

BUNDESPATENTGERICHT

14 W (pat) 31/98

(Aktenzeichen)

Verkündet am
29. September 2000

...

BESCHLUSS

In der Beschwerdesache

betreffend die Patentanmeldung 197 27 962.7-41

...

hat der 14. Senat (Technischer Beschwerdesenat) des Bundespatentgerichts auf die mündliche Verhandlung vom 29. September 2000 unter Mitwirkung des Vorsitzenden Richters Dr. Moser sowie der Richter Dr. Wagner, Harrer und Dr. Feuerlein

beschlossen:

Die Beschwerde wird zurückgewiesen.

Gründe

I

Mit Beschluß vom 5. Februar 1998 hat die Prüfungsstelle für Klasse C 12 N die Patentanmeldung mit der Bezeichnung

"Fluoreszierende Proteine als zelltypspezifische Reporter"

zurückgewiesen.

Dem Beschluß liegen die am 28. Januar 1998 eingegangenen Ansprüche 1 bis 16 zugrunde, von denen Anspruch 1 wie folgt lautet:

"Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) nicht-menschlicher Säuger, die mit einem DNA-Konstrukt, umfassend

- eine für ein nicht-zellschädigendes fluoreszierendes Protein codierende DNA-Sequenz und
- einen mit dieser DNA-Sequenz operativ verknüpften, zell- und/oder entwicklungsabhängigen Promotor

stabil transfiziert sind."

Die Anmeldung wurde zurückgewiesen, weil der Gegenstand des Anspruchs 1 im Hinblick auf den durch die Entgegenhaltungen

(1) M. Zernicka-Goetz et al.; Following cell fate in the living mouse embryo; Development 124 (1997) 1133 bis 1137 und

- (2) E. Delabesse et al.; Green fluorescent protein (GFP) gene transfer into hematopoietic cell lines and ES cells; Blood 88 (10 Suppl. 1 Part 1-2) 1996, 295 b

belegten Stand der Technik mangels Neuheit nicht patentfähig sei. Aus (1) seien nämlich stabile Maus ES-Zellen (embryonale Stammzellen) bekannt, die mittels Elektroporation mit Hilfe eines DNA-Konstrukts, bestehend aus einer für Green Fluorescent Protein (GFP) codierenden DNA-Sequenz unter der Kontrolle des humanen cdc2-Promotors, transfiziert seien. Darüber hinaus werde bereits in (1) (s S 1136 reSp, leAbs bis S 1137 liSp Z 1) darauf hingewiesen, daß GFP ein nützlicher Anzeiger zur Sichtbarmachung der Abstammung spezifischer Zelltypen sei, wenn die Expression unter einem gewebespezifischen Promotor stattfinde.

Gegen diesen Beschluß richtet sich die Beschwerde des Anmelders. Er verfolgt sein Patentbegehren gemäß Hauptantrag mit den am 16. März 1998 eingegangenen Ansprüchen 1 bis 16, eingereicht mit Beschwerdeschriftsatz vom 12. März 1998, weiter, wobei der Anspruch 1 gemäß Hauptantrag lautet:

"Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) nicht-menschlicher Säuger, die mit einem DNA-Konstrukt, umfassend

- eine für ein nicht-zellschädigendes fluoreszierendes Protein codierende DNA-Sequenz und
- einen mit dieser DNA-Sequenz operativ verknüpften, zell- und/oder entwicklungsabhängigen Promotor

stabil transfiziert sind, wobei das DNA-Konstrukt in die native DNA integriert ist."

Hilfsweise verfolgt der Anmelder seine Patentanmeldung mit den Ansprüchen 1 bis 14 vom 31. August 2000, eingegangen am 1. September 2000, weiter, wobei der Patentanspruch 1 gemäß Hilfsantrag nach Berichtigung offensichtlicher Schreibfehler durch den Senat lautet:

"Zellkulturen mit zelltypspezifischer Expression eines nicht-zellschädigenden fluoreszierenden Proteins, bestehend aus Aggregaten (Embryoid Bodies) embryonaler Stammzellen (ES-Zellen) nicht-menschlicher Säuger, die mit einem DNA-Konstrukt, umfassend

- eine für das nicht-zellschädigende fluoreszierende Protein codierende DNA-Sequenz und
- einen mit dieser DNA-Sequenz operativ verknüpften, zell- und/oder entwicklungsabhängigen Promotor

stabil transfiziert sind, wobei das DNA-Konstrukt in die native DNA integriert ist."

Der Anmelder macht im wesentlichen geltend, daß (1) zwar stabile ES-Zellen betroffen würde. In dieser Druckschrift würden jedoch keinesfalls Maus ES-Zellen offenbart, die mit einem DNA-Konstrukt stabil transfiziert seien. Diese Einschätzung ergebe sich unmittelbar aus dem in (1) beschriebenen Verfahren sowie aus den Effekten, die bei den durch dieses Verfahren hergestellten Mäuseembryonen beobachtet werden könnten.

Der Anmelder weist insbesondere darauf hin, daß für den Erhalt der erfindungsgemäßen stabil transfizierten ES-Zellen ein Screening-Schritt unumgänglich sei. Ein solcher Screening-Schritt fehle dem in (1) offenbarten Verfahren aber vollständig.

Weiterhin ist der Anmelder der Auffassung, daß in (1) nur der unspezifische Promotor *cdc2* verwendet werde. Durch den Hinweis im letzten Absatz der Druckschrift (1), daß MmGFP auch unter gewebespezifischen Promotoren exprimiert werden könne, würden aber die stabil transfizierten ES-Zellen gemäß Anspruch 1 weder offenbart, noch für den Fachmann nahegelegt.

Darüber hinaus würden gemäß Hilfsantrag Embryoid Bodies, also künstliche Zellverbände mit kugelförmiger Struktur ("Sphäroide"), beansprucht, wohingegen Druckschrift (1) blastozystöse Strukturen, nämlich planare Zellkulturen (natürlich wachsend und undefiniert), aus gleichartigen Tumorzellen beträfe. Embryoid Bodies seien im Gegensatz zu den blastozystösen Systemen der Entgeghaltung (1) sehr sensible Zellsysteme, deren Entwicklung aus ES-Zellen mehrere äußerst empfindliche Entwicklungsschritte umfasse. Es sei überaus überraschend, daß die Bildung von Embryoid Bodies durch die Expression von GFP nicht behindert werde.

Der Anmelder macht auch ein Vorurteil der Fachwelt gegenüber den Zellkulturen mit zelltypspezifischer Expression des fluoreszierenden Proteins gemäß Hilfsantrag geltend. Er ist der Auffassung, daß der Fachmann bis zum Anmeldetag davon ausgegangen ist, daß die Expression von GFP - bei dem es sich um ein Produkt aus der Tiefseequalle und somit ein äußerst heterologes Protein für ein Säuger-Embryoid-Body-System handle - die Ausbildung von Embryoid Bodies behindere. Aus diesem Grund hätte der Fachmann eher konventionelle, dh in Säugern etablierte Reportergene, anstelle von GFP verwendet.

Die geltenden Patentansprüche gemäß Haupt- und Hilfsantrag seien daher neu und würden auch auf erfinderischer Tätigkeit beruhen.

Der Anmelder beantragt,

den angefochtenen Beschluß aufzuheben und das Patent zu erteilen anhand der Patentansprüche 1 bis 16, eingereicht mit Beschwerdeschriftsatz vom 12. März 1998, und der angepaßten Beschreibung

hilfsweise

das Patent zu erteilen gemäß Hilfsantrag vom 31. August 2000.

Wegen weiterer Einzelheiten des schriftlichen Vorbringens wird auf den Akteninhalt verwiesen.

II

Die Beschwerde des Anmelders ist zulässig (PatG § 73); sie konnte jedoch nicht zum Erfolg führen.

Es kann dahingestellt bleiben, ob die gültigen Ansprüche formal zulässig sind, weil das Patentbegehren in jedem Fall aus sachlichen Gründen scheitert.

A. Zum Hauptantrag

Die embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) nicht-menschlicher Säuger gemäß Anspruch 1 des Hauptantrags, die mit einem DNA-Konstrukt stabil transfiziert sind, wobei das DNA-Konstrukt in die native DNA integriert ist, sind nicht patentfähig.

In der Druckschrift (1) wird das Schicksal von Zellen im lebenden Mäuseembryo untersucht. Die Autoren von (1) weisen bereits im Summary auf Seite 1133 darauf hin, daß derartige Untersuchungen bisher schwierig waren, weil noch kein dauer-

hafter Marker bekannt war, mit dessen Hilfe Zellen in einem lebenden Embryo wieder erkannt werden können. Durch den Einsatz einer neuen Form des Green Fluorescent Protein (GFP), hier MmGFP genannt, konnte dieses Problem jedoch gelöst werden. Es wird eine stabile embryonale Stammzelllinie hergestellt, die MmGFP exprimiert.

Gemäß Seite 1134, 1. vollständiger Absatz in Verbindung mit Seite 1134, letzter Absatz werden embryonale Stammzellen mit einem DNA-Konstrukt transfiziert, das

- a) eine für ein nicht-zellschädigendes fluoreszierendes Protein codierende DNA-Sequenz, nämlich die MmGFP cDNA, und
- b) einen mit dieser DNA-Sequenz operativ verknüpften Promotor, den menschlichen *cdc2* Promotor, umfaßt.

Daß die MmGFP cDNA dabei in das Genom der ES-Zellen integriert wird, ist auf Seite 1136 rechte Spalte, Zeilen 9 bis 12 klargestellt. Darüber hinaus ist einem Fachmann - hier zB einem Molekularbiologen - bekannt, daß bei eukaryontischen Zellen eine stabile Replikation und damit Expression einer eingeschleusten DNA ohne Selektionsdruck in der Regel nur dann möglich ist, wenn diese DNA in das Genom der Wirtszelle integriert ist. Da MmGFP gemäß (1) auch in vivo exprimiert wird (siehe S 1135 rechte Spalte, letzter Absatz bis S 1136 linke Spalte, 1. Absatz), sind die ES-Zellen der Entgeghaltung (1) stabil transfiziert und das DNA-Konstrukt ist in die native DNA auch integriert. Dem Einwand des Anmelders, daß der Ausdruck "integrated" von Seite 1136 rechte Spalte, Zeile 11 nur als "introduced" im Sinne von Seite 1134 Zeilen 47 und 48 verstanden werden darf, kann daher nicht gefolgt werden.

Das in (1) eingesetzte DNA-Konstrukt enthält neben der MmGFP cDNA und dem *cdc2* Promotor als Selektionssequenz noch das Neomycin-Resistenz-Gen (neo^R) (vgl Anspruch 6 des Hauptantrags). Dieses Genkonstrukt wird durch Elektropora-

tion in die Zellen eingeführt. Aus diesen Zellen werden nach üblichen Verfahrensschritten Neomycin (G 418) resistente Zellen selektiert (siehe (1) S 1134 1. vollständiger Absatz). Damit stimmen die in (1) verwendeten Schritte der Transfektion und Selektion mit den Verfahrensschritten der Ansprüche 7 und 8 des Hauptantrags überein. Auch in (1) wird somit ein Screening-Schritt durchgeführt. Da gleiche Verfahrensschritte auch zu gleichen Endprodukten führen müssen, ist auch dieser Sachverhalt ein Beleg dafür, daß die ES-Zellen nicht-menschlicher Säuger gemäß (1) im Sinne der Anmeldung stabil transfiziert sind und das DNA-Konstrukt in die native DNA integriert ist. Eine gegenteilige Meinung wird durch die vorliegenden Anmeldungsunterlagen insbesondere die Beispiele nicht gestützt.

Aus der Druckschrift (1) geht ebenfalls hervor, daß die MmGFP cDNA-Sequenz mit einem entwicklungsabhängigen Promotor operativ verknüpft ist. Die MmGFP cDNA steht hier unter der Kontrolle des humanen cdc2 Promotors. Der menschliche cdc2 Promotor wird in ruhenden Zellen unterdrückt (S 1134, letzter Absatz, insbesondere Z 43 und 44 iVm Fig 1 und S 1135, Z 5 bis 10) und ist damit abhängig vom Entwicklungszustand der Zellen. Die vom cdc2 Promotor regulierte Expression des MmGFP nimmt auch mit fortschreitender Differenzierung der Zellen ab. Der cdc2 Promotor ist somit zweifelsfrei ein entwicklungsabhängiger Promotor im Sinne der Patentanmeldung. Von einem unspezifischen Promotor, wie ihn der Anmelder darstellt, kann hier keine Rede sein. Auf Seite 1136, rechte Spalte, letzter Absatz bis Seite 1137 linke Spalte, 1. Absatz wird sogar darauf hingewiesen, daß die Expression von MmGFP unter dem Einfluß eines gewebespezifischen Promotors (anmeldungsgemäß als zellspezifischer Promotor bezeichnet) nützlich für Untersuchungen von spezifischen Zelltypen sein kann. Folglich wird in (1) der Einsatz von zell- und/oder entwicklungsabhängigen Promotoren für den anmeldungsgemäßen Zweck offenbart.

Somit sind alle Merkmale des geltenden Anspruchs 1 gemäß Hauptantrag bereits in der Entgegenhaltung (1) offenbart, so daß die beanspruchten Stammzellen gegenüber dieser Druckschrift nicht mehr neu sind.

An dieser Beurteilung des Anmeldungsgegenstandes kann auch der Hinweis des Anmelders nichts ändern, daß mit der Methode der Entgegenhaltung keine stabile Transfektion erreicht werden könne, weil das GFP sowohl im Zellkern als auch im Cytoplasma vorhanden sei ((1) S 1134 Z 49 bis 51). Diese Aussage der Entgegenhaltung (1) bezieht sich eindeutig auf das Expressionsprodukt, nämlich das Protein (GFP), und nicht auf die MmGFP cDNA. Das Auffinden des Proteins steht aber in keinem direkten Zusammenhang damit, wo sich die das Protein codierende DNA in der Zelle befindet.

Auch der Hinweis auf (1) Seite 1135, Zeilen 7 bis 10 kann hier nicht durchgreifen. Es ist dem Anmelder zwar darin zuzustimmen, daß bei der Kultivierung der ES-Zellen in der Tat Zellen auftreten, die keine GFP Fluoreszenz mehr zeigen. Der Anmelder zitiert diese Textpassage aber nicht vollständig. Hier heißt es von Zeile 5 bis Zeile 10: "To demonstrate that MmGFP expressed from the cdc2 promoter can act as a marker for proliferating cells, we induced MmGFP-expressing ES cells to exit the cell cycle and differentiate in culture. Indeed, we were able to detect differentiated, non-dividing cells that did not show MmGFP fluorescence (Fig 1 F,G)." Dies muß aber sinngemäß so verstanden werden, daß der cdc2 Promotor geeignet ist, sich vermehrende Zellen und ruhende Zellen voneinander zu unterscheiden. Nur proliferierende Zellen fluoreszieren. Sich nicht mehr teilende Zellen zeigen keine GFP Fluoreszenz. Somit wird von dieser Textpassage eindeutig belegt, daß der cdc2 Promotor über die Expression der GFP Fluoreszenz in der Lage ist, den Entwicklungszustand einer Zelle zu markieren und deshalb ein entwicklungsabhängiger Promotor im Sinne des Anspruchs 1 ist. Daß es sich bei den ES-Zellen der Druckschrift (1) keinesfalls um stabil transfizierte Zellen gemäß der vorliegenden Anmeldung handelt, kann dieser Fundstelle keinesfalls entnommen werden.

Nach alledem ist der dem Hauptantrag zu Grunde liegende Anspruch 1 mangels Neuheit nicht gewährbar.

B. Zum Hilfsantrag

Auch den Zellkulturen mit zelltypspezifischer Expression eines nicht-zellschädigenden fluoreszierenden Proteins gemäß Hilfsantrag, bestehend aus Aggregaten (Embryoid Bodies) embryonaler Stammzellen (ES-Zellen) nicht-menschlicher Säuger, die mit einem DNA-Konstrukt stabil transfiziert sind, wobei das DNA-Konstrukt in die native DNA integriert ist, kann die Patentfähigkeit nicht zuerkannt werden.

Die Zellkulturen mit zelltypspezifischer Expression eines nicht-zellschädigenden fluoreszierenden Proteins gemäß Hilfsantrag, bestehen aus Aggregaten (Embryoid Bodies) embryonaler Stammzellen, wie sie vom Anspruch 1 des Hauptantrags näher definiert werden. Bezüglich der den beanspruchten Zellkulturen zu Grunde liegenden embryonalen Stammzellen ist auf die Argumentation zum Hauptantrag zu verweisen, wo ausgeführt wird, daß diese Zellen in der Entgeghaltung (1) offenbart sind. In der Druckschrift (1) werden aber auch Zellaggregate aus den genetisch veränderten embryonalen Stammzellen hergestellt. Auf Seite 1134, Zeilen 12 bis 14 heißt es: "To induce ES cells to differentiate, cells were aggregated in culture in order to form embryonal bodies". Somit werden auch in Entgeghaltung (1) Aggregate embryonaler Stammzellen (Embryoid Bodies) gebildet. Die beanspruchten Zellkulturen nach dem Hauptanspruch gemäß Hilfsantrag sind daher gegenüber (1) nicht mehr neu.

Der Anmelder macht im wesentlichen geltend, daß gemäß Hilfsantrag Embryoid Bodies, also künstliche Zellverbände mit kugelförmiger Struktur ("Sphäroide"), beansprucht würden, wohingegen Druckschrift (1) blastozystöse Strukturen, nämlich planare Zellkulturen (natürlich wachsend und undefiniert), aus gleichartigen Tumorzellen betreffe. Embryoid Bodies seien im Gegensatz zu den blastozystösen Systemen der Entgeghaltung (1) sehr sensible Zellsysteme, deren Entwicklung aus ES-Zellen mehrere äußerst empfindliche Entwicklungsschritte umfasse. Es sei

überaus überraschend, daß die Bildung von Embryoid Bodies durch die Expression von GFP nicht behindert werde.

Abgesehen davon, daß in (1) Embryoid Bodies explizit genannt werden, ist in diesem Zusammenhang darauf hinzuweisen, daß eine Blastozyste eine definierte Entwicklungsstufe in der Embryogenese mit hoher Ordnung und mehr als 16 Zellen ist. Diese Tatsache ist dem hier zuständigen Fachmann, nämlich einem Molekularbiologen, bestens bekannt. Die Zellen der Blastozyste formen eine kugelförmige Schale, die das Blastocoel (Blastozystenöhle) umschließt, und deren einer Pol durch eine dickere Anhäufung von Zellen (Embryoblast) gekennzeichnet ist. Die äußere Zellschicht ist das Trophoektoderm oder der Trophoblast. Diese Zellen bilden später die ektodermalen und mesodermalen Anteile der Plazenta. Aus der inneren Zellmasse dagegen entsteht der eigentliche Embryo. Damit ist aber auch die Argumentation des Anmelders nicht haltbar, daß die beanspruchten Embryoid Bodies sehr sensible Zellsysteme mit kugelförmiger Struktur seien, deren Entwicklung aus ES-Zellen mehrere äußerst empfindliche Entwicklungsschritte umfasse, wohingegen Druckschrift (1) nur blastozystöse Strukturen, nämlich planare Zellkulturen (natürlich wachsend und undefiniert) aus gleichartigen Tumorzellen betreffe.

Nach alledem ist auch der Gegenstand nach Anspruch 1 gemäß Hilfsantrag nicht mehr neu. Anspruch 1 des Hilfsantrags ist daher mangels Neuheit nicht gewährtbar. Bei dieser Sachlage mußte dem geltend gemachten Vorurteil der Fachwelt nicht weiter nachgegangen werden.

Da über die Anträge des Anmelders nicht teilweise entschieden werden kann, fallen die weiteren Ansprüche mit den nicht gewährbaren Ansprüchen 1 gemäß Haupt- und Hilfsantrag. Die Beschwerde war daher zurückzuweisen.

Moser

Wagner

Harrer

Feuerlein

Pü