ（約4.7Kb）に近づくにつれてDNA不純物が減少することが理解できるから、本願明細書には、パッケージング許容限界サイズに近い導入遺伝子カセットサイズを採用すると、導入遺伝子カセットサイズの長さに応じてDNA不純物が減少することが開示されているといえる。

25

そして、前記(1)のとおり、本願発明と引用発明は、「4.7Kbを下回る長さを有」する「異種ポリヌクレオチド配列」を有する「ベクターゲノム」を含む点で共通するから、導入遺伝子カセットサイズにより生じる「DNA不純物」の量において実質的な差異はない。

(ウ) また、本願明細書の【0172】、図5には、ベクタープラスミド「バックボーン」DNAのパッケージングがITRからの「逆転パッケージング」を介してかなりの程度で起こり、それはサイズ超過(>4.7Kb)のバックボーンを用いることで大幅に減少すること、サイズ超過バックボーンを用いると残存プラスミドDNAは約40分の1(0.1~1.0%)に減少することが記載されており、これを具体的に裏付けるものとして、本願明細書の【0177】、図6には、サイズ超過バックボーンを含まないベクタープラスミドを用いて調製されたベクター(AAV粒子)中の 10^9 vg(ベクターゲノム)当たりのプラスミドDNA不純物の平均は301pgであるのに対し、サイズ超過のバックボーンを用いて調製された 10^9 vg(ベクターゲノム)当たりのプラスミドDNA不純物の平均は60pgであることが記載されている。このように、本願明細書には、ベクタープラスミド内のサイズ超過バックボーンを用いることにより、ウイルスベクター(AAV粒子)中のDNA不純物が大きく低減することが記載されているから、ベクタープラスミドのバックボーンサイズがサイズ超過である本願発明の「AAV粒子」は、DNA不純物が大幅に減少しているといえる。

これに対し、引用文献には、バックボーンが組換えAAV2のパッケージング容量を超えるように改変した特大のバックボーンを持つプラスミドでは、プラスミドDNA不純物のレベルが大幅に減少することが記載されている(別紙2の1-2、1-4)から、引用発明の「組換えAAV」もDNA不純物が大幅に減少しているといえる。

したがって、本願発明と引用発明は、サイズ超過(>4.7Kb)のバックボーンを用いるものであり、大幅に減少し、ごく少量のDNA不純物を有する点で一致する。

(エ) なお、本願明細書の図5には、「AAVのパッケージング許容限界を

超えるサイズ超過プラスミドバックボーン（7.1 Kb）は、非ベクターDNAのパッケージングを著しく低下させる。」と記載され、図5の下の図における「DNA Stuffer」が本願発明でいうところの「第1の不活性のフィラーまたはスタッパーポリヌクレオチド配列」に対応するが、「DNA Stuffer」の長さは「バックボーン7.1 Kb」よりも大幅に短いことは図面上明らかである。そうすると、図5には、「第1の不活性のフィラーまたはスタッパーポリヌクレオチド配列が7.0ないし10.0 Kbの長さを有する」組換えベクタープラスミドのベクターゲノムを含んでなる本願発明30のAAV粒子が記載されているとはいえず、その他、本願明細書には、本願発明30のAAV粒子を具体的に裏付ける実施例の記載はない。

加えて、本願明細書の図6によると、DNA不純物の量は、同じサイズ超過バックボーンを採用したとしても、バッチ（実験条件）によって差異が生じることが読み取れるから、本願発明30のAAV粒子が有するDNA不純物の量を具体的に特定することも、引用発明との間に差異を見出すこともできない。

(オ) 以上のとおり、本願発明と引用発明は、「大幅に減少」し、「ごく少量」のDNA不純物を有する点で一致し、DNA不純物の量について差異はなく、「DNA不純物」の観点で相違するものではない。

なお、本件審決は、前記第2の3(3)アのとおり、本願発明30に係る「AAV粒子」は、「AAVの二つのITR配列の外側に位置する領域に由来する残存プラスミドDNAをごく少量（60 pg / 10⁹ vg程度）含む「ベクターゲノム」を含んでなるもの」と認定し、「ごく少量」、「程度」の文言を用いており、本願発明30のAAV粒子に含まれる残存DNA不純物の量が6.9 Kbの長さを有するベクタープラスミドを用いて調製したAAV粒子の場合と同じ60 pg / 10⁹ vgであると

までは認定していない。

イ これに対して、原告は、前記1(2)アのとおり、AAV粒子に含まれる残存DNA不純物の量が組換えベクタープラスミドに含まれるバックボーンの長さによって変わるものであり、本願明細書の図5、図6によれば、
5 当業者は、サイズ超過バックボーンの長さを長くすることにより、残存DNA不純物の量の減少幅が大きくなることを理解することができる旨主張する。

しかし、本願明細書には、サイズ超過のバックボーンを用いると残存DNA不純物の量が大きく減少することが記載されているにすぎず、4.7
10 Kbを超えるバックボーン同士で比較した場合において、バックボーンの長さを長くすればするほどDNA不純物の量が減少することは記載されていない。前記ア(エ)のとおり、本願明細書には、本願発明30のAAV粒子を具体的に裏付ける実施例の記載はなく、「7.0ないし10.0Kb
15 の長さを有する」配列は好ましい範囲として記載されていたものでもない。そうすると、パッケージング許容限界サイズ(約4.7Kb)を超える範囲で「フィラーまたはスタッパーポリヌクレオチド配列」の長さを「7.0ないし10.0Kb」の範囲に調整することでDNA不純物の量が減少することが本願明細書に説明されているとはいえない。

加えて、本願明細書の図5には、DNA不純物の量が約40分の1になるとの記載があるが、実験条件及び元データ詳細の記載はなく、図5の「1
20 /40」と図6の「1/5」の数値の違いが、バックボーンの長さの差である0.2Kb(7.1Kb-6.9Kb)のみに起因するとはと考えられない。

そうすると、本願明細書には、バックボーンの長さ又はバックボーンの一部である「フィラーまたはスタッパーポリヌクレオチド配列」を長く
25 すればするほど、残存DNA不純物の量の減少幅が大きくなることは記載

されているとはいえ、原告の主張は本願明細書の記載に基づくものではない。

(3) 小括

5 以上によれば、引用発明に係る「組換えAAV」のベクターゲノムに含まれる残存DNA不純物、すなわち、残存プラスミドDNAは、本願発明30と同程度にごく少量であり、本願発明30に係るAAV粒子に含まれているベクターゲノムと、引用発明に係る「組換えAAV」に含まれている「ベクターゲノム」とは、いずれもAAVの二つのITR配列と、その内側に位置し、4.7Kbを下回る長さを有する異種ポリヌクレオチド配列を含む領域と、当該二つのITR配列の外側に位置する領域に由来する残存プラスミドDNAをごく少量含む点で相違ないから、そのような「ベクターゲノム」を含むAAVである本願発明30に係る「AAV粒子」と引用発明に係る「組換えAAV」との間には相違点は存在しない旨の本件審決の判断に誤りはなく、原告主張の取消事由は理由がない。

15 第4 当裁判所の判断

1 本願明細書の記載事項について

(1) 本願明細書（甲2）には、別紙1のとおり記載があり、この記載事項によれば、本願明細書の発明の詳細な説明には、本願発明30に関して、次のとおり事項が開示されていると認められる。

20 ア 組換えアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターは、ベクター中に存在するDNA不純物の除去のためにヌクレアーゼ処理を行ってもDNA断片がパッケージされるなどの問題があった（【0002】）。AAV内のカプシド化した残存DNAの多くは、逆方向末端反復配列（ITR）を含むベクタープラスミドテンプレートに由来する（【0003】）。

25 本願の発明者らは、組換えアデノ随伴ウイルス（rAAV）の本来のパッケージ許容限界サイズ（約4.7Kb）より短いベクター発現カセ

ットを含む r A A V ベクタープラスミドでは残留プラスミド DNA 不純物レベルが上昇し、配列が r A A V の本来のパッケージング許容限界サイズより短いほど不純物のレベルが上昇したことを明らかにした（【0034】）。

5 本願発明は、ウイルス（A A V）の本来のパッケージング許容限界サイズに近いサイズの配列を有する組換えベクター（例えば A A V）プラスミド及び該組換えベクター（例えば A A V）プラスミドを、例えば、残存 DNA 不純物量を少なくしたか、又はこれを含まない組換えウイルス粒子を作成するために用いる方法を提供するものであり、例えば、ベクターゲノム配列のサイズを最適化することで、抗生物質抵抗性を生じる細菌遺伝子
10 のような望ましくない核酸配列のベクターを介した導入に関わる潜在的危険性を軽減することができる（【0035】）。

イ 本願発明の組換えベクタープラスミドは、A A V 等のウイルスの野生型ゲノムに由来し、分子学的手法を用いてウイルス（例えば A A V）から野生型ゲノムを取り除き、異種ポリヌクレオチド配列（例えば、治療的遺伝子発現カセット）のような外来の核酸で置換したものであり、「ベクターゲノム」は、ウイルス（例えば、A A V）によってパッケージ又はカプシド化される異種ポリヌクレオチド配列を含む組換えベクタープラスミドの一部を指すものである（【0040】、【0080】）。

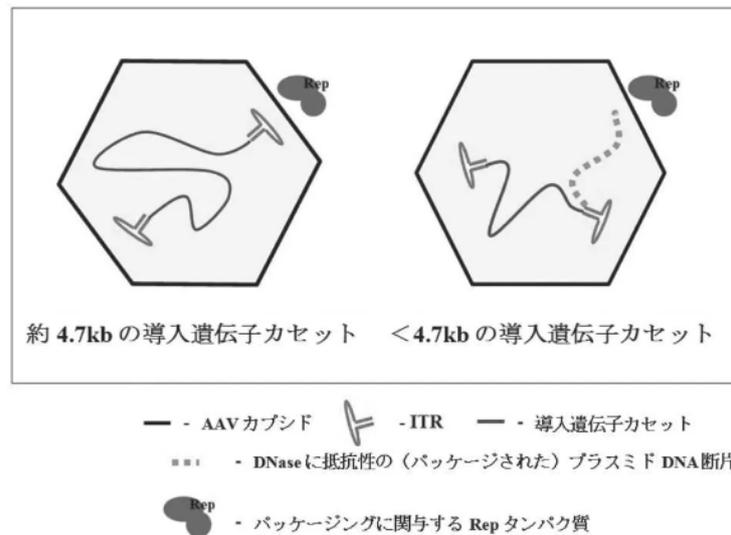
ウ 本願発明の組換えベクタープラスミドは、パッケージ又はカプシド化されて感染能力のあるウイルス粒子を形成するウイルスゲノム配列の正常なサイズ、又はそれに近いサイズに長さを変更又は調節する追加的なファイラー／スタッパー核酸配列を含むものであり、種々の実施形態では、ファイラー／スタッパー核酸配列は、核酸の非翻訳（タンパクをコードしない）断片（segment）である。A A V ベクターの特定の実施形態では、異種ポリヌクレオチド配列は、その長さが 4.7 K b 未満であり、フ

イラー又はスタッパーポリヌクレオチド配列は、異種ポリヌクレオチド配列と合わせた（例えばベクター内に挿入された）時の全長が約3.0 K b～5.5 K b、4.0～5.0 K b、4.3～4.8 K bである。（【0082】）

5 エ 図4は、短い導入遺伝子カセットを含むベクター内のプラスミドDNAのカプシド化を示す略図である（【0031】）。

【図4】

短い導入遺伝子カセットを含むベクター内のプラスミドDNAのカプシド化を示す略図



(2) 次に、本願明細書の発明の詳細な説明には、実施例として、次の開示がある。

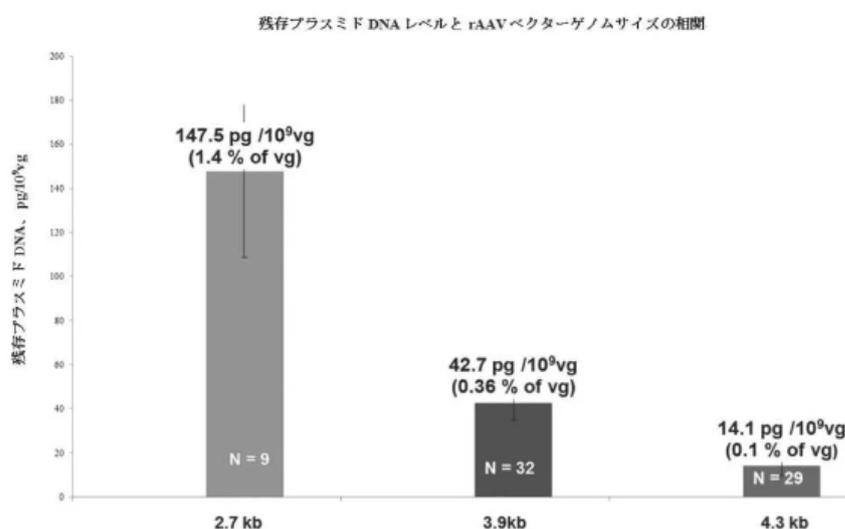
10 ア 実施例 1

カプシド化されたDNAのサイズは、短い導入遺伝子カセット（2716 b p）を有するベクターと長い導入遺伝子カセット（4297 b p）を有するカセットとで同等であり、AAVウイルスのパッケージング許容限界（4.5 K b）にほぼ対応し、短い導入遺伝子カセットを有するベクター内にパッケージされたDNAは、ゲノムに隣接するプラスミド配列を含むことが示された（【0164】、【0166】、図2B、図2D）。

イ 実施例 2

導入遺伝子プラスミドのバックボーン内の導入遺伝子カセットの5' ITRの近傍に位置するKanR又はAmpR遺伝子に特異的なプライマーとプローブを用いて測定された残存プラスミドDNAのレベルを、2.7 Kb、3.7 Kb（当審注：図1には「3.9 Kb」とあるが「3.7 Kb」の誤記と認める。）、4.3 Kbのサイズの一本鎖標準導入遺伝子発現カセットを含むAAV2ベクターにおいて評価した結果、rAAVA（サイズは2.7 Kb）は164 pg / 10⁹ vg、rAAVB（サイズは3.7 Kb）は42.7 pg / 10⁹ vg、rAAVC（サイズは4.3 Kb）は14.0 pg / 10⁹ vgの残存プラスミドDNAをそれぞれ含むことが示された（【0168】ないし【0171】、図1）。

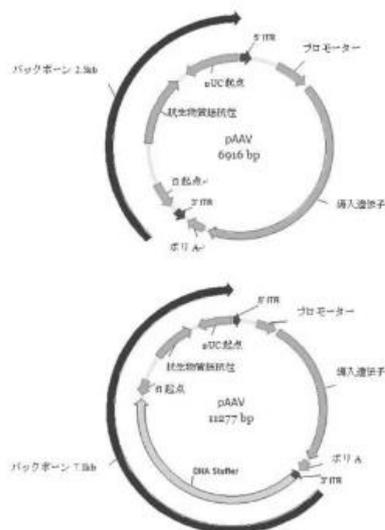
【図1】



また、ベクタープラスミド「バックボーン」DNAのパッケージングが、ITRからの「逆転パッケージング」を介してかなりの程度で起こり、サイズ超過 (> 4.7 Kb)（当審注：【0172】には「> 4.7 bp」とあるが「> 4.7 Kb」の誤記と認める。）のバックボーンを用いることで大幅に減少する（【0172】、図5）。

【図5】

AAVのパッケージング許容限界を超えるサイズ超過プラスミドバックボーン（7.1Kb）は、非ベクターDNAのパッケージングを著しく低下させる。



種々の産生システムを用いる：

- pRC プラスミドを用いたトランスフェクション
- pDC プラスミドを用いたトランスフェクション
- 産生細胞株を用いた rAd 感染

すべての方法で、シス (cis) プラスミドバックボーンの顕著なパッケージングが認められた。密度勾配遠心法により精製されたベクターではこの産生物関連不純物はvg含有粒子の3~7%である。

(密度に基づく分離ステップを使わずに精製されたベクターではより高いと思われる。)

(Chadefra, (2005), Mol Ther. 12:744)

サイズ超過バックボーンを用いると残存プラスミドDNAは約40分の1(0.1~1.0%)に減少する。

ウ 実施例3

サイズ超過バックボーンを用いずに調製されたベクターのDNA不純物と、サイズ超過バックボーンを用いて調製したベクターのDNA不純物を比較した結果、ベクタープラスミドバックボーンが3.8Kbの長さの場合には平均で301pg/10⁹vgであったのに対して、ベクタープラスミドバックボーンが6.9Kbの長さの場合には平均で60pg/10⁹vgであり、ベクタープラスミド内のサイズ超過バックボーンは、ウイルスベクターの調製において不純物の低減に使用することができる（【0173】ないし【0177】、図6）。

- (3) 前記(1)及び(2)の本願明細書の開示事項によれば、本願発明30は、残存DNA不純物の量を少なくし、又はこれを含まない組換えAAV粒子を提供することをその課題とするものであり（前記(1)ア）、4.7Kbを下回る長さの異種ポリヌクレオチド配列（AAVの二つのITR配列の内側に位置するもの）と、不活性のフィラー又はスタッパーポリヌクレオチド配列を含んだベクタープラスミドを用いて、上記課題を解決する（【0166】、図1、

図2及び図4。なお、この点については後記3(1)エで詳述する。) であると認められる。

2 引用例1の記載事項について

5 (1) 引用例1には、別紙2のと通りの記載(ただし、訳文は乙1による。)があり、この記載事項によれば、次のとおりの事項が開示されていると認められる。

ア これまでの研究で、キャプシド形成するプラスミドDNA不純物は、主にITR含有ベクター製造用プラスミドのバックボーンに由来するものであることが報告されているところ、組換えAAV2及びAAV6に残留するプラスミドDNA不純物量に対するベクタープラスミドのバックボーンサイズの影響を評価した(別紙2の1-2)。

15 ヒト凝固第IX因子を発現するAAV2ベクター8ロットとAAV6ベクター2ロットは、AAVのパッケージング限界である約4700ntを超過する6980bpのバックボーンを含むベクタープラスミドを用いて作製し、比較対象として、1ロットのAAV2と4ロットのAAV6ベクターが、2620bp又は2638bpのバックボーンを持つベクタープラスミドを用いて作製された(別紙2の1-3、1-5)。

20 イ 残留プラスミドDNAのレベルは、ベクター生成に使用した3つの産生プラスミドに共通する配列であるAmp^R(アンピシリン耐性遺伝子)に特異的なプライマーとプローブを用いたQ-PCRで測定した結果、特大(6980bp)のバックボーンを持つベクタープラスミドを用いて作製された5ロットで測定された平均残留プラスミドDNAレベルは $14.2 \pm 2.6 \text{ pg} / 10^9 \text{ vg}$ であり、より小さい(2620bp又は2638bp)バックボーンを持つベクタープラスミドを用いて作製された5ロットで測定された平均値 $107.6 \pm 27.6 \text{ pg} / 10^9 \text{ vg}$ よりも7.6倍低く、ベクター製造用プラスミドに特大のバックボーンを使用すること

で、プラスミド由来のDNA不純物の大幅な削減が達成された（別紙2の1-2、1-3（表1））。

ウ 今回の研究では、AAVのパッケージング限界よりも小さいバックボーンを持つベクタープラスミドを用いてHEK293細胞に遺伝子導入（トランスフェクション）してAAVベクターを作製したところ、得られたベクターに含まれるヌクレオチド耐性プラスミドDNAの不純物は2.9～5.7%であった。バックボーンがAAV2のパッケージング容量を超えるようにスタッパー配列を改変したベクタープラスミドを使用した場合の効果を調べると、キャプシド形成したプラスミドDNA不純物のレベルが大幅に減少することが判明した（7.6倍）。（別紙2の1-4）。

(2) 前記(1)の開示事項によると、引用例1には、本件審決が認定した引用発明（前記第2の3(2)）が記載されていると認められる。

3 取消事由（本願発明30の新規性及び進歩性に係る判断の誤り（引用発明との相違点の看過、一致点の認定の誤り））について

(1) 本願発明30の技術的意義について

ア 原告は、前記第3の1(1)のとおり、本願発明30と引用発明を対比すると、不活性のフィラー又はスタッパーポリヌクレオチド配列の長さが相違し、かつ本願発明30と引用発明における各AAV粒子に含まれる残存DNA不純物の量の相違は、この長さの相違によるものであるといえるから、この長さの相違は実質的な相違点であるといえる旨主張するので、まず、本願発明30の技術的意義について検討する。

イ 本願発明30に係る請求項30は、請求項1ないし27の「組換えベクタープラスミド」を引用する形式で記載されている。このうち請求項1で引用する部分に係る発明（本願発明30）は、次のとおり特定される（下線部は当審で付した。）。

「異種ポリヌクレオチド配列を含むベクターゲノムと、

第1の不活性のフィラーまたはスタッパーポリヌクレオチド配列を含んでなり、

前記異種ポリヌクレオチド配列が4.7Kbを下回る長さを有し、かつ、
アデノ随伴ウイルス(AAV)の二つのITR配列の内側に位置し①、前記
5 不活性のフィラーまたはスタッパーポリヌクレオチド配列はアデノ随
伴ウイルス(AAV)の二つのITR配列の外側に位置し、該第1の不活
性のフィラーまたはスタッパーポリヌクレオチド配列が7.0ないし1
0.0Kbの長さを有する②組換えベクタープラスミドの
ベクターゲノムを含んでなるAAV粒子」

10 ウ 前記イのとおり、本願発明30は、「フィラーまたはスタッパーポリ
ヌクレオチド配列が7.0ないし10.0Kbの長さを有する」との構成
を有するところ、引用発明においては、この点に関する記載がないことは
明らかである。原告は、前示のとおり、本願発明30と引用発明の相違は、
この長さの相違によるものであるといえるから、この長さの相違は実質的
15 な相違点である旨主張しているので、以下、この点について検討する。

本願発明30は、下線部①と②で構成される組換えベクタープラスミド
のベクターゲノムを含んでなるAAV粒子であり、組換えベクタープラス
ミド自体を含んでなるとは構成されていない。AAV粒子は、一般的に二
つのITRの間に目的の導入遺伝子を挿入したベクタープラスミド、AA
20 Vヘルパープラスミド、アデノウイルスヘルパープラスミドの3種類のプ
ラスミドベクターを293細胞にトランスフェクションし、二つのITR
の間にある導入遺伝子がAAV内にカプシド化されるものである(乙5の
図3)から、本願発明30の「ベクターゲノムを含んでなるAAV粒子」
とは、本願明細書の図4も参照すると、アデノ随伴ウイルス(AAV)の
25 二つのITRの内側に位置する4.7Kbを下回る長さを有する異種ポリ
ヌクレオチド配列(下線部①の構成)を含むものであるとはいえるものの、

下線部②の構成に係るフィラー又はスタッパーポリヌクレオチド配列を含むものであるとまでは当然にはいえない。被告は、この点を重視して、前記第3の2(1)のとおり、AAVベクター（AAV粒子）は、「2つのITR配列及びその間に目的の遺伝子（治療遺伝子）が挟まれたゲノム」を含むものであり、上記ゲノムとバックボーンを含むベクタープラスミドそのものを丸ごと含むものではないから、ITR外側のバックボーン配列は、実質的にはAAVベクターに含まれないものであるとし、本願発明と引用発明は、「二つのITR配列」とその「内側に位置し」「4.7Kbを下回る長さを有」する「異種ポリヌクレオチド配列」である「ベクターゲノム」を含む観点において、構成要素が相違しない旨主張する。しかし、本件審決は、前記第2の3(3)アのとおり、ベクターゲノムは異種ポリヌクレオチド配列を含む領域にとどまらず、当該領域の外側、すなわち、AAVの二つのITR配列の外側に位置する領域に由来する残存プラスミドDNAをごく少量含むものと認定しているところであり、ベクターゲノムがITR外側のバックボーン配列を一部なりとも含む可能性は否定し難いし、いずれにしても本願発明30の技術的意義が下線部①の構成に限られず、下線部②の構成にも存在するのであれば、本件発明30の構成要素として下線部①の構成のみを取り上げるのは相当とはいえないから、さらに、本願発明30の技術的意義について検討する。

エ(ア) 本願明細書には、「ここに開示される研究は、組換えアデノ随伴ウイルス（rAAV）の本来のパッケージング許容限界サイズ（約4.7kb）より短いベクター発現カセットを含むrAAVベクタープラスミドでは、残留プラスミドDNA不純物のレベルが上昇したこと、および配列がrAAV本来のパッケージング許容限界サイズより短いほど不純物のレベルが上昇したことを示す。・・・」（【0034】）との記載があり、また、図2には、短い導入遺伝子カセット（2.7Kb）と長い

導入遺伝子カセット（4.3 Kb。【0164】には「4.2 kb」とあるが図2には「4297 bp」とあるので「4.3 Kb」の誤記と認める。）を含むベクタープラスミドをパッケージングした実験結果（【0164】）と共に、「カプシド化されたDNAのサイズ（例えばベクターゲノムサイズと併せたDNase耐性プラスミドバックボーンDNA）は、短いゲノムを有するベクターと長いゲノムを有するベクターとで同等であり、AAVウイルスのパッケージング許容限界（4.5 Kb）（当審注：【0034】等の記載から4.7 Kbの誤記であると認める。）にほぼ対応した。短いゲノムを有するベクター内にパッケージされたDNAは、ゲノムに隣接するプラスミド配列を含み、短いゲノムを有するベクターは、AAVウイルスの最大パッケージング許容限界までのサイズのプラスミド配列をパッケージすることが示された」（【0166】）との記載がある。さらに、図4には、AAV粒子のパッケージング許容限界サイズ（約4.7 Kb）の導入遺伝子カセットの長さがAAV粒子のパッケージング許容限界サイズ（約4.7 Kb）であるときと比較して、導入遺伝子カセットが短い（<4.7 Kb）場合には、DNaseに抵抗性のプラスミドDNA断片もカプシド化されることを表す略図が開示されていることに加え、前記1(2)イの実施例2の開示事項を総合すると、異種ポリヌクレオチドをベクタープラスミドを用いてカプシド化したAAV粒子には、導入遺伝子（異種ポリヌクレオチド）に隣接するプラスミド配列もパッケージング許容限界サイズ（4.7 Kb）までパッケージングされること、導入遺伝子がパッケージング許容限界サイズより短いサイズであればあるほど、精製されたAAVベクター（AAV粒子）に含まれるプラスミドDNA不純物の量が増えるものと理解することができる。

また、本願明細書には、「ある態様では、フィラーまたはスタッファ

一ポリヌクレオチド配列は不活性または無害であり、機能や活性を有しない。・・・フィラーまたはスタッパーポリヌクレオチド配列はタンパク質やペプチドをコードする配列ではなく、フィラーまたはスタッパーポリヌクレオチド配列は異種ポリヌクレオチド配列、AAV逆方向末端反復配列（ITR）、発現制御要素、複製起点、選択マーカまたはポリアデニン（poly-A）配列のいずれとも異なる配列である」（【0012】）、「ここで定義される組換えベクタープラスミドは、パッケージまたはカプシド化されて感染能力のあるウイルス粒子を形成するウイルスゲノム配列の正常なサイズ、またはそれに近いサイズに長さを変更または調節する、追加的なフィラー／スタッパー核酸配列を含む。種々の実施形態では、フィラー／スタッパー核酸配列は、核酸の非翻訳（タンパクをコードしない）断片（segment）である。・・・」（【0082】）、「・・・別の態様では、フィラーまたはスタッパーポリヌクレオチド配列は、異種ポリヌクレオチド配列の5'末端および／または3'末端の外側にそれぞれ隣接する5'側および／または3'側ITR配列に隣接して配置されるものとする。・・・」（【0007】）との記載があり、これらの記載を総合すると、ITR外側の不活性のフィラー又はスタッパーポリヌクレオチド配列は、残存プラスミドDNAと評価される組換えプラスミドベクターの配列がパッケージ又はカプシド化されることを防止するために挿入される、機能や活性を有しない核酸の断片であると理解することができる。

(イ) 前記(ア)で指摘した本願明細書で開示されている事項を総合すると、前記1(3)のとおり、本願発明30は、残存DNA不純物の量を少なくし、又はこれを含まない組換えAAV粒子を提供することがその課題であると認められるところ、本願発明30の技術的意義は、AAV粒子を、二つのITRの内側に位置する異種ポリヌクレオチド配列の長さがA

のフィラー又はスタッファーポリヌクレオチド配列が含まれるものであ
ると解される（本願明細書の図5も、ベクタープラスミドのうち、導入遺
伝子が内側に位置する二つのITRの外側にある部分をバックボーンと
記載している。）。

5 他方、本願明細書には、図5の上段と下段ではベクタープラスミドに含
まれる導入遺伝子の長さは異なるものと認められるものの、具体的な長さ
については記載がなく、また、図6にも、3.8Kbと6.9Kbのバッ
クボーンサイズのベクタープラスミドに含まれる導入遺伝子の長さにつ
10 いての記載はない。また、前記1(1)ア、同(2)ア、イ、図1及び図4の各開
示事項によれば、本願明細書には、パッケージング許容限界サイズ（4.
7Kb）により近い導入遺伝子カセットを採用するとDNA不純物の量が
減少し、許容限界サイズより短いほどDNA不純物の量が上昇したことが
開示されているのにとどまるから、導入遺伝子の長さに関係なく、フィラ
ー又はスタッファーポリヌクレオチドを含むバックボーンの長さを長く
15 すればするほどDNA不純物の量が著しく減るものと理解することはで
きない。

そうすると、前記図5や実施例3においてDNA不純物の量が減少した
と記載されていても、これをもって直ちに、この減少がフィラー又はスタ
ッファーポリヌクレオチドを含むバックボーンが長いことによるものと
20 理解することはできず、フィラー又はスタッファーポリヌクレオチド配列
が7.0ないし10.0Kbの長さを有すること（下線部②）は、その長
さそれ自体に独自の技術的意義を見出すことはできないが、前記エ(イ)の技
術的意義に照らし課題の解決に資する長さを構成するという限度では有
意であると理解すべきである。

25 カ 以上によれば、本願発明30の構成要素として下線部①の構成のみを取
り上げるのは相当とはいえず、本願発明30の「AAV粒子」には、下線

部②の構成がそのままパッケージ化されるものではないとしても、この構成を含めて、引用発明との対比をすべきであるから、この点においては、本件審決の判断には誤りがある。

(2) 本願発明 30 と引用発明との対比について

5 ア 原告は、本願発明 30 の下線部②の構成が本願発明 30 と引用発明の実質的な相違点であると主張するので、以下、前記(1)における認定を前提にして、本願発明 30 と引用発明との対比を行う。

 前記(1)イのとおり、本願発明 30 は、「前記異種ポリヌクレオチド配列が 4.7 Kb を下回る長さを有し、かつ、アデノ随伴ウイルス (AAV) の二つの ITR 配列の内側に位置し」との構成を有する。これに対して、
10 引用発明は、「ヒト凝固第IX因子をコードする 4297 nt の導入遺伝子を有する ITR 含有」のベクタープラスミドの構成を有するものであるところ、本願発明 30 の「異種ポリヌクレオチド」は、引用発明の「ヒト凝固第IX因子」に相当し、ともに「4.7 Kb」を下回るベクタープラスミドを含む点で共通する。
15

 イ 次に、本願発明 30 は、「前記不活性のフィラーまたはスタッパーポリヌクレオチド配列はアデノ随伴ウイルス (AAV) の二つの ITR 配列の外側に位置し、該第1の不活性のフィラーまたはスタッパーポリヌクレオチド配列が 7.0 ないし 10.0 Kb の長さを有する」構成を有する。

 これに対して、引用発明は、「アンピシリン耐性遺伝子を含む 6980 bp のバックボーン」のベクタープラスミドの構成を有するものである。そして、引用例 1 には、「ヒト凝固第IX因子 (AAV-hFIX) を発現する AAV2 ベクター 8 ロットと AAV6 ベクター 2 ロットは、AAV のパッケージング限界である約 4700 nt を超過する 6980 bp のバックボーンを含むベクタープラスミドを用いて作製した。」(別紙 2 の 1
20 - 5)、「バックボーンが AAV2 のパッケージング容量を超えるように
25

伝子の長さ（4297 nt（約4.297 Kb））とこのバックボーン（6980 bp（約6.980 Kb））に含まれるスタッパー配列の長さが少なくともパッケージング許容限界である4.7 Kbを上回るものと理解できるから、本願発明30と引用発明とは、その技術的意義において同一であり、本願発明30において、ベクタープラスミドのフィラー又はスタッパーポリヌクレオチド配列の長さを「7.0ないし10.0 Kbの長さ」という特定の範囲の長さにしたことは実質的な相違点とはいえない。加えて、引用発明の「6980 bpのバックボーン」は「サイズ超過バックボーン」（【0173】ないし【0177】参照）であるところ、前記(1)オのとおり、本願明細書の記載からは、本願発明30の「7.0ないし10.0 Kbの長さ」を有する「不活性のフィラーまたはスタッパーポリヌクレオチド配列」は、サイズ超過バックボーンを構成するものと理解できるにすぎないから、この観点においても、両者が相違するものとはいえない。

(3) 原告の主張について

ア 原告は、前記第3の1(2)ア(イ)のとおり、①本願明細書の図5には、7.1 Kbのバックボーンを用いて調製されたAAVに含まれるDNA不純物の量は、2.5 Kbのバックボーンを含むベクタープラスミドを用いた場合と比較して40分の1にまで減少されていることが開示されており、②図5の比較例のバックボーンの長さ（2.5 Kb）は引用例1に示されている2620 bp又は2638 bpのバックボーンと近いことから、図5の比較例の2.5 Kbのバックボーンを有するベクタープラスミドを用いて調製されたAAV粒子には、引用例1に開示されている2620 bp又は2638 bpのバックボーンを有するベクタープラスミドを用いて調製されたAAV粒子に含まれるDNA残存量と同程度であるとし、その値を前提として実施例2の7.1 Kbのバックボーンの長さを有するDN

を用いて調製されたAAV粒子に含まれるDNA不純物の量を推定することも相当ではない。

5 加えて、③で原告が指摘する本願明細書の記載については、そもそもベクタープラスミドに含まれる導入遺伝子の長さが不明であるところ、サイズ超過のバックボーンを含まないベクタープラスミドを用いて調製されたAAV粒子中のプラスミド由来のDNA不純物の量と、サイズ超過のバックボーンを含むベクタープラスミドを用いて調製されたAAV粒子中のプラスミド由来のDNA不純物の量を比較したものにはすぎず、サイズ超過のバックボーンを有するベクタープラスミド間でバックボーンの長さ
10 とプラスミドDNA不純物の量の関係を示す実験結果ではなく、これらの記載は、パッケージング許容限界より長いサイズ超過のバックボーンをより長くすればするほどDNA不純物の量が減少することを示すものではないから、本願明細書には、サイズ超過のバックボーンの長さを長くすることでDNA不純物の量の減少幅が大きくなることが開示されていると
15 はいえない。

以上によれば、上記アの①ないし③を論拠として、本願発明30のAAV粒子に含まれる残存DNAの量が $2.69 \pm 0.69 \text{ pg} / 10^9 \text{ vg}$ よりも更に少ないと直ちに認めることはできないし、残存DNAの量の減少が生じたとしても、その減少がサイズ超過のバックボーンの長さを長くしたことによるものと直ちに認めることもできないから、原告の上記主張は、
20 その前提において誤りがある。

イ なお、本件審決は、前記第2の3(3)アのとおり、本願発明30に含まれるDNA不純物の量は「 $60 \text{ pg} / 10^9 \text{ vg}$ 程度」として引用発明との対
25 比判断をするが、この値は、実施例3の6.9Kbのバックボーンの長さを有するプラスミドを用いて調製したAAV粒子に含まれるプラスミド由来のDNAの不純物の量であるところ（【0177】、図6）、本願発

5 明30の「フィラー又はスタッファーポリヌクレオチド配列」の長さが7.0ないし10.0Kbを有するベクタープラスミドはこの実施例のバックボーンの長さを超えるものであるから、原告が前記第3の1(2)ア(エ)において指摘するとおり、何ら説明を加えることなく、実施例3の値を参照して対比判断をした本件審決の判断には相当ではない部分があるが、これまで説示したところによれば、結論を左右するものではない。

(4) 小括

10 以上によれば、本願発明30と引用発明を対比すると、本願発明30と引用発明における各AAV粒子に含まれる残存DNA不純物の量やその程度が不活性のフィラー又はスタッファーポリヌクレオチド配列の長さにより相違することについては、これを直ちに認めることはできず、また、不活性のフィラー又はスタッファーポリヌクレオチド配列の長さが相違するものの、発明の技術的意義に照らし有意なものと認めることはできないから、この長さの相違は実質的な相違点であるということとはできない。そうすると、本願発明30は、引用文献1に記載された発明であるといえるから、新規性を欠くものというべきである。原告は、その他、るる主張するが、いずれも上記結論を左右し得ない。

4 結論

20 以上によれば、原告が主張する取消事由は理由がなく、本願発明30は、特許法29条1項3号に該当し、特許を受けることができないから、他の請求項に係る発明について検討するまでもなく、本願は拒絶されるべきものであるとした本件審決は、結論において相当であるから、原告の請求は棄却されるべきである。

よって、主文のとおり判決する。

25

裁判長裁判官

菅 野 雅 之

5

裁判官

中 村 恭

10

裁判官

岡 山 忠 広

(別紙1)

本願明細書 (抜粋)

【発明の詳細な説明】

5 【0002】

組換えアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターは、今日までにいくつかの初期臨床試験において治療用途に極めて有望であることが複数のグループによる報告で示されている。この新規なクラスの生物学的製品を後期臨床試験に進め、最終的に医薬品としての認可を得るためにはベクターの特性解析および品質管理手法を更に改善
10 する必要がある。例えば、臨床等級の精製ベクターにおける不純物プロファイルに、ベクター設計と製造工程パラメータがどのように影響するかについての更なる理解が必要である。AAVベクター中に存在するDNA不純物の除去は、ベクター精製中に処理可能な核酸を効率良く取り除くことが出来るヌクレアーゼ処理を行っても、DNA断片がパッケージされ、ベクター粒子の完全性を保ち得るような様式で行わ
15 れるヌクレアーゼ処理に対しては抵抗性になる可能性があるという事実によって複雑なものとなる。

【0003】

r AAV作製システムの設計における重要な目的は、野生型・偽野生型AAV種 (wt AAV)、AAV内でカプシド化された残存DNA不純物および空のカプシドを含む、ベクター関連不純物の特性を分析し、それらの生成を極小化・管理し得る戦略を遂行することである。このような生成物関連不純物はベクターそのものと酷似しており、精製過程に真正のベクターから容易に分離できない。ベクター以外のDNA不純物はベクター粒子精製物の総DNA量の1～8%を占めると報告されている (Smith PH Wright JF. Qu G. et al 200
20 3, Mo. Therapy, 7:8348; Chadeuf G. Ciron C. Moullier P. Salvetti A., Mo. Therap

y 2005, 12:744. ヒト用医薬品委員会 (CHMP) 遺伝子治療 専門
家会合による報告. 欧州医薬品庁 EMEA/CHMP 2005, 183989
/2004)。カプシド化した残存DNAの多くは、逆方向末端反復配列 (i n v
e r t e d t e r m i n a l r e p e a t, I T R) を含むベクタープラスミ
5 ドテンプレートに由来する。

【発明の概要】

【0004】

本発明は、組換えベクタープラスミドおよびベクターゲノムを含む(カプシド化す
る、またはパッケージする) ウイルス粒子を提供する。一実施形態では、組換えベ
10 クタープラスミドは、異種ポリヌクレオチド配列と、フィラー (f i l l e r) ポ
リヌクレオチド配列またはスタッパー (s t u f f e r) ポリヌクレオチド配列
を含む。

【0005】

本発明はまた、AAVベクタープラスミドおよびAAVベクターゲノムを含む(カ
15 プシド化する、またはパッケージする) AAV粒子を提供する。一実施形態では、
組換えAAVベクタープラスミドは、異種ポリヌクレオチド配列と、フィラーポリ
ヌクレオチド配列またはスタッパーポリヌクレオチド配列を含む。

【0006】

種々の実施形態では、異種ポリヌクレオチド配列の長さは約4.7Kb未満とす
20 る。特定の態様では、異種ポリヌクレオチド配列は、長さが約4.7Kb未満で、
アデノ随伴ウイルス(AAV)の二か所のITR配列の内側に位置するものとする。
特定の態様では、異種ポリヌクレオチド配列とフィラーまたはスタッパーポリヌ
クレオチド配列を合わせた全体の長さは、約3.0~5.5Kb、または約4.0
~5.0Kb、または約4.3~4.8Kbとする。

【0007】

フィラーまたはスタッパーポリヌクレオチド配列は、ベクターの機能または活

性を損なわない限り、ベクター内の任意の所望の位置に配置することができる。ある態様では、フィラーまたはスタッパーポリヌクレオチド配列は、異種ポリヌクレオチド配列の5'末端および/または3'末端の外側にそれぞれ隣接する5'側および/または3'側 I T R配列の間には配置されないものとする。別の態様では、
5 フィラーまたはスタッパーポリヌクレオチド配列は、異種ポリヌクレオチド配列の5'末端および/または3'末端の外側にそれぞれ隣接する5'側および/または3'側 I T R配列の間に配置されるものとする。さらに別の態様では、フィラーまたはスタッパーポリヌクレオチド配列は、異種ポリヌクレオチド配列の5'末端および/または3'末端の外側にそれぞれ隣接する5'側および/または3'側
10 I T R配列に隣接して配置されるものとする。またさらに別の態様では、フィラーまたはスタッパーポリヌクレオチド配列は、例えばゲノム核酸中のイントロンのように異種ポリヌクレオチド配列内に配置されるものとする。

【0008】

従って、種々の実施形態では、1つのフィラーまたはスタッパーポリヌクレオチド配列は、アデノ随伴ウイルス(AAV)の2か所のI T R配列の内側に位置する、
15 または、1つのフィラーまたはスタッパーポリヌクレオチド配列は、アデノ随伴ウイルス(AAV)の2か所のI T R配列の外側に位置する、または、2つのフィラーまたはスタッパーポリヌクレオチド配列があり、第1のフィラーまたはスタッパーポリヌクレオチド配列はアデノ随伴ウイルス(AAV)の2か所のI T R
20 配列の内側に位置し、第2のフィラーまたはスタッパーポリヌクレオチド配列はアデノ随伴ウイルス(AAV)の2か所のI T R配列の外側に位置することになる。

【0009】

さらにまた種々の実施形態では、フィラーまたはスタッパーポリヌクレオチド配列は、その長さが1~10、10~20、20~30、30~40、40~50、
25 50~60、60~75、75~100、100~150、150~200、200~250、250~300、300~400、400~500、500~750、

750～1,000、1,000～1,500、1,500～2,000、2,000～2,500、2,500～3,000、3,000～3,500、3,500～4,000、4,000～4,500、4,500～5,000、5,000～6,000、6,000～7,000、7,000～8,000または8,000～9,000ヌクレオチドの配列とする。

【0010】

さらに特定の態様では、フィラーまたはスタッパーポリヌクレオチド配列がアデノ随伴ウイルス（AAV）の二か所のITR配列の間に位置する場合には、異種ポリヌクレオチド配列とフィラーまたはスタッパーポリヌクレオチド配列を合わせた全体の長さは、約3.0～5.5Kb、または約4.0～5.0Kb、または約4.3～4.8Kbとする。また別の特定の態様では、フィラーまたはスタッパーポリヌクレオチド配列がアデノ随伴ウイルス（AAV）の二か所のITR配列の外側に位置する場合には、フィラーまたはスタッパーポリヌクレオチド配列の長さは4.7Kbを超えるものとし、約5.0～10.0Kbまたは約6.0～8.0Kbとする。

【0012】

ある態様では、フィラーまたはスタッパーポリヌクレオチド配列は不活性または無害であり、機能や活性を有しない。種々の特定の実施形態では、フィラーまたはスタッパーポリヌクレオチド配列は細菌のポリヌクレオチド配列ではなく、フィラーまたはスタッパーポリヌクレオチド配列はタンパク質やペプチドをコードする配列ではなく、フィラーまたはスタッパーポリヌクレオチド配列は異種ポリヌクレオチド配列、AAV逆方向末端反復配列（ITR）、発現制御要素、複製起点、選択マーカ―またはポリアデニン（poly-A）配列のいずれとも異なる配列である。

【0014】

本発明の組換えベクター（例えばAAV）プラスミドおよび組換えベクター（例え

ばAAV) ゲノムを含む(カプシド化する、またはパッケージする) ウイルス(例えばAAV) 粒子において、異種ポリヌクレオチド配列は転写され引き続きタンパクに翻訳されるか、またはそれ自体で機能や活性を有する転写物に転写され得る。ある実施形態では、異種ポリヌクレオチド配列は治療効果を有するタンパク質をコードする。特定の⁵ 実施形態では、当該タンパク質は、血液凝固因子(例えば第XIII因子・・・)、・・・である。

【0018】

本発明の組換えベクター(例えばAAV) プラスミドおよび組換えベクター(例えばAAV) ゲノムを含む(カプシド化する、またはパッケージする) ウイルス(例えばAAV) 粒子は、シスまたはトランスで機能する追加の要素を含む。¹⁰ 特定の¹⁰ 実施形態では、組換えベクター(例えばAAV) プラスミドおよび/または組換えベクター(例えばAAV) ゲノムを含む(カプシド化する、またはパッケージする) ウイルス(例えばAAV) 粒子はまた、異種ポリヌクレオチド配列の5'末端または3'末端に隣接する一つ以上の逆方向末端反復配列(ITR)、異種ポリヌクレオチド配列の転写を駆動する発現調節配列(例えば構成的または制御可能な調節配列の様に異種ポリヌクレオチド配列の転写に寄与するプロモーターまたはエンハンサー、または組織特異的発現調節要素)、異種ポリヌクレオチド配列の3'に位置するポリアデニン配列、選択マーカー(例えばカナマイシン抵抗性の様な抗生物質抵抗性を付与するタンパク質)、および/または複製の起点を含む。¹⁵

²⁰ 【図面の簡単な説明】

【0027】

【図1】 精製されたAAVベクター調製物に含まれるプラスミドDNA不純物のレベルが導入遺伝子カセットの大きさに依存することを示す。

【0028】

²⁵ 【図2】 PCRおよび導入遺伝子カセットと上流側のプラスミドバックボーン配列にわたる領域をカバーする一連のプライマーを用いて行ったベクターゲノムの5'

末端のマッピングを、DNase I 処理の前後で示す。導入遺伝子カセット内部に位置する単独のプライマー（円で囲む）を、導入遺伝子カセットと抗生物質耐性遺伝子（Kan^RおよびAmp^R）を含むプラスミドバックボーンの隣接断片の配列にわたるプライマーと組み合わせて使用した。PCR反応は1%アガロースゲル電気泳動法で解析された。

【0029】

図2A～2Dは、DNase I 処理の前後のショートまたはロング導入遺伝子カセットを含むベクターのPCRを示す。

【図2A】DNase I 処理前のショート導入遺伝子カセット（2.7 kb）を含むベクターのPCRを示す。

【図2B】DNase I 処理およびDNA精製後のショート導入遺伝子カセット（2.7 kb）を含むベクターのPCRを示す。

【図2C】DNase I 処理前のロング導入遺伝子カセット（4.3 kb）を含むベクターのPCRを示す。

【図2D】DNase I 処理およびDNA精製後のロング導入遺伝子カセット（4.2 kb）を含むベクターのPCRを示す。

【0030】

図3A～3Bは、導入遺伝子カセットを含む生産プラスミドDNAに対して前述の一連のプライマーセットを用いて行ったプラスミドコントロール（対照）PCRを、DNase I 処理の前後で示す。

【図3A】導入遺伝子カセット（2.7 kb）を含むプラスミドを示す。

【図3B】導入遺伝子カセット（4.3 kb）を含むプラスミドを示す。

【図3C】DNase I 処理後のプラスミドサンプルを示す。

【0031】

【図4】ショート導入遺伝子カセットを含むベクター内へのプラスミドDNAのカプシド化（encapsulation）の略図を示す。

【0032】

【図5】トランス (t r a n s) に存在するAAVのパッケージング許容限界サイズを超えるサイズ超過プラスミドバックボーン (7 . 1 K b) が、ベクター以外のDNAのパッケージングを著しく低下させることを示す。

5 **【0033】**

【図6】通常サイズ (円) 対サイズ超過 (三角) のバックボーンを含むベクタープラスミドを用いて作成されたAAVベクターの精製物中に含まれる残存プラスミドDNAを示す。

【発明を実施するための形態】

10 **【0034】**

ここに開示される研究は、組換えアデノ随伴ウイルス (r A A V) の本来のパッケージング許容限界サイズ (約 4 . 7 k b) より短いベクター発現カセットを含む r A A V ベクタープラスミドでは、残留プラスミドDNA不純物のレベルが上昇したこと、および配列が r A A V の本来のパッケージング許容限界サイズより短いほど不純物のレベルが上昇したことを示す。具体的な例を示すと、 r A A V の A (2 . 7 k b サイズ) は 1 6 4 p g / 1 0 ⁹ v g の残存プラスミドDNAを含んでいた (n = 9) 。 r A A V の B (3 . 7 k b サイズ) は 4 2 . 7 p g / 1 0 ⁹ v g の残存プラスミドDNAを含んでいた (n = 3 2) 。 r A A V の C (4 . 3 k b サイズ) は 1 4 . 0 p g / 1 0 ⁹ v g の残存プラスミドDNAを含んでいた (n = 2 9) 。よって、
15
20 これらの研究は、ベクターの設計時に発現カセットの長さをウイルス (A A V) のカプシドの (本来の) パッケージング許容限界サイズと同じかそれに近くなるように調整することで、夾雑核酸のカプシド化を低減または阻止でき、よってカプシド化した核酸不純物を含むウイルス (A A V) 粒子が減少することを示す。

【0035】

25 従って本発明は、ウイルス (A A V) の本来のパッケージング許容限界サイズに近いサイズの配列を有する組換えベクター (例えば A A V) プラスミド、および該組

換えベクター（例えばAAV）プラスミドを、例えば、残存DNA不純物量を少なくしたかまたはこれを含まない組換えウイルス粒子を作成するために用いる方法を提供する。例えば、ベクターゲノム配列のサイズを最適化することで、抗生物質抵抗性を生じる細菌遺伝子の様な望ましくない核酸配列のベクターを介した導入に関する潜在的危険性を軽減できる。

【0036】

パッケージされた（カプシド化された）領域（「ベクター」または「ベクターゲノム」と称される）がウイルス（例えばAAV）の本来のパッケージング許容限界サイズに近いサイズを有する本発明の組換えベクター（例えばAAV）プラスミドは、望ましいまたは治療的效果を提供するタンパク質をコードする配列（遺伝子）の様な異種ポリヌクレオチド配列、ならびに望ましくないまたは欠陥のある（たとえば病原性の）遺伝子の発現を低下または阻害する抑制性（例えばアンチセンス）核酸の導入・送達に用いることができ、従って種々の疾病を治療し得る。例えば、パッケージされた（カプシド化された）領域（ベクターゲノム）がウイルス（AAV）の本来のパッケージング許容限界サイズに近いサイズの配列を有する組換えベクター（例えばAAV）プラスミドは、A型またはB型血友病の様な遺伝的欠損疾患、他の代謝または血漿タンパク質の欠陥の治療、および他の治療目的のために治療的遺伝子を導入・送達するために用いることができる。

【0040】

組換え「ベクタープラスミド」および「AAVベクタープラスミド」は、AAVなどのウイルスの野生型ゲノムに由来し、分子学的手法を用いてウイルス（例えばAAV）から野生型ゲノムを取り除き、異種ポリヌクレオチド配列（例えば治療的遺伝子発現カセット）の様な外来の核酸で置換している。通常は、AAVの場合には、野生型AAVゲノムの逆方向末端反復（ITR）配列の片方または両方がAAVベクタープラスミドに残される。ウイルスゲノムの全体または一部が異種ポリヌクレオチド配列によって置換されており、該異種ポリヌクレオチド配列は通常はウイル

ス（例えばAAV）ゲノム核酸に対しては外来の核酸であるので、ウイルスベクター（例えばAAV）はウイルス（例えばAAV）ゲノムとは区別される。

【0078】

「ベクター」という用語は、ポリヌクレオチドの挿入または組み込みによって操作
5 することができるプラスミド、ウイルス（例えばAAVベクター）、コスミドまたは
は他の輸送媒体（vehicle）を指す。そのようなベクターは、ポリヌクレオ
チドを細胞内に導入・移入し、細胞内に挿入されたポリヌクレオチドを転写または
翻訳するための遺伝子操作（すなわち「クローニングベクター」）に用いることが
10 できる。ベクタープラスミドは一般に、細胞内で増殖するための複製起点を少なく
とも一つ含み、随意に、異種ポリヌクレオチド配列、発現調節因子（例えばプロモ
ーター、エンハンサー）、選択マーカー（例えば抗生物質抵抗性）、ポリアデニン
配列のような追加因子を含む。

【0080】

組換えベクタープラスミドについては、ベクターゲノムは、ウイルス（例えばAA
15 V）によってパッケージまたはカプシド化され、異種ポリヌクレオチド配列を含む
ベクタープラスミドの一部を指す。組換えベクタープラスミドのプラスミド部位は、
ヘルパー細胞のトランスフェクションおよび細胞によるベクターゲノムをパッケー
ジ／カプシド化するウイルスの産生に用いられるバックボーン配列を含むが、それ
自体はウイルス（例えばAAV）によってパッケージ／カプシド化されない。

【0082】

ここで定義される組換えベクタープラスミドは、パッケージまたはカプシド化さ
れて感染能力のあるウイルス粒子を形成するウイルスゲノム配列の正常なサイズ、
またはそれに近いサイズに長さを変更または調節する、追加的なフィラー／スタッ
ファー核酸配列を含む。種々の実施形態では、フィラー／スタッファー核酸配列は、
25 核酸の非翻訳（タンパクをコードしない）断片（segment）である。AAV
ベクターの特定の実施形態では、異種ポリヌクレオチド配列は、その長さが4.7

K b 未満であり、フィラーまたはスタッパーポリヌクレオチド配列は、異種ポリヌクレオチド配列と合わせた（例えばベクター内に挿入された）時の全長が約 3.0 ~ 5.5 K b、または 4.0 ~ 5.0 k b、または 4.3 ~ 4.8 k b である。・・・

【0083】

- 5 ここで開示されるように、フィラーまたはスタッパーポリヌクレオチド配列は、異種ポリヌクレオチド配列、調節因子、ITR、複製起点、選択マーカ等他の配列に対して、組換えベクタープラスミド内のベクター機能と両立できる任意の位置にあってよい。ある特定の形態では、フィラーまたはスタッパーポリヌクレオチド配列は、異種ポリヌクレオチド配列の 3' 末端と 5' 末端にそれぞれ隣接する
- 10 3' ITR と 5' ITR との間に位置し、例えば AAV ベクタープラスミドにおいては、フィラーまたはスタッパーポリヌクレオチド配列は、組換えベクタープラスミドのベクターゲノム部分内に存在し、従ってウイルスのパッケージ/カプシド化に用いられる。別の特定の形態では、フィラーまたはスタッパーポリヌクレオチド配列は、異種ポリヌクレオチド配列の 3' 末端と 5' 末端にそれぞれ隣接する
- 15 3' ITR と 5' ITR の外側に位置し、例えば AAV ベクタープラスミドにおいては、フィラーまたはスタッパーポリヌクレオチド配列は、組換えベクタープラスミドのバックボーンまたはプラスミド部分内に存在する。また別の特定の形態では、フィラーまたはスタッパーポリヌクレオチド配列は、異種ポリヌクレオチド配列の内部に位置し、例えば AAV ベクタープラスミドにおいては、異種ポリヌクレオチド配列の内部に位置するフィラーまたはスタッパーポリヌクレオチド配列は、組換えベクタープラスミドのベクターゲノム部分内に存在し、従ってウイルスのパッケージ/カプシド化に用いられる。

実施例

実施例 1

25 【0162】

標準的 PCR を、PCR 増幅の陽性対照として AAV ベクターゲノム配列を含む

プラスミッドDNA（図3、パネルAとB）、精製ベクター調製物から抽出されたベクターゲノムDNA（図2、パネルAとC、それぞれベクターゲノムサイズが2.7 Kbおよび4.2 Kb）、およびベクターをDNase Iで処理した後抽出されたベクターゲノムDNA（図2、パネルBとD、それぞれベクターゲノムサイズが2.7 Kbおよび4.2 Kb）に対して実施した。導入遺伝子カセット内に位置するプライマー（図の赤丸）は、導入遺伝子カセット中の配列と、抗生物質耐性遺伝子（KanRまたはAmpR）を含むプラスミッドバックボーンの隣接断片中の配列とをカバーする一組のプライマーと対を構成し、それぞれのPCRに用いられた。PCR反応物は1%アガロース/EtBrゲル電気泳動法によって解析された。

10 【0163】

図3のデータ、PCR増幅の対照、プラスミッドDNA。プラスミッドDNAがテンプレートとして用いられたとき、すべてのプライマー対（9プライマー対、パネルAとB）についてPCR断片が生成し、本研究で使われたすべてのプライマー対がPCR産物を生成することが示唆された。すべてのPCR産物は、プラスミッド配列とプライマーの位置に基づいて予測される期待されたサイズを示した。期待されたとおり、PCR前にプラスミッドサンプルがDNase Iで処理された場合には、PCR増幅は認められなかった（パネルC）。

【0164】

図2のデータ。精製されたベクターから抽出されたDNAに対してPCRが行われたときには、一組のプライマー対のみが実験でPCR産物を与えた（2.7 Kbの短いゲノムを有するベクターに6プライマー対（パネルAとB）、4.2 Kbの長いゲノムを有するベクターに4プライマー対（パネルCとD））。PCR産物の最大のサイズ（PCR増幅の外側のベクターゲノム配列と併せて）は、増幅されたDNAの最大サイズがAAVウイルスのパッケージング許容限界（4.5 Kb）と対応することを示した。

【0165】

ベクターからDNAを抽出する前にベクター調製物を DNase I で処理しても (図2、パネルBとD)、PCR増幅パターンに変化は認められなかった (図2、パネルAとCを、それぞれパネルBとDと比較)。すなわち、PCR産物を生成するプライマー対の数とPCR産物のサイズに変化は無く、PCRによって増幅された配列 (ベクターゲノムおよび隣接配列) は、DNase から保護され、カプシド化されていることが示唆された。

【0166】

カプシド化されたDNAのサイズ (例えばベクターゲノムサイズと併せたDNase 耐性プラスミドバックボーンDNA) は、短いゲノムを有するベクターと長いゲノムを有するベクターとで同等であり、AAVウイルスのパッケージング許容限界 (4.5 Kb) にほぼ対応した。短いゲノムを有するベクター内にパッケージされたDNAは、ゲノムに隣接するプラスミド配列を含み、短いゲノムを有するベクターは、AAVウイルスの最大パッケージング許容限界までのサイズのプラスミド配列をパッケージすることが示された。

15 実施例2

【0167】

この実施例は、GMP適合の製造工程を用いた組換えAAVウイルスの生成および精製についての記述を含む。

【0168】

20 残存プラスミドDNAのレベルは、以下のサイズ範囲の一本鎖標準導入遺伝子発現カセットを含む一連のAAV2ベクターにおいて評価された。すなわち、rAAV Aは2.7 kb (野生型のサイズの57%)、rAAV Bは3.7 kb (野生型の83%)、およびrAAV Cは4.3 kb (野生型の91%)である。構築物毎に複数のロットを、同一のプロセスを用いて生成および精製した。ベクターは、25 HEK293細胞のヘルパーウイルスを必要としないトランスフェクションによって作出され、陽イオン交換クロマトグラフィー (foros SOHS) と isoQ

V C n i c 塩化セシウム超遠心の併用により精製された。

【0169】

残存プラスミドDNAの濃度は、ベクター調製物1ml当たりのK a n R 遺伝子
コピー数として測定され、K a n R (A m p R) のコピー数は完全長プラスミドの
5 コピー数を示す(最悪の場合でも)と仮定して、ベクターゲノム(v g)の%、ま
たは 10^9 v g 当たりの p g として表した。ベクターの力価および残存プラスミド
DNAの濃度は、導入遺伝子プラスミドのバックボーン内の導入遺伝子カセットの
5' I T R の近傍に位置するK a n R またはA m p R 遺伝子に特異的なプライマー
とプローブを用い、T a q M a n 技術を製造者のプロトコールに従って使用してリ
10 アルタイム定量P C R (q P C R) により測定された。

【0170】

D N a s e 実験では、 1×10^6 コピーのベクターゲノムまたはプラスミドが、5
UのD N a s e 1 によって消化された。増幅は、P C R 反応毎に500コピー数の
ベクターゲノムまたはプラスミドを用いて標準的P C R によって行われた。短い導
15 入遺伝子カセットを有するA A V ベクター中のプラスミドDNA不純物は、D N a
s e に抵抗性であり、ベクタープラスミドのI T R の近傍のプラスミドDNA断片
がカプシド化されたことが示された。

【0171】

残存プラスミドDNAは、ベクターサンプル中の標的q P C R 増幅産物のコピー
20 数の測定値に基づき、保守的方法により定量された。すなわち、コピー数にプラス
ミドのM r を乗じて算出された。導入遺伝子カセットサイズの関数としての不純物
レベルを図1に要約した。評価により、r A A V A (サイズは2.7 k b) は16
4 p g / 10^9 v g (n = 9)、r A A V B (サイズは3.7 k b) は42.7 p
g / 10^9 v g (n = 32)、そして r A A V C (サイズは4.3 k b) は14.
25 0 p g / 10^9 v g (n = 29) の残存プラスミドDNAをそれぞれ含むことが示さ
れた。

【0172】

さらに、ベクタープラスミド「バックボーン」DNAのパッケージングが、ITRからの「逆転パッケージング」を介してかなりの程度で起こり、それはサイズ超過(>4.7bp)のバックボーンを用いることで大幅に減少する(図5)。

5 実施例3

【0173】

この実施例は、サイズ超過バックボーンを用いずに調製されたベクターのDNA不純物を、サイズ超過バックボーンを用いて調製したベクターと比較した研究についての記述を含む。

10 【0174】

ヒト胎児腎臓(HEK)293細胞の一過性トランスフェクションによるベクター産生に基づき、以下に記述するベクター産生および精製方法に従い、一連の12バッチの組換えAAVベクターを同一の方法で調製した。

HEK293細胞培養におけるベクター産生：

- 15 1. T75フラスコ内でHEK293のマスター・セル・バンク細胞の培養を開始
2. 細胞を約二個のT225フラスコに継代
3. 細胞を約二個のローラーボトルに継代
4. 細胞を約10個のローラーボトルに継代
5. 細胞を約102個のローラーボトルに継代
- 20 6. サイズ超過ベクターバックボーンを有するベクタープラスミド、またはサイズ超過ベクターバックボーンを有しないベクタープラスミドを含むプラスミドDNAで細胞をトランスフェクション
7. 無血清培地に交換

ベクター精製(下流工程)：

- 25 8. ベクター含有細胞および培養液の回収
9. 回収物のタンジェンシャルフローろ過(Tangentia l Flow Fi

l t r a t i o n (T F F)) (1 0 0 k D a) による濃縮および透析ろ過

1 0 . 濃縮された回収物の微細流動化

1 1 . 微細流動化中間産物のろ過 (0 . 6 5 μ m / 0 . 2 μ m 連続細孔径)

1 2 . イオン交換クロマトグラフィーによる精製

5 1 3 . 塩化セシウム等密度勾配超遠心法による精製

1 4 . T F F (1 0 0 k D a) によるバッファー交換

1 5 . 製剤化および 0 . 2 μ m ろ過による精製バルクベクターの調製

1 6 . 最終 0 . 2 μ m ろ過、バイアルへの充填、仕上げによるバイアル充填された精製ベクターの調製

10 【 0 1 7 5 】

サイズ超過バックボーンを含む生産プラスミドベクターを用いて調製された 9 バッチのベクター、およびサイズ超過バックボーンを含まない生産プラスミドベクターを用いて調製された 3 バッチのベクターの精製ベクターのサンプルを、精製されたベクター生産物の一部であることが意図されない (よって不純物である) アンピシリンおよびカナマイシン抵抗性遺伝子の残存レベルの q P C R 測定によって決定

15 される残存宿主細胞プラスミド DNA の測定に供した。この不純物の測定に用いた方法を以下に記す。

リアルタイム q P C R による残存プラスミド DNA

【 0 1 7 6 】

20 記述された T a q M a n R リアルタイム q P C R 手法は、標的特異的 Q - P C R プライマーおよびプローブを用いて、ベクター生成に用いられた生産プラスミド内の特異的配列 (A m p^R または K a n^R) を検出する。一つの標的がベクター製造で用いられたすべてのプラスミドに共通である場合には、総残存プラスミドは単回の q P C R 試験で決定された。 A m p^R および K a n^R の両方がある特定のバッチの一つ

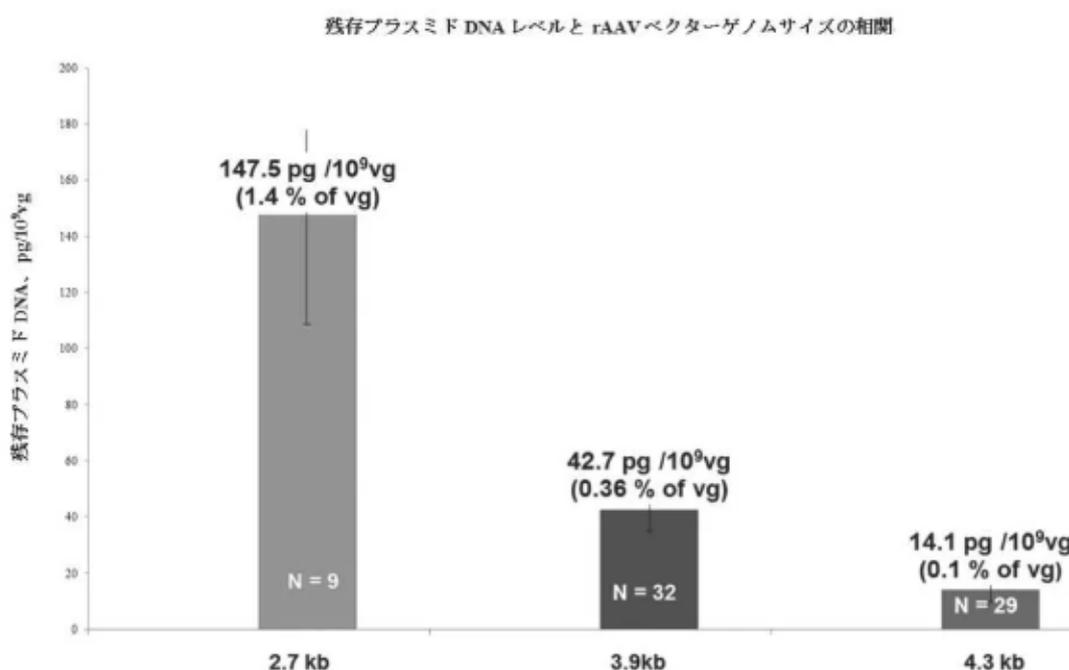
25 つ以上の生産プラスミド内に存在する場合には、総残存プラスミドはそれぞれ別々の試験で決定された A m p^R の残渣 DNA と K a n^R の残渣 DNA の和として算出

された。・・・

【0177】

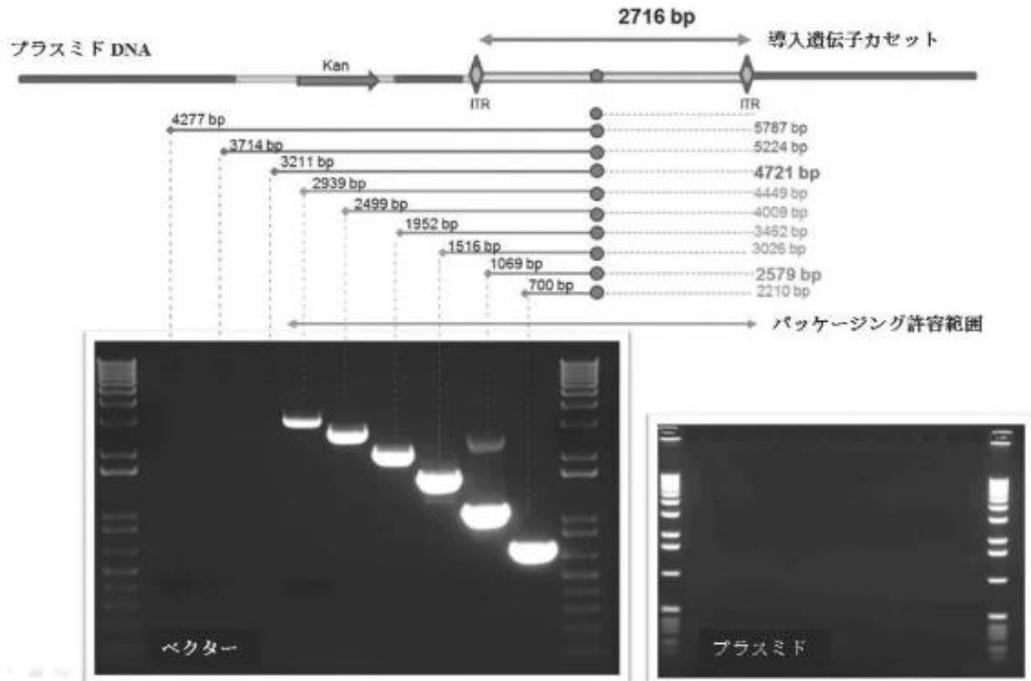
図6に示される12の定量結果で得られた残存プラスミドDNA不純物レベルにおいては、サイズ超過バックボーンを含まない（欠く）ベクタープラスミドを用いて調製されたベクター中の 10^9 ベクターゲノム当たりのプラスミドDNA不純物の平均は301pgで、これはサイズ超過バックボーンを用いて調製されたベクターで測定された 10^9 vg当たりのプラスミドDNA不純物の平均である60pgと比較して、5倍高い値であった。従って、ベクタープラスミド内のサイズ超過バックボーンは、ウイルスベクターの調製において不純物の低減に使用することができる。

【図1】



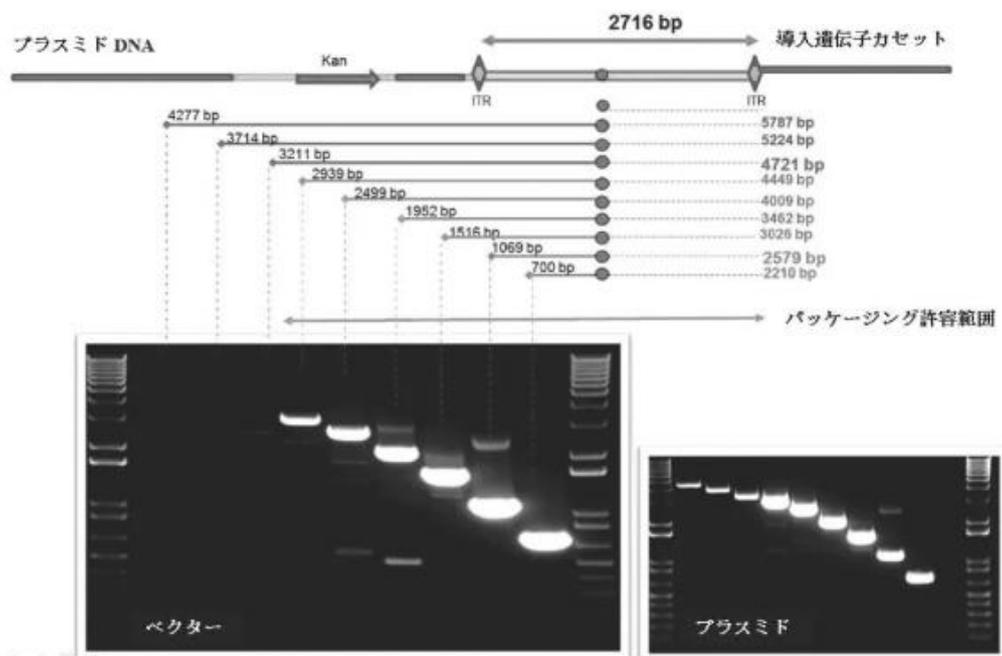
【図 2 A】

DNase 処理前の短い (2.7kb) 導入遺伝子カセットを含むベクターの PCR



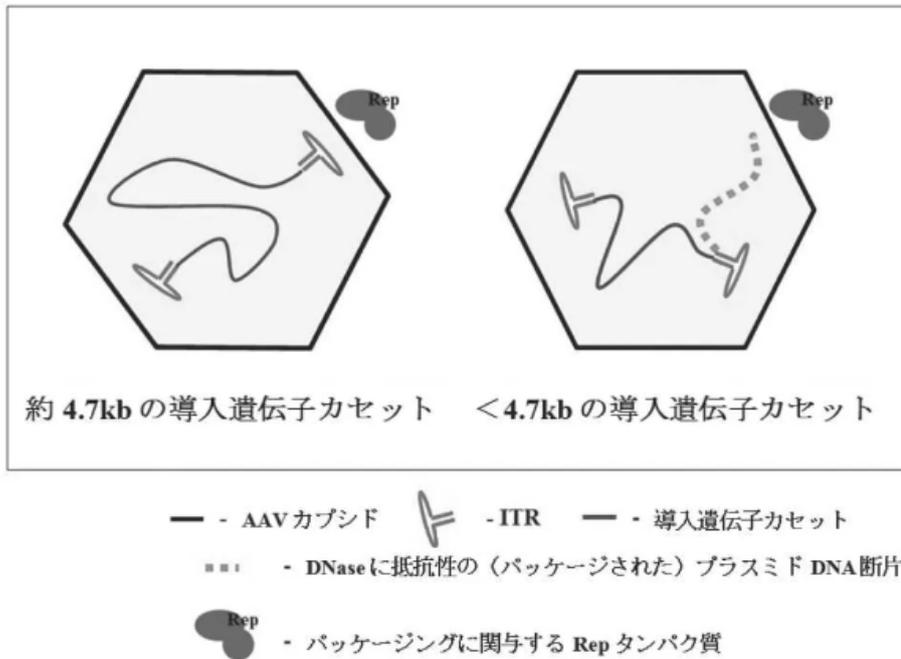
【図 2 B】

DNase 処理および High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche) による DNA 精製後の短い (2.7kb) 導入遺伝子カセットを含むベクターの PCR



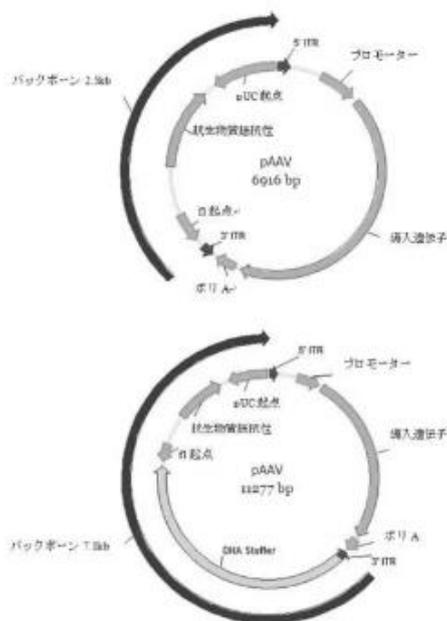
【図4】

短い導入遺伝子カセットを含むベクター内のプラスミド DNA のカプシド化を示す略図



【図5】

AAV のパッケージング許容限界を超えるサイズ超過プラスミドバックボーン (7.1 Kb) は、非ベクター DNA のパッケージングを著しく低下させる。



種々の産生システムを用いる：

- pRC プラスミドを用いたトランスフェクション
- pDG プラスミドを用いたトランスフェクション
- 産生細胞株を用いた rAd 感染

すべての方法で、シス (cis) プラスミドバックボーンの顕著なパッケージングが認められた。密度勾配遠心法により精製されたベクターではこの産生物関連不純物は vg 含有粒子の 3~7% である。

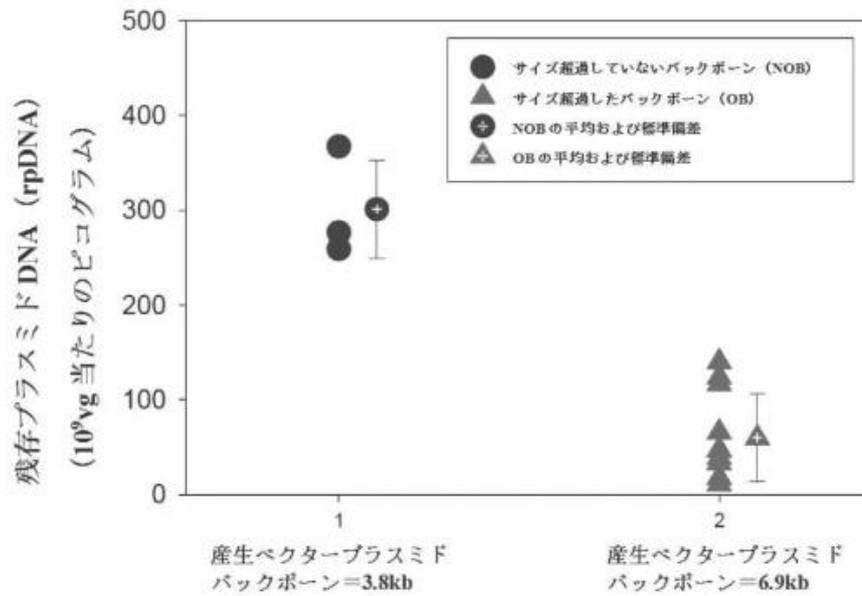
(密度に基づく分離ステップを使わずに精製されたベクターではより高いと思われる。)

(Chaduf ら、(2005)、Mol. Ther. 12:744)

サイズ超過バックボーンを用いると残存プラスミド DNA は約 40 分の 1 (0.1~1.0%) に減少する。

【図6】

サイズ超過¹していない（赤）対サイズ超過した（緑）バックボーンを含むベクタープラスミドを用いて作成した精製 AAV
ベクター中に含まれる残存プラスミド DNA



¹サイズ超過とは、すなわちアデノ随伴ウイルスのパッケージング許容限界（約 4.7kb）を超えるサイズ。

(別紙2)

(1-1)

「・・・臨床用ベクター中のキャプシド形成するDNA不純物を最小限に抑えるため、次の2つの方法が用いられた。(i) AAVのパッケージング限界を超えるバックボーンを持つベクター(cis)製造用プラスミド;および(ii)ベクター
5 に関連する不純物(例:空キャプシド)からベクターの分離を達成するベクター精製工程。結論として、AAV2-hFIX臨床用ベクターによる導入後、残留capの発現は検出されなかった。」(1頁左欄14~20行)

10 (1-2)

「ベクタープラスミドのバックボーンサイズがDNAの不純物レベルに与える影響

これまでの研究では、キャプシド形成するプラスミドDNA不純物は、主にITR含有ベクター(cis)製造用プラスミドのバックボーンに由来することが報告
15 されていた。ベクタープラスミドのバックボーンサイズが、組換えAAV2およびAAV6における残留プラスミドDNA不純物の量に及ぼす影響が評価された。残留プラスミドDNAのレベルは、ベクター生成に使用した3つの産生プラスミドに共通する配列であるAmp^Rに特異的なプライマーとプローブを用いたQ-PCRで測定した(表1)。この実験で比較したベクターは、それぞれ共通
20 の方法(chromatography-gradient)で生成及び精製されているため、ベクターの純度が高く、空キャプシドが除去されており、また非キャプシド形成型核酸の不純物が除去された、効率的なヌクレアーゼ消化工程が含まれた。ベクタープラスミドを用いて生成した5ロットの平均残留プラスミドDNAレベルを測定したところ、特大(6980bp)のバックボーンを持つプラスミド(ロット0
25 6002、003A、NHP、0802、0803)は14.2±2.6pg/10⁹vgで、それよりも小さい(2620bpまたは2638bp)のバックボ

5 ーンを持つベクタープラスミドを用いて作製された5ロット（ロット N0701、0701、0702、0703、0801）で測定された平均値107.6 ± 27.6 pg/10⁹vgよりも7.6倍低かった（P<0.001）。そのため、ベクター製造用プラスミドに特大のバックボーンを使用することで、プラスミド由来のDNA不純物の大幅な削減が達成された。」（146頁右欄17～40行）

(1-3)

表1 精製したAAVベクターに含まれるDNA不純物のレベル

ベクターロット#	精製方法	セロタイプ	導入遺伝子/サイズ (nt)	バックボーン/サイズ (nt) ^a	293DNA (pg/10 ⁹ vg)	プラスミドDNA (pg/10 ⁹ vg)
1053	grad-only ^b	2	hFIX/4297	6,980	—	8.6
DCL 1	gen1-Chr ^c	2	hFIX/4297	6,980	208	44.8
DCL 2	gen1-Chr	2	hFIX/4297	6,980	127	24.2
DCL 3	gen1-Chr	2	hFIX/4297	6,980	122	30.1
DCL 4	gen1-Chr	2	hFIX/4297	6,980	89	37.9
06002	chr-grad ^d	2	hFIX/4297	6,980	27	11
003A	chr-grad	2	hFIX/4297	6,980	20.9	13.0
NHP	chr-grad	2	hFIX/4297	6,980	38.5	13.3
0802	chr-grad	6	hFIX/4297	6,980	7.5	15.8
0803	chr-grad	6	hFIX/4297	6,980	6.3	17.7
N0701	chr-grad	6	U/4679	2,638	16.4	122
0701	chr-grad	6	U/4679	2,638	10.1	77.6
0702	chr-grad	6	D/4811	2,620	12.8	103
0703	chr-grad	6	D/4811	2,620	8.7	147
0801	chr-grad	2	cFIX/4406	2,620	16.9	88.3

略語：AAV、アデノ随伴ウイルス；vg、ベクターゲノム。

^aベクター (cis) 製造用プラスミドのバックボーンサイズ。 ^bgradient-only精製法。 ^cgen1-chromatography精製法。 ^dchromatography-gradient 精製法。

10

(147頁表1)

(1-4)

15 「今回の研究で、AAVのパッケージング限界よりも小さいバックボーンを持つベクタープラスミドを用いてHEK293細胞に遺伝子導入（トランスフェクション）してAAVベクターを作製したところ、得られたベクターに含まれるヌクレオチド耐性プラスミドDNAの不純物は2.9～5.7%であり、他者による過去の報告と一致していた。キャプシド形成するプラスミドDNAの主なソース

は、ITRを含むベクタープラスミドのバックボーンであった。

・・・

バックボーンがAAV2のパッケージング容量を超えるようにスタッパー配列を改変したベクタープラスミドを使用した場合の効果を調べたところ、この戦略により、キャプシド形成したプラスミドDNA不純物のレベルが大幅に減少することが判明した（7.6倍、 $P < 0.001$ ）。AAV2以上のパッケージング容量を持つベクター血清型では、リバースパッケージングを防止するために必要なバックボーンサイズもそれに応じて大きくなることが予測される。」（149頁右欄下から10行～150頁左欄8行）。

10

（1-5）

「材料および手法

AAVの生成と精製。ベクターの生成は、改変した3個のプラスミドを用いたHEK293細胞のヘルパーウイルスフリーの遺伝子導入によって実施した。臨床用AAV2-hFIXベクターロット1053は、2回の塩化セシウム勾配超遠心法（gradient-only法）により精製した。本研究では、さらに追加で14ロットのAAVベクターが製造され、分析が行われた。ヒト凝固第IX因子（AAV-hFIX）を発現するAAV2ベクター8ロットとAAV6ベクター2ロットは、AAVのパッケージング限界である約4700ntを超過する6980bpのバックボーンを含むベクタープラスミドを用いて作製した。1ロットのAAV2、4ロットのAAV6が2620bpまたは2638bpのバックボーンを持つベクタープラスミドを用いて作製された。」（150頁左欄下から11～1行）

20