



BUNDESPATENTGERICHT

IM NAMEN DES VOLKES

3 Ni 30/19 (EP)

(Aktenzeichen)

URTEIL

Verkündet am
14. September 2021

...

In der Patentnichtigkeitssache

...

betreffend das europäische Patent 1 530 578

(DE 603 43 525)

hat der 3. Senat (Nichtigkeitssenat) des Bundespatentgerichts aufgrund der mündlichen Verhandlung vom 14. September 2021 durch den Vorsitzenden Richter Schramm, den Richter Schwarz, die Richterin Dipl.-Chem. Dr. Münzberg und die Richter Dipl.-Chem. Dr. Jäger und Dipl.-Chem. Dr. Freudenreich

für Recht erkannt:

- I. Die Klage wird abgewiesen.
- II. Die Klägerin trägt die Kosten des Rechtsstreits.
- III. Das Urteil ist gegen Sicherheitsleistung in Höhe von 120 % des zu vollstreckenden Betrages vorläufig vollstreckbar.

Tatbestand

Die Beklagte ist eingetragene Inhaberin des mit Wirkung für das Hoheitsgebiet der Bundesrepublik Deutschland in der englischen Verfahrenssprache erteilten und nach europäischem Einspruchsverfahren wie erteilt aufrechterhaltenen europäischen Patents 1 530 578 (Streitpatent), das am 22. August 2003 unter Inanspruchnahme der Prioritäten einer US-amerikanischen Anmeldung

US 227131 vom 23. August 2002 und zweier britischer Anmeldungen GB 0230037 vom 23. Dezember 2002 und GB 0303924 vom 20. Februar 2003 angemeldet worden ist. Das beim Deutschen Patent- und Markenamt unter dem Aktenzeichen DE 603 43 525.4 geführte Streitpatent trägt die Bezeichnung „MODIFIED NUCLEOTIDES FOR POLYNUCLEOTIDE SEQUENCING“ (in Deutsch laut Streitpatentschrift: „MODIFIZIERTE NUKLEOTIDE FÜR POLYNUKLEOTIDSEQUENCING“) und umfasst 30 Patentansprüche, von denen die Patentansprüche 1, 12, 17, 25, 28, 29 und 30 nebengeordnet und die übrigen Patentansprüche jeweils unmittelbar oder mittelbar auf einen der nebengeordneten Patentansprüche zurückbezogen sind.

Die nebengeordneten Patentansprüche 1, 12, 17, 25, 28, 29 und 30 lauten in der Verfahrenssprache wie folgt:

1. A modified nucleotide molecule comprising a purine or pyrimidine base and a ribose or deoxyribose sugar moiety having a removable 3'-OH blocking group covalently attached thereto, such that the 3' carbon atom has attached a group of the structure -O-Z wherein Z is any of $-C(R')_2-N(R'')_2-C(R')_2-N(H)R''$, and $-C(R')_2-N_3$, wherein each R'' is or is part of a removable protecting group; each R' is independently a hydrogen atom, an alkyl, substituted alkyl, arylalkyl, alkenyl, alkynyl, aryl, heteroaryl, heterocyclic, acyl, cyano, alkoxy, aryloxy, heteroaryloxy or amido group, or a detectable label attached through a linking group; or (R')₂ represents an alkylidene group of formula $=C(R''')_2$ wherein each R''' may be the same or different and is selected from the group comprising hydrogen and halogen atoms and alkyl groups; and wherein said molecule may be reacted to yield an intermediate in which each R'' is exchanged for H, which intermediate dissociates under aqueous conditions to afford a molecule with a free 3'OH.
12. A method of controlling the incorporation of a nucleotide as defined in any one of claims 6 to 10 and complementary to a second nucleotide in a target single-stranded polynucleotide in a synthesis or sequencing reaction comprising incorporating into the growing complementary polynucleotide said nucleotide, the incorporation of said nucleotide preventing or blocking introduction of subsequent nucleoside or nucleotide molecules into said growing complementary polynucleotide.
17. A method for determining the sequence of a target single-stranded polynucleotide, comprising monitoring the sequential incorporation of complementary nucleotides,

wherein at least one incorporation is of a nucleotide as defined in any one of claims 6 to 10 and wherein the identity of the nucleotide incorporated is determined by detecting the label linked to the base, and the blocking group and said label are removed prior to introduction of the next complementary nucleotide.

25. A kit, comprising:
 - (a) a plurality of different nucleotides wherein said plurality of different nucleotides are either as defined in any one of claims 6 to 10; and
 - (b) packaging materials therefor.
28. Use of a nucleotide as defined in any one of claims 1 to 11 in a Sanger or a Sanger-type sequencing method.
29. An oligonucleotide comprising a modified nucleotide of claims 1-11.
30. A nucleotide triphosphate comprising a modified nucleotide of claims 1-11.

In deutscher Sprache haben sie laut Streitpatentschrift folgenden Wortlaut:

1. Modifiziertes Nucleotidmolekül, umfassend eine Purin- oder Pyrimidinbase und eine Ribose- oder Desoxyribose-Zuckereinheit mit einer kovalent daran gebundenen, entfernbaren, 3'-OH-blockierenden Gruppe, so dass an dem 3'-Kohlenstoffatom eine Gruppe der Struktur
-O-Z
gebunden ist, wobei es sich bei Z um eines von $-C(R')_2-N(R'')$, $-C(R')_2-N(H)R''$ und $-C(R')_2-N_3$ handelt, wobei es sich bei jedem R'' um eine entfernbare Schutzgruppe oder einen Teil davon handelt; es sich bei jedem R' unabhängig um ein Wasserstoffatom, eine Alkyl-, substituierte Alkyl-, Arylalkyl-, Alkenyl-, Alkynyl-, Aryl-, Heteroaryl-, heterozyklische, Acyl-, Cyano-, Alkoxy-, Aryloxy-, Heteroaryloxy- oder Amido-Gruppe oder eine durch eine verknüpfende Gruppe gebundene nachweisbare Markierung handelt; oder $(R')_2$ eine Alkyldengruppe der Formel $=C(R''')_2$ darstellt, wobei jeder R''' gleich oder unterschiedlich sein kann und aus der Gruppe ausgewählt ist, umfassend Wasserstoff- und Halogenatome und Alkylgruppen; und wobei das Molekül umgesetzt werden kann, um ein Zwischenprodukt zu ergeben, bei welchem jeder R'' gegen H ausgetauscht ist, wobei dieses Zwischenprodukt unter wässrigen Bedingungen dissoziiert, um ein Molekül mit einem freien 3'-OH zu hervorzubringen.
12. Verfahren zum Kontrollieren des Einbaus eines wie in einem der Ansprüche 6 bis 10 definierten und zu einem zweiten Nucleotid in einem einzelsträngigen Ziel-Polynucleotid komplementären Nucleotids bei einer Synthese oder

Sequenzierreaktion, umfassend das Einbauen des Nucleotids in das wachsende komplementäre Polynucleotid, wobei der Einbau des Nucleotids die Einführung darauffolgender Nucleosid- oder Nucleotidmoleküle in das wachsende komplementäre Polynucleotid verhindert oder blockiert.

17. Verfahren zum Bestimmen der Sequenz eines einzelsträngigen Ziel-Polynucleotids, umfassend das Überwachen des aufeinanderfolgenden Einbaus komplementärer Nucleotide, wobei es sich bei mindestens einem Einbau um den eines wie in einem der Ansprüche 6 bis 10 definierten Nucleotids handelt und wobei die Identität des eingebauten Nucleotids durch Nachweisen der mit der Base verknüpften Markierung bestimmt wird und die blockierende Gruppe und die Markierung vor der Einführung des nächsten komplementären Nucleotids entfernt werden.

25. Kit, umfassend
 - (a) eine Vielzahl unterschiedlicher Nucleotide, wobei es sich bei der Vielzahl unterschiedlicher Nucleotide jeweils um die in einem der Ansprüche 6 bis 10 definierten handelt, und
 - (b) Verpackungsmaterialien dafür.

28. Verwendung eines Nucleotids, wie in einem der Ansprüche 1 bis 11 definiert, bei einem Sanger-Sequenzierverfahren oder einem Sequenzierverfahren der Sanger-Art.

29. Oligonucleotid, umfassend ein modifiziertes Nucleotid nach den Ansprüchen 1 - 11.

30. Nucleotidtriphosphat, umfassend ein modifiziertes Nucleotid nach den Ansprüchen 1 - 11.

Mit ihrer Nichtigkeitsklage begehrt die Klägerin die vollständige Nichtigkeitsklärung des Streitpatents, weil dessen Gegenstand mangels erfinderischer Tätigkeit nicht patentfähig sei. Hierzu hat sie u.a. folgende Druckschriften eingereicht (Nummerierung und Kurzzeichen von der Klägerin):

- | | |
|--------------|--|
| NiK1 | EP 1 530 578 B1 (Streitpatent) |
| NiK7 | METZKER, M.L. et al., Nucleic Acids Research, 1994, 22(20), S. 4259-4267 |
| NiK10 | WO 91/06678 A1 |
| NiK11 | WO 02/29003 A2 |
| NiK12 | US 5 763 594 A |

- NiK15** GOLOLOBOV, Y.G. und KASUKHIN, L.F., Tetrahedron, 1992, 48(8), S. 1353-1406
- NiK16** POLUSHIN, N.N. et al., Tetrahedron Letters, 1996, 37(19), S. 3227-3230
- NiK17** GREENE, T.W. und WUTS, P.G.M. [Hrgs.], Protective Groups in Organic Synthesis, 1999, Third Ed., Wiley, New York, S. iii-xxi, 1-293, 494-503, 578-581, 700-779 – ISBN 0-471-16019-9
- NiK20** CANARD, B. et al., Procedures of Natural Academic Science USA, 1995, 92, S. 10859-10863
- NiK26** ZAVGORODNY, S. et al., Tetrahedron Letters, 1991, 32(51), S. 7593-7596
- NiK27** ZAVGORODNY, S.G. et al., Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, 2000, 19(10-12), S. 1977-1991
- NiK46** OKSMAN, P. et al., Journal of Physical Organic Chemistry, 1992, 5, S. 741-747
- NiK64** OIVANEN, M. et al., Collection of Czechoslovak Chemical Communications, 1990, 55 (Special Issue), S. 17-20
- NiK68** STREITWIESER, A. et al., Organische Chemie, 2. Aufl., 1994, VCH Weinheim, S. 385-386, 400-407, 760-761 – ISBN 3-527-29005-2
- NiK69** CLAYDEN, J.P. et al., Organic Chemistry, Reprint 2001, Oxford University Press, Oxford, S. 437-438 – ISBN 0-19-850346-6

Die Klägerin trägt vor, dass ein Team aus einem Organischen Chemiker, der mit der Nukleotidsynthese befasst sei und über vertiefte Kenntnisse bezüglich Schutzgruppen und deren Abspaltung verfüge, und einem Biochemiker, der Wissen zur Substratakzeptanz der Polymerase beitrage, vor der eigentlichen technischen Aufgabe, 3'-modifizierte Nukleotide mit weiteren Blockiergruppen bereitzustellen, die je nach Einsatzgebiet für das SBS-Verfahren (*sequencing-by-synthesis*), Sanger-ähnliche Sequenzierverfahren oder bloße DNA-Synthese geeignet seien, im Lichte des aufgezeigten Standes der Technik ohne

erfinderisches Zutun zu den Nukleotiden des Streitpatents sowie deren Anwendung gelange.

Was die Anwendung der geschützten Nukleotide im SBS-Verfahren betreffe, ergäben sich aus dem Anforderungskatalog der NiK10 bzw. insbesondere der NiK11 Auswahlkriterien für von den meisten Polymerasen akzeptierte 3'-Schutzgruppen, nämlich eine kleine Blockiergruppe mit ähnlicher Größe wie MOM („Methoxymethyl“) oder Allyl sowie der Ausschluss von Methoxy als Schutzgruppe und von Schutzgruppen mit Elektrophilen wie Ester- oder Ketongruppen. Von NiK11 ausgehend hätte der Fachmann die NiK17 herangezogen, welche sich mit gängigen Schutzgruppen für aliphatische und aromatische Alkohole befasste. Da dieses Kompendium Schutzgruppen für aromatische Alkohole nicht als prinzipiell untauglich für aliphatische Alkohole angebe, die pKs-Werte beider Verbindungsklassen überlappten und ohnehin nur wenige Schutzgruppen das Kriterium der NiK11 erfüllten, wäre er ohne erfinderische Tätigkeit auf die dort angegebene Azidomethyl-Schutzgruppe gestoßen. Zu dem gleichen Ergebnis führe auch die Kombination der NiK11 mit NiK16. Nukleotide würden nach Standardverfahren und auch gemäß NiK11 aus den entsprechenden Nukleosiden gewonnen und fachbekannt zu Polynukleotiden wie DNA und RNA polymerisiert. Daher ziehe der Fachmann Literatur zu ihm als Nukleotid-Vorläufer bekannten 3'-geschützten Nukleosiden wie NiK26/27 heran. Weiter wisse er auch um die antivirale Wirkung 3'-geschützter Nukleoside als *prodrug* und erkenne durch den Hinweis auf *potential antivirals* in NiK26/27 und denselben bekannten Wirkmechanismus den Zusammenhang zwischen 3'-blockierten Nukleosiden und Nukleotiden als Terminatoren der DNA-Synthese. Folglich werde er in nicht erfinderischer Weise ein nach NiK26/27 als tauglich befundenes Nukleosid in die 5'-Phosphat-Verbindung überführen. Auch wenn in NiK26/27 kein Hinweis auf den Einsatz der dort beschriebenen geschützten Nukleoside bei der enzymatischen DNA-Synthese oder Sequenzierverfahren gegeben werde, hätte der Fachmann eine insoweit angemessene Erfolgserwartung gehabt. Denn Allyl, MOM und Azidomethyl seien von vergleichbarer Länge, Flexibilität und sterischer Ausprägung, wonach ihm beim Vergleich mit MOM und Allyl aus NiK11 nur vier in

NiK26/27 gezeigte Schutzgruppen verblieben wären, von denen NiK26 die Azidomethylgruppe als *of special interest* herausstelle. Anders als eine Estergruppe sei die Azidomethylgruppe auch nicht empfindlich für einen nukleophilen Angriff aus dem Zentrum der Polymerase und zudem um mehrere Bindungslängen von diesem entfernt. Schließlich seien auch die in NiK26/27 angegebenen Entschützungsbedingungen gutachtlich mehrerer Druckschriften DNA-kompatibel.

Vor dem Hintergrund des Stoffanspruchs 1 seien hinsichtlich der Eignung 3'-geschützter Nukleotide für nahe liegende Einsatzzwecke unterschiedliche Ausgangspunkte separat zur Prüfung auf erfinderische Tätigkeit heranzuziehen, wobei sich aus dem aufgezeigten Stand der Technik das SBS-Verfahren, die Sanger-Sequenzierung, antivirale Mittel sowie matrizenunabhängige Sequenzierverfahren ergäben. Bei potenziell antiviralen Mitteln belaufe sich die Anzahl der in NiK7, NiK27, NiK46 und NiK64 genannten Verbindungen auf 23 und die 3'-Azidomethylgruppe sei in drei dieser vier Dokumente angegeben, so dass der Fachmann diese besonders beachtet und im Zuge dessen auch das entsprechende Nukleotid hergestellt hätte. Auch für das Sanger-Verfahren hätte er diese Verbindungen im Lichte der NiK7 herangezogen, da NiK7 3'-geschützte Nukleotide sowohl im Sanger-Verfahren teste, als auch einen Bezug zu antiviralen Mitteln herstelle und zur Herstellung weiterer blockierter Nukleotide motiviere. Zwar nenne NiK12 für das matrizenunabhängige Sequenzierverfahren eine große generische Anzahl an Nukleotiden, beschreibe aber in den Beispielen konkret nur eine geringe Zahl und rate von Estern ab, wonach der Fachmann dort genannte Ether, insbesondere den (substituierten) Ethoxyethylether beachte und in Verbindung mit NiK7, NiK27, NiK46 und NiK64 zu einer überschaubaren Anzahl solcher Schutzgruppen gelange, selbst wenn er diejenigen aus NiK12 abziehe oder die aus NiK26 hinzufüge.

Die Klägerin beantragt,

das europäische Patent EP 1 530 578 mit Wirkung für das Hoheitsgebiet der Bundesrepublik Deutschland für nichtig zu erklären.

Die Beklagte beantragt,

die Klage abzuweisen.

Zur Stützung ihres Vorbringens hat die Beklagte u.a. folgende Druckschrift eingereicht:

rop6 CHRISTENSEN, L.F. und BROOM, A.D., Journal of Organic Chemistry, 1972, 37(22), S. 3398-3401

Nach Ansicht der Beklagten ist der Gegenstand des Streitpatents schutzfähig. Denn hinsichtlich der Kombination NiK11 mit NiK17 identifiziere NiK11 keine „kleinen“ Schutzgruppen oder schränke diese strukturell ein, sondern schließe vielmehr Elektrophile als Blockiergruppen für die 3'-OH Position aus, wonach die Lehre der NiK11 „für bare Münze“ zu nehmen sei. Soweit der Fachmann nach Alternativen für die in NiK11 genannten MOM- und Allylgruppen suche, beschränke er sich auf die in NiK17 genannten Schutzgruppen für aliphatische Hydroxylgruppen und ziehe solche für aromatische Hydroxylgruppen nicht in Betracht. Zudem sei die Azidomethylgruppe stark elektrophil, ungeeignet für die beengten sterischen Verhältnisse im Zentrum der Polymerase und werde nach NiK11 nur unter für SBS ungeeigneten Bedingungen mit unzureichenden Ausbeuten reduziert. NiK26/27 würde der Fachmann von NiK11 ausgehend nicht beachten, da sich diese mit Nukleosid-Analoga beschäftigten, die Polymerase-basierten Verfahren nicht zugänglich seien. Auch würden große Mengen an bei DNA denaturierend wirkendem Pyridin zur Entschützung benötigt, und dies bei niedriger Entschützungsrates. Die seitens der Klägerin angeführte Kombination NiK11 und NiK16 scheitere bereits daran, dass NiK16 keine enzymatisch geführte Dimerbildung von Nukleotiden, sondern eine solche mittels organischer Synthese

betreffe und auch keine Azidomethylgruppe offenbare, sondern eine Azidgruppe. Gleichermäßen bildeten NiK26/27 aus fachlicher Sicht keinen Ausgangspunkt für die patentgemäße Lehre, da dort von Nukleotiden keine Rede sei und die Vielzahl der dort beschriebenen Blockiergruppen nur dem Zweck der Herstellung modifizierter Nukleoside diene. Die mit antiviralen Verbindungen befasste NiK46 weise nur einigen der dort behandelten Verbindungen Aussicht auf antivirale Wirksamkeit zu. Das 3'-Azidomethyl-Ribonukleosid erfahre darin jedoch keine besondere Aufmerksamkeit. Nukleotide seien ohnehin als Virus-Inhibitoren ungeeignet, da sie nicht in die Zellen dringen könnten, und eine „in vivo“-Phosphorylierung sei gutachtlich der bekannten wissenschaftlichen Literatur unvorhersehbar. NiK7 rege den Fachmann nicht dazu an, sich der Literatur von antiviral wirkenden Mitteln, wie den bereits diskutierten Nukleosiden der NiK46, zuzuwenden, sondern gebe sieben Arten 3'-modifizierter Verbindungen an, von denen nur drei eine Terminierungsaktivität aufwiesen. Für die Kombination von NiK12 mit NiK17 würden dieselben Überlegungen gelten wie für die Kombination von NiK11 mit NiK17. Schließlich führe auch die Kombination der NiK12 mit NiK26/27 nicht zur Lehre des Streitpatents, da diese Druckschriften in dem unterschiedlichem technischen Kontext der organischen Synthese und der enzymatischen Verfahren angesiedelt seien und somit keine Kombination veranlassten. Auf die in der Sache ähnliche Einschätzung des Europäischen Patentamts bei der vergleichbaren Lehre in EP 3 002 289 werde hingewiesen.

Entscheidungsgründe

Die zulässige Klage ist unbegründet, da der geltend gemachte Nichtigkeitsgrund der mangelnden Patentfähigkeit (Artikel II § 6 Abs. 1 Nr. 1 IntPatÜG i.V.m. Art. 138 Abs. 1 lit. a) und Art. 56 EPÜ nicht besteht.

1. Das Streitpatent (NiK1) betrifft modifizierte Nukleotide, insbesondere solche mit entfernbarer Schutzgruppe an der 3'-Position der (Desoxy)Riboseeinheit des Nukleotids, deren Verwendung bei der Sequenzierung von Polynukleotiden, sowie ein Verfahren zur chemischen Entfernung der Schutzgruppe (NiK1 [0001], [0018]). Zum Prioritätszeitpunkt seien bereits verbesserte Technologien zur Sequenzanalyse von Polynukleotiden (DNA, RNA) bekannt gewesen (NiK1 [0002]), z.B. eine effizientere Handhabung von Polynukleotiden als Matrix hoher Dichte, immobilisiert auf einem festen Träger (NiK1 [0003]). Aufbauend auf dem Sanger-Verfahren (NiK1 [0083]) seien neuere Methoden zur DNA-Sequenzierung wie das *sequencing-by-synthesis* (SBS) Verfahren entwickelt worden (NiK1 [0004]), das nach der im Absatz [0007] des Streitpatents zitierten Quelle NiK7 auch als *Base Addition Sequencing Scheme* (BASS) bezeichnet wird. Nach dem SBS-Verfahren würden Nukleotide in einen neu zu synthetisierenden DNA-Strang eingebaut, wobei das Nukleotid komplementär zum jeweiligen Nukleotid an der entsprechenden Position im zu sequenzierenden DNA-Strang sei. Mittels des Enzyms Polymerase werde die 5'-Position des neu einzubauenden Nukleotids über eine Phosphatgruppe mit der freien 3'-OH-Gruppe des zuletzt eingebauten Nukleotids im bereits synthetisierten Oligonukleotid-Strang verbunden, dadurch kontrolliert, dass nach jedem Nukleotid-Einbau die DNA-Neusynthese zunächst unterbrochen werde, um die zuletzt eingebaute Nukleotid-Base anhand einer spezifischen Markierung, wie einem für die jeweilige Base spezifischen Fluoreszenz-Farbstoff, der über einen spaltbaren Linker mit dem Nukleotid verbunden sei, zu identifizieren. Dann werde der Zyklus fortgesetzt. Die kontrollierte Unterbrechung der Oligonukleotidverlängerung werde durch die an der 3'-Position der (Desoxy)Ribose-Einheit des Nukleotids vorgesehene Schutzgruppe realisiert, die unter geeigneten Bedingungen wieder abspaltbar sei. Somit werde nach Identifizierung der zuletzt eingebauten Nukleotid-Base die 3'-Schutzgruppe wieder abgespalten bzw. „entschützt“ und bei diesem Vorgang auch die Markierung entfernt, indem der bekannte *linker* gespalten werde (NiK1 [0005] i.V.m. [0031-0042], [0090-0091] *cleavable linker*).

2. Die im Streitpatent nicht ausdrücklich formulierte Aufgabenstellung besteht auf der Basis des dargestellten Stands der Technik i.V.m. mit den Stoff- und Erzeugnisansprüchen 1, 25, 29 und 30 sowie deren Einsatzzwecken nach den Ansprüchen 12, 17 und 28 in der Bereitstellung von Nukleotiden mit einer Schutzgruppe für die 3'-OH-Gruppe, welche für Sequenzierungsverfahren und insbesondere für das SBS-Verfahren geeignet sind. Soweit mit Patentanspruch 28 Sanger-Sequenzierverfahren oder Sequenzierverfahren der Sanger-Art beansprucht sind, ist bei diesen keine Abspaltung der Schutzgruppe notwendig. Ähnliches gilt für das sich aus Patentanspruch 12 herleitende, im Zusammenhang mit der Sequenzierung als gleichrangig beanspruchte Syntheseverfahren. Hinsichtlich der Schutzgruppen könne es sich auch um vorbekannte Schutzgruppen handeln, die bei der DNA-Sequenzierung noch nicht zur Anwendung gekommen seien (NiK1 [0013]), wonach das Streitpatent eine Suche nach bisher nicht genutzten Schutzgruppen nicht zur Aufgabe macht; hinsichtlich geeigneter Polymerasen für die enzymatische Verlängerung des DNA-Oligomers verweist das Streitpatent auf bekannte, einschließlich gentechnisch modifizierte Enzyme (NiK1 [0106]).

Entgegen der Auffassung der Klägerin, die eine weiter gefasste Aufgabe als objektiv angezeigt erachtet, nämlich die Bereitstellung von 3'-modifizierten Nukleotiden mit weiteren Blockiergruppen, die je nach Einsatzgebiet für SBS, Sanger-ähnliche Sequenzierverfahren oder bloße DNA-Synthese geeignet seien, lässt der Umstand, dass die Schutzgruppen bei einigen der beanspruchten Einsatzzwecke nicht zwingend entfernt zu werden brauchen, nicht den Schluss zu, dass sich die streitpatentgemäße Aufgabe auf jede beliebige Schutzgruppe erstreckt, und damit auch auf solche, die die vorgesehene Eigenschaft einer Abspaltung ohne DNA-Schädigung nicht zu erfüllen vermögen.

3. Mit der streitpatentgemäßen Aufgabenstellung ist ein Team befasst, dem sowohl ein Chemiker mit Studienschwerpunkt Organische Chemie und Hochschulabschluss angehört, der einige Jahre Praxis in der chemischen Industrie besitzt, als auch ein Chemiker mit Studienschwerpunkt Biochemie und

Hochschulabschluss, welcher über praktische Erfahrung mit klassischen und neueren DNA-Sequenzier- und Syntheseverfahren verfügt und an welchen sich der Organische Chemiker zu Fragen der Hydrolysebedingungen und der Eignung von Schutzgruppen bei der Oligo- und Polynukleotidsequenzierung und –synthese wendet.

4. Die Aufgabe wird nach Streitpatent gelöst durch die Bereitstellung von Nukleotiden mit speziellen Schutzgruppen für die 3'-Position der Riboseeinheit gemäß der in Patentanspruch 1 angegebenen und nachfolgend gegliederten generischen Struktur (die Konkordanz zu den Gliederungspunkten der Parteien findet sich in eckigen Klammern und grau in der ersten Spalte):

Merkmal	Englisch	Deutsch
1 [1-1.2]	A modified nucleotide molecule comprising a purine or pyrimidine base and a ribose or deoxyribose sugar moiety having	Modifiziertes Nukleotidmolekül umfassend eine Purin- oder Pyrimidinbase und eine Ribose- oder Desoxyribose-Zuckereinheit, mit einer
2 [1.3-1.3.1]	a removable 3'-OH blocking group covalently attached thereto, such that the 3' carbon atom has attached a group of the structure -O-Z	kovalent daran gebundenen, entfernbaren, 3'-OH-blockierenden Gruppe, so dass an dem 3'-Kohlenstoffatom eine Gruppe der Struktur -O-Z gebunden ist,
2.1 [1.3.2]	wherein Z is any of -C(R') ₂ -N(R'') ₂ , -C(R') ₂ -N(H)R'', -C(R') ₂ -N ₃	wobei es sich bei Z um eines von -C(R') ₂ -N(R'') ₂ , -C(R') ₂ -N(H)R'', -C(R') ₂ -N ₃ handelt,
2.1a [1.3.3]	wherein each R'' is or is part of a removable protecting group;	wobei es sich bei jedem R'' um eine entfernbare Schutzgruppe oder einen Teil davon handelt;
2.1b [1.3.5]	wherein said molecule may be reacted to yield an intermediate in which each R'' is exchanged for H,	wobei das Molekül umgesetzt werden kann, um ein Zwischenprodukt zu ergeben, bei welchem jeder R'' gegen H ausgetauscht ist,
2.1c [1.3.5.1]	which intermediate dissociates under aqueous conditions to afford a molecule with a free 3'OH	wobei dieses Zwischenprodukt unter wässrigen Bedingungen dissoziiert, um ein Molekül mit einem freien 3'-OH hervorzu- bringen.

<p>2.1d [1.3.4] [1.3.4b]</p>	<p>(wherein) each R' is independently a hydrogen atom, an alkyl, substituted alkyl, arylalkyl, alkenyl, alkynyl, aryl, heteroaryl, heterocyclic, acyl, cyano, alkoxy, aryloxy, heteroaryloxy, or amido group, or a detectable label attached through a linking group; or (R')₂ represents an alkylidene group of formula =C(R''')₂ wherein R''' may be the same or different and is selected from the group comprising hydrogen and halogen atoms and alkyl groups.</p>	<p>(wobei) es sich bei jedem R' unabhängig um ein Wasserstoffatom, eine Alkyl-, substituierte Alkyl-, Arylalkyl-, Alkenyl-, Alkynyl-, Aryl-, Heteroaryl-, heterozyklische, Acyl-, Cyano-, Alkoxy-, Aryloxy-, Heteroaryloxy- oder Amido-Gruppe oder eine durch eine verknüpfende Gruppe gebundene nachweisbare Markierung handelt; oder (R')₂ eine Alkylidengruppe der Formel =C(R''')₂ darstellt, wobei jeder R''' gleich oder unterschiedlich sein kann und aus der Gruppe ausgewählt ist, umfassend Wasserstoff- und Halogenatome und Alkylgruppen.</p>
---	---	---

Die Diskussion der Parteien beschränkt sich ausschließlich auf Nukleotide mit einer 3'-Azidomethoxygruppe bzw. einer 3'-Azidomethylgruppe als Schutzgruppe für die 3'-OH-Funktion (Merkmale **2**, **2.1** und **2.1d**, Z = -C(R')₂-N₃ mit R' = H).

Die zueinander in Nebenordnung stehenden Patentansprüche 12, 17, 25 und 28 bis 30 bleiben ungegliedert. Im Einzelnen ist von diesen Patentanspruch 12 auf Verfahren zum kontrollierten Einbau eines nach Patentanspruch 6 bis 10 markierten, zu einem zweiten Nukleotid in diesem einzelsträngigen Ziel-Polynukleotid komplementären Nukleotids bei einer Synthese- oder Sequenzierreaktion gerichtet, wobei der Einbau den darauffolgenden Einbau (komplementärer) Nukleosid- oder Nukleotidmoleküle verhindert oder blockiert, während Patentanspruch 17 ein Verfahren zur Sequenzbestimmung eines einzelsträngigen Ziel-Polynukleotids durch Überwachung des Einbaus aufeinanderfolgender nach Patentanspruch 6 bis 10 markierter Nukleotide betrifft, bei welchem die Identität des Nukleotids anhand der Markierung bestimmt wird und blockierende Gruppe und Markierung vor Einführung des nächsten Nukleotids entfernt werden. Die Patentansprüche 25, 29 und 30 sind auf ein Kit mit nach den Patentansprüchen 6 bis 10 markierten Nukleotiden und Verpackungsmaterialien dafür gerichtet, sowie auf Oligonukleotide und Nukleotidtriphosphate mit einem

modifizierten Nukleotid nach den Patentansprüchen 1 bis 11; Patentanspruch 28 beansprucht die Verwendung eines modifizierten Nukleotids nach den Patentansprüchen 1 bis 11 in Sanger- oder in Sanger-ähnlichen Sequenzierverfahren.

5. Einige Merkmale der zulässig erteilten und insoweit nicht angegriffenen Patentansprüche bedürfen näherer Betrachtung.

5.1 Den Kern der Erfindung bilden Nukleotide mit der Gruppe -O-Z, die im Teil Z u.a. eine $C(R')_2$ -Gruppe (**2.1**) mit weitgehend beliebigen Resten R' (**2.1d**) beinhaltet. Weitere Unterschiede in der -O-Z-Gruppe entstehen durch die an die $C(R')_2$ -Gruppe gebundenen $N(R'')_2$ -, $N(H)R''$ - und N_3 -Gruppen (**2.1**). Nach dem Anspruchswortlaut beziehen sich die Merkmale **2.1a-c** nur auf solche Gruppen mit einem nach Merkmal **2.1a** gleichermaßen als Schutzgruppe bezeichneten R'' -Rest.

Allerdings stellt Absatz [0117] mit dem darüber gesetzten Titel im Streitpatent klar, dass auch die Azidomethylgruppe die geschützte Form eines unter wässrigen Bedingungen dissoziierenden Hemiaminals als Zwischenprodukt darstellt (*3'-OH protected with an azidomethyl group as a protected form of a hemiaminal*), ebenso wie die anderen geschützten Gruppen $-C(R')_2-N(R'')_2$ (NiK1 Fig. 3). Daher kann auch der an der fachlichen Lehre der NiK1 vorbeigehenden Einwand der Klägerin, dass die Merkmale **2.1a**, **2.1b** und **2.1c** vom Azidomethylrest nicht erfüllt würden und dieses insoweit fakultativ keinen festen Bestandteil der technischen Lehre bilde, nicht überzeugen.

5.2 Bei den beanspruchten unterschiedlichen Arten der Markierung nach Merkmal **2.1d** kann es sich um eine durch eine verknüpfende Gruppe gebundene nachweisbare und ggf. spaltbare Markierung als Rest R' handeln (NiK1 Patentansprüche 1, 8). Zudem kann die Base nach Merkmal **1** über einen ggf. spaltbaren Linker mit einer nachweisbaren Markierung verknüpft sein (NiK1 Patentansprüche 1, 6). Insoweit erfolgt der Einsatz der Nukleotide im Sanger-

Sequenzierverfahren oder Sequenzierverfahren der Sanger-Art wahlweise markiert oder unmarkiert (NiK1 Patentanspruch 28), während die Patentansprüche 12, 17 und 25 nach NiK1, welche auf ein Kit, einen kontrollierten Nukleotideinbau und ein Verfahren zur Bestimmung der Nukleotidsequenz gerichtet sind, zwingend über die Base markierte Nukleotide fordern. Patentanspruch 12 beansprucht die kontrollierten Synthese- und Sequenzierreaktionen als gleichrangig und betrifft daher auch reine DNA-Syntheseverfahren, bei denen die Sequenz des entstehenden Polynukleotids komplementär zur Sequenz eines „einzelsträngigen Ziel-Polynukleotids“ ist.

II.

Entgegen der Ansicht der Klägerin erweisen sich die Gegenstände aller nebengeordneten Patentansprüche des Streitpatents, getragen durch den Stoffanspruch 1, als durch den Stand der Technik nicht nahegelegt.

Auch wenn sich dem Streitpatent keine besonderen Vorteile der Azidomethylgruppe gegenüber anderen, bekannten Nukleotid-Schutzgruppen entnehmen lassen, ist es nicht auf die Herstellung der erfindungsgemäßen Nukleotide und deren Bereitstellung als Stoffe „per se“ gerichtet, sondern stellt diese in einen Rahmen hinsichtlich ihrer Eignung bei der DNA-Sequenzierung durch DNA-Synthese (NiK1 [0004]), insbesondere stellt das Streitpatent darauf ab, dass diese unter DNA-kompatiblen Bedingungen entfernt werden können (NiK1 [0011] und [0013]). Dass für die erfindungsgemäßen Verbindungen auch andere Einsatzmöglichkeiten beansprucht sind, verändert ihr Eigenschaftsprofil insoweit nicht.

Dass der Fachmann vor dem Hintergrund geläufiger Schutzgruppen und schonender Möglichkeiten zu deren Entfernung veranlasst sein konnte, nach weiteren Schutzgruppen für das SBS-Verfahren und andere Sequenzier- bzw.

Syntheseverfahren zu suchen, ist seinem allgemeinen Bestreben, bestehende Technologien zu verbessern, zuzurechnen und wird daher unterstellt.

1. Hinsichtlich des Einsatzes der erfindungsgemäßen Nukleotide im SBS-Verfahren macht die Klägerin im Wesentlichen fehlende erfinderische Tätigkeit gegenüber den Kombinationen NiK11 mit NiK26/27, NiK11 mit NK17 und NiK11 mit NiK16 geltend. In der mündlichen Verhandlung hat sie hierbei im Schwerpunkt auf die Kombination von NiK11 mit NiK26/27 abgestellt.

1.1 Die Lehre der NiK11 befasst sich im Rahmen des SBS-Verfahrens mit bei einzelnen bekannten Schutzgruppen auftretenden Nachteilen und benennt entsprechende Lösungen. Geeignete Schutzgruppen würden dabei durch zwei Kriterien bestimmt; zum einen, dass die Schutzgruppe vom Enzym akzeptiert wird, und zum anderen, dass eine milde Entschützung in einer nicht die DNA-schädigenden Weise gelingt. So sei das SBS-Verfahren nur mäßig erfolgreich gewesen, wenn in 3'-Position der Ribose sterisch anspruchsvolle Schutzgruppen vorgelegen hätten, ein Nachteil, dem durch gentechnisch veränderte Polymerase begegnet werden könne (NiK11 S. 4 Z. 15-31). Für den Einsatz üblicher Polymerasen empfiehlt NiK11 die Bindung der Markierung an die Base (NiK11 S. 5 Z. 5-19) und „kleine“ leicht abspaltbare Gruppen zum Schutz der 3'-OH-Gruppe (NiK11 S. 5 Z. 26-29). Dem Größenbereich „klein“ zugeordnet werden die Gruppen Methyl, MOM (Methoxymethyl) und Allyl (NiK11 S. 5 Z. 29 - S. 6 Z. 6 und 14-17; S. 20 Z. 21-24), von denen die 3'-Methoxygruppe wegen der im Vergleich zu Allyl oder MOM drastischen und wasserfreien Spaltungsbedingungen als für SBS ungeeignet ausgewiesen wird (NiK11 S. 6 Z. 2-6). Ausdrücklich rät NiK11 vom Einsatz elektrophiler Schutzgruppen wie Estern und Ketonen ab, da diese durch starke Nukleophile im aktiven Zentrum der Polymerase nahe der 3'-Substituenten gespalten würden (NiK11 S. 6 Z. 6-14). Unter Nukleophilen werden gemeinhin Anionen bzw. anionische Gruppen oder neutrale Moleküle mit „freien“ Elektronenpaaren verstanden. Schutzgruppen nach den Merkmalen 2.1 sind in NiK11 nicht angesprochen. Aus fachlicher Sicht vermittelt die der NiK11 zu entnehmende Angabe, dass für das SBS-Verfahren geeignete Nukleotid-Analoga

strukturell und funktional den natürlichen Nukleotiden ähnlich genug sein müssten, auch zusammen mit den dort nur als Beispiele für „kleine“ leicht abspaltbare Gruppen genannten Gruppen MOM und Allyl kein stringentes Auswahlkriterium (NiK11 S. 20 Z. 1-4 und 21-24). Gleichwohl erschließt sich ein auf die Gruppen MOM und Allyl gerichteter Fokus als mögliche Vorauswahl, bei welcher der Fachmann jedoch ohne weiteres erkennt, dass es sich bei diesen Etherschutzgruppen um wenig polare Alkenyl- oder Alkoxyalkyl-Schutzgruppen handelt und dass diese unsubstituierten Ether nukleophilen Angriffen eher nicht zugänglich sind.

Da NiK11 Schutzgruppentypen mit Elektrophilen wie Estern oder Ketonen als für SBS ungeeignet ausweist (NiK11 S. 6 Z. 11 *not suitable*), ergibt sich von dieser Erkenntnisquelle ausgehend keine fachlich begründete Veranlassung, Schutzgruppentypen mit Elektrophilen aufzugreifen und aufgabengemäß einzusetzen.

Entgegen dem Vortrag der Klägerin war der Fachmann auch nicht veranlasst, das Auftreten von „starken Nukleophilen“ im aktiven Zentrum der Polymerase in Zweifel zu ziehen oder im Einzelnen zu untersuchen. Hierzu hat die Klägerin ausgeführt, dass der Fachmann unter Berücksichtigung dieses Hinweises in NiK11 überlegt hätte, welche Gruppierungen als Nukleophile überhaupt in Frage kommen könnten. Da Polymerase nicht nukleophile Metallionen wie Magnesium enthalte, kämen als Nukleophile nur Gruppierungen auf den Seitenketten der Aminosäuren in Betracht, die in die Nähe der 3'-OH-Schutzgruppe des Nukleotids gelangen könnten. Dies beschränke die Auswahl an möglichen nukleophilen Gruppen auf wenige konkrete Beispiele, wie die Aminogruppe bzw. Guanidinogruppe aus der Seitenkette von Lysin oder Arginin, oder die Carboxylgruppe von Aminosäuren wie Asparaginsäure oder Glutaminsäure. Ein Chemiestudent wisse, dass eine Keton-Gruppierung von einer Amino- oder Carboxylgruppe nukleophil angegriffen werden könne, so dass der Fachmann Schutzgruppen mit Elektrophilen, bei denen aufgrund allgemeinen Fachwissens kein nukleophiler Angriff durch die genannten Carboxyl- oder Aminofunktionen in

den Seitenketten der Polymerase zu befürchten stand, als Kandidaten für die SBS berücksichtigt hätte.

Zwar kann den Ausführungen der Klägerin dahingehend gefolgt werden, dass dem in Figur 1 der NiK11 gezeigten Teilausschnitt des aktiven Zentrums einer bestimmten Polymerase zufolge (NiK11 S. 13 Beschreibung zu Fig. 1) die Carboxylatreste von Asparaginsäuren (Bz. 190, 192 und 256) nahe eines Magnesiumatoms liegen. Ebenso ist ihr beizupflichten, dass Metallkationen wie Mg^{2+} nicht nukleophil zu reagieren vermögen. Zur Rolle von Aminogruppen als mögliche „starke Nukleophile“ trifft NiK11 hingegen keine Aussage.

Carboxylatanionen sind jedenfalls nicht nukleophil genug, um Ester oder Ketongruppen anzugreifen. Denn Carboxylate stellen selbst ein weitgehend reaktionsträges Produkt der alkalischen Hydrolyse von Estern dar. Gegen den nicht weiter belegten Vortrag der Klägerin in der mündlichen Verhandlung, eine Ketongruppe werde von einer Carboxylatgruppe nukleophil angegriffen, weil Carboxylate die Umesterung katalysierten, spricht schon das allgemeine Grundwissen des organischen Chemikers im fachmännischen Team, dass eine Umesterung entweder im sauren Medium erfolgt, in dem keine Carboxylate, sondern wenig nukleophile Carbonsäuren vorliegen, oder im stark alkalischen Medium, in dem Alkoholate, nicht aber Carboxylate diese Reaktion ermöglichen.

Damit führen die der NiK11 zu entnehmenden Angaben zur Struktur des Polymerasezentrums lediglich zu dem Schluss, dass die „starken Nukleophile“ durch dort nicht näher spezifizierte Mechanismen gebildet werden und jedenfalls eine Spaltung von Estern bewirken. Eine andere Bewertung ist auch nicht dadurch veranlasst, dass NiK11, wie die Klägerin anmerkt, auf NiK20 verweist (NiK11 S. 6 Z. 10). Die NiK20 befasst sich zwar mit der nukleophilen Wirkung von Asparaginsäuren im aktiven Zentrum der Polymerase, allerdings ohne zu endgültigen Ergebnissen zu kommen (NiK20 S. 10859 li. Sp. 1e. Abs. – re. Sp. Satzende), und lässt – ebenso wie NiK11 – die Art der „starken Nukleophile“ offen (NiK20, S. 10863 li. Sp. Abs. 2 ab Z. 10).

1.2 Auch wenn der Fachmann aufgrund seines von der Klägerin durch mehrere Druckschriften gutachtlich belegten Wissens um die Ähnlichkeit von Nucleosiden und Nucleotiden für den Einsatz bei Sequenzierverfahren und der auch im Streitpatent verwirklichten gängigen Synthese von Nucleotiden aus Nucleosiden (NiK1 [0143] und [0144]) die in den Druckschriften NiK26/27 angegebenen Nucleosidschutzgruppen für das SBS-Verfahren in Betracht gezogen hätte, führt ihn die Zusammenschau dieser Druckschriften ebenfalls nicht auf den erfindungsgemäßen Weg.

Beide wissenschaftlichen Artikel NiK26/27 stehen in Beziehung zueinander, da NiK27 auf die Lehre der NiK26 Bezug nimmt und daran anknüpft (NiK27, Lit.-Ref. Nr. 5). NiK26 zeigt ein einziges Reaktionsschema mit 21 möglichen Schutzgruppen (NiK26 S. 7594 Reste X) und weiteren Schutzgruppen bei den dort gezeigten Ausgangsverbindungen 1 bis 3. Ausgehend von NiK11 hatte der Fachmann, wie ausgeführt, keinen Anlass aus diesem Kollektiv gerade eine Blockiergruppe mit Elektrophilen auszuwählen. Insoweit kommt es, wie die Beklagte zutreffend einwendet, auf weitere Erwägungen, die über das hinausgingen, was der Fachmann routinemäßig leiste, nicht an.

Werden gleichwohl die Ausführungen der Klägerin zur unterschiedlichen Reaktivität von Elektrophil-Nucleophil-Paaren zum Gegenstand der Betrachtung gemacht, kann die Reaktivität solcher Paare dann abgeschätzt werden, wenn beide Reaktionspartner unter ähnlichen Reaktionsbedingungen verglichen werden.

Insoweit entnimmt der Fachmann NiK26/NiK27 die Lehre der Entfernung einer Azidomethylgruppe als eine von dort zumindest 21 verschiedenen beschriebenen Schutzgruppen für Nucleoside unter milden Bedingungen (NiK26 S. 7595 1e. Satz; NiK27 S. 1980 Abs. unter *SCHEME 2*) und erkennt, dass die Umsetzung mit Triphenylphosphin in wässrigem Pyridin durchgeführt wird und damit in einem protischen Lösungsmittel, mittels der ihm bekannten Staudinger-Reaktion. Bei

dieser Reaktion erfolgt ein initialer nukleophiler Angriff des Triphenylphosphins an der elektrophilen Azidomethylgruppe, analog zum initialen nukleophilen Angriff des Triphenylphosphins an der elektrophilen Ketongruppe bei der Wittig-Reaktion (NiK69 S. 438 ab etwa Seitenmitte), die fachbekannt auch in protischen Lösungsmitteln durchgeführt werden kann, wenngleich aprotische Lösungsmittel bevorzugt sind. Folglich sind sowohl die Azidgruppe als auch die Ketongruppe, von der in NiK11 abgeraten wird, einem Angriff durch dasselbe Nukleophil Triphenylphosphin zugänglich. Das Lehrbuch NiK68 führt ergänzend aus, dass eine Estergruppe wie Ethoxycarbonyl von Triphenylphosphin in der Staudinger-Reaktion nicht angegriffen wird (NiK68 S. 760 le. Abs. - S. 761, nach Informations-Kasten Staudinger-Reaktion), was zum Ergebnis führt, dass die Keton- und Azidgruppe durch das Nukleophil Triphenylphosphin angegriffen werden, eine Estergruppe jedoch nicht. Diese wird vielmehr durch die „starken“ Nukleophile im Polymerase-Zentrum nach NiK11 nukleophil gespalten, welche somit stärker nukleophil wirken als Triphenylphosphin.

Gegen die hierzu vorgebrachten Argumente der Klägerin, dass Triphenylphosphin bei der Staudinger- und der Wittig-Reaktion auch reduzierend wirke, dass diese Verbindung in der Polymerase nicht vorhanden sei und dass die Entschützung in einem anderen Medium ablaufe als die Enzymreaktion, spricht bereits, dass Folgereaktionen und tatsächlich in der Polymerase wirkende Nukleophile bei einer cursorischen Reaktivitätsbetrachtung von funktionellen Gruppen unbeachtlich sind. Selbst die Klägerin bestreitet nicht, dass, sofern der Fachmann Elektrophile ohne Carbonylfunktion in Betracht gezogen hätte, er nur solche darunter fassen würde, die zumindest eine ähnliche elektrophile Reaktivität wie die Carbonylfunktion innerhalb einer Keto- oder Estergruppe aufweisen. Dies ist gegenüber dem Nukleophil Triphenylphosphin zweifelsfrei erfüllt.

Nicht zuletzt hätte er auch von den in NiK26/27 genannten Bedingungen zur Entschützung schon deswegen Abstand genommen, weil er mit stöchiometrisch einzusetzendem und schwer abtrennbarem Triphenylphosphin und toxikologisch bedenklichem Pyridin als Lösungsmittel hätte arbeiten müssen, und dies

angesichts eines Standes der Technik, der kostengünstige katalytische Verfahren und einfach zu handhabende Reagenzien für die Entfernung von 3'-Schutzgruppen bereit hält. Die zwischen den Parteien insoweit diskutierten Fragen, ob die „milde Entschützung“ der NiK26/27 nur auf den Zusammenhang mit Synthons in der organischen Synthese abstellt oder ob Pyridin in höheren Konzentration denaturierend oder gar zerstörend auf DNA wirkt und schon deswegen keinen diesbezüglichen Einsatz anregen kann, können somit unbeantwortet bleiben.

Zieht der Fachmann auf der Suche nach Alternativen zu den in NiK11 genannten Schutzgruppen das Kompendium NiK17 heran, um einen Überblick über Schutzgruppen für die 3'-OH-Position der (Desoxy)Ribose in Nukleosiden/Nukleotiden zu bekommen, führt dieses geeignete Schutzgruppen für aliphatische und aromatische Alkohole jeweils separat auf, wobei die „Leitstrukturen“ Allyl und MOM als für beide Arten von Hydroxylgruppen geeignet angegeben sind (NiK17 S. 27-33 und 67-74; S. 257-259 und 262-264). Die Azidomethylschutzgruppe ist in NiK17 dagegen ausschließlich als Schutzgruppe für aromatische Alkohole genannt (NiK17 S. 260). Somit wird der Fachmann von NiK11 ausgehend lediglich dann auf diese Schutzgruppe stoßen, wenn er dort genannte Schutzgruppen sowohl für aromatische als auch für aliphatische Hydroxylgruppen als gleichermaßen geeignet in Betracht zieht. Ein Anlass hierfür ist allerdings nicht ersichtlich. Denn NiK17 gibt zwar an, dass viele Schutzgruppen für alkoholische Hydroxylgruppen und für aromatische Hydroxylgruppen tauglich sein können (NiK17 S. 248 Mitte 3. Satz), es findet sich jedoch kein entsprechender umgekehrter Hinweis. Da die Azidomethylgruppe allein als Aryloxyschutzgruppe ausgewiesen wird, während viele andere Schutzgruppen als für beide Arten Hydroxylgruppen geeignet aufgelistet sind, vermögen Spekulationen der Klägerin über die Gründe dieser separaten Darstellung oder ihre Einlassung, dass diese Schutzgruppen für Arylalkohole „nicht als prinzipiell untauglich“ anzusehen seien, nichts am Fehlen eines Hinweises in NiK17 auf die Azidomethylschutzgruppe bei aliphatischen Hydroxylgruppen zu ändern.

Wie schon bei der Kombination von NiK11 mit NiK26/27 angesprochen, stellt der Azidteil der Azidomethylgruppe eine elektrophile Gruppe dar, was auch in NiK17 dadurch untermauert wird, dass er dem Angriff von ausschließlich als Nukleophil wirkenden Hydriden in Form von Lithiumaluminiumhydrid zugänglich ist (NiK17 S. 260 Z. 7). Somit hat der Fachmann im Lichte der Informationen aus NiK11 beim Einsatz dieser Schutzgruppe gleichermaßen einen Angriff durch die im Zentrum der Polymerase befindlichen Nukleophile zu befürchten. Weiter erfolgt die Entschützung der Azidomethylgruppe den Angaben der NiK17 zufolge entweder mit dem genannten Lithiumaluminiumhydrid unter wasserfreien Bedingungen und damit unter Bedingungen, von denen die NiK11 explizit abrät (NiK11 S. 6 Z. 2-10), oder durch katalytische Hydrogenolyse mit Palladium auf Kohlenstoff, die nach den Angaben aus der Literatur zu einer Reduktion der Pyrimidinbasen führt (rop6 S. 3400 spaltenübergr. Abs.). Darüberhinaus ist eine mit einem geträgerten Katalysator durchzuführende Hydrogenolyse bei gleichzeitiger Trägerung der Polynukleotide nicht möglich, da die Reaktanten nicht in Kontakt kommen und sich nur mit erheblichem Aufwand voneinander trennen lassen; bei einem alternativem Einsatz nicht geträgerter Polynukleotide wird deren Reinigung ebenfalls unnötig verkompliziert.

Der Behauptung der Klägerin, dass die Azidomethylgruppe anders als eine Estergruppe nicht empfindlich für einen nukleophilen Angriff aus dem Zentrum der Polymerase und ohnehin um mehrere Bindungslängen von diesem entfernt sei, fehlt nach den obigen Ausführungen jede Untermauerung aus dem Stand der Technik. An keiner Stelle findet sich ein röntgenographischer Nachweis zur räumlichen Struktur des aktiven Polymerase-Zentrums mit Anordnung von geschützten Nukleotiden darin. Ihr Einwand, dass es nach der bereits oben diskutierten NiK20 auf die Position und den Abstand des elektrophilen Atoms von der Ribose-Zuckereinheit ankomme, um für einen nukleophilen Angriff von Gruppierungen im katalytischen Zentrum der Polymerase überhaupt empfänglich zu sein (NiK20 S. 10863 li. Sp. 7.-5.-le. Z.), scheidet bereits daran, dass die Zwischenstufe der Staudinger-Reaktion und damit der Angriff des Triphenylphosphins an der Azidomethylgruppe nicht aufgeklärt sind. Unter

Berücksichtigung der Information aus NiK11, dass das aktive Zentrum der Polymerase räumlich beengt ist (NiK11 S. 4 Z. 31 - S. 5 Z. 3, S. 13 Z. 8-11 *very crowded*), ist schließlich auch zu bedenken, dass die Azidomethylgruppe wegen des stäbchenförmigen und von der Klägerin als „starr“ bezeichneten Azidteils länger und sperriger ist als die MOM- und Allyl-Gruppe. Wesentlich und nicht zu vernachlässigen ist dabei die hohe Polarität der Azidgruppe im Vergleich zu den Leitstrukturen der MOM- und Allyl-Gruppe, die sich fraglos auf die Anordnung der Substituenten im Zentrum der Polymerase auswirkt (NiK11 Fig. 1 mit Ausrichtung der polaren Carboxylat- und Phosphatgruppen zum Mg^{2+} -Atom hin).

Aus den genannten Gründen vermag die Kombination der durch NiK11 vermittelten Lehre mit entweder NiK26/27 oder NiK17 keine Anregung dahingehend zu vermitteln, die Azidomethylgruppe als nachgewiesen elektrophile Schutzgruppe aus den umfangreichen Kollektiven der dort gezeigten Schutzgruppen auszuwählen. Auf die nach den in NiK17 oder NiK26/27 angeführten Methoden erzielbaren Ausbeuten bei der Reduktion der Azidomethylgruppe kommt es somit nicht an.

1.3 Keine andere Bewertung ergibt sich für die Kombination der Lehren von NiK11 mit NiK16, die auf die Staudinger-Reaktion bei einem durch organische Synthese gewonnenen Dinukleotid mit direkt gebundener Azidgruppe gerichtet ist.

Weder sitzt die Azidgruppe in der 3'-Position der Desoxyribose, sondern in deren 2'-Position, noch gelangt man durch deren Reduktion zu einer 3'-Hydroxyverbindung, sondern zu einer 3'-Aminoverbindung, also nicht einmal zu einer nach NiK11 zu schützenden 3'-OH-Gruppe (NiK16 S. 3228 Reaktionsschema). Für ein Verständnis in Richtung Polynukleotidsynthese mittels SBS-Verfahren oder in Richtung der 3'-Azidomethylschutzgruppe an der 3'-OH-Gruppe fehlt dieser Kombination jedweder Anhaltspunkt.

1.4 Die von der Klägerin im Zusammenhang mit der Druckschrift NiK11 als möglicher Ausgangspunkt begleitend diskutierte NiK10 beschreibt ebenfalls 3'-

geschützte Nukleotide für das SBS-Verfahren. Allerdings ist dort eine Vielzahl potentiell geeigneter Blockiergruppen wie Ester, Ether, Phosphat, Carbonat (NiK10 S. 21 Z. 20-26) genannt, neben speziellen selektiv chemisch zu entschützenden Blockiergruppen wie 2,4-Dinitrobenzolsulfonyl (NiK10, S. 21 Z. 27 und Bsp. 5), Allyl- und Tetrahydrothiofuranyl (NiK10 S. 21 Z. 27, S. 24 Z. 29 - S. 25 Z. 3) oder solchen Gruppen, die photochemisch oder enzymatisch gespalten werden (NiK10 S. 25 Z. 4-25 und Bsp. 6). Außer der im Beispiel behandelten 2,4-Dinitrobenzolsulfonylgruppe wird keine der dort genannten Blockiergruppen in besonderem Maße herausgestellt, wonach NiK10 als möglicher Ausgangspunkt in der Offenbarung nicht über NiK11 hinausgeht. Ein Hinweis für den Fachmann auf geeignete Blockiergruppen in Richtung der Lehre des Streitpatents geht aus NiK10 ohnehin nicht hervor.

2. Mit Blick auf weitere Einsatzzwecke streitpatentgemäßer Nukleotide außerhalb des SBS-Verfahrens zieht die Klägerin deren Verwendung als antivirale Mittel, bei der Sanger-Sequenzierung oder bei matrizenunabhängigen Sequenzierverfahren in Betracht und sieht damit eine ihrer Auffassung nach ebenfalls überschaubare Anzahl geschützter Nukleoside/Nukleotide in den mit diesen Anwendungen befassten Druckschriften NiK7, NiK12, NiK27, NiK46 und NiK64 als nahe liegend an.

Auch ihre insoweit getätigten Ausführungen können die erfinderische Tätigkeit bei den Gegenständen des Streitpatents nicht in Frage stellen.

2.1 Zugunsten der Klägerin kann angenommen werden, dass dem Fachmann die Anwendung von 3'-substituierten Nukleotiden/Nukleosiden als antivirale Wirkstoffe, ein Anwendungsbereich, der im Streitpatent an keiner Stelle angesprochen ist, aufgrund seines Fachwissens im Blick lag. Ein Anzeichen dafür ist darin zu sehen, dass das Streitpatent und die dort zitierte NiK11 beide die Druckschrift NiK7 zitieren (u.a. NiK1 [0007], NiK11 S. 3 Z. 23), die neben den weiteren diesbezüglich von der Klägerin vorgelegten Druckschriften NiK27, NiK46 und NiK64 diese Anwendung zum Thema hat (NiK7 S. 4259 Z. 5 unter

Introduction; NiK27 S. 1977 Z. 2 unter *Introduction*; NiK46 S. 741 Z. 6 unter *Introduction*; NiK64 Überschrift). Diese Druckschriften mögen daher als vom Fachwissen gestützte Ausgangspunkte für die Bereitstellung von insbesondere 3'-substituierten Nucleosiden dienlich sein.

Hinsichtlich der nun zugrunde zu legenden Aufgabe der Bereitstellung von antiviralen Mitteln ist dabei auch auf das Fachwissen des Fachmanns abzustellen, demzufolge solche Mittel nur im nicht phosphorylierten Zustand wirken können, mit anderen Worten als Nucleoside.

Aus der von der Klägerin präsentierten Auswahl an Druckschriften muss bereits die NiK7 ausgenommen werden, die keine Azidomethyl-geschützten Nucleoside offenbart. Azidomethyl-geschützte Nucleoside finden sich neben zahlreichen Beispielen für Nucleoside mit anderen Schutzgruppen in NiK27, NiK46 und NiK64 (NiK27 S. 1981 Schema 3; NiK46 Tab. 1, 3, 5, 8; NiK64 S. 18 Tab. 1).

NiK27 gibt keine Anregung, die dort offenbarte Nucleosidchemie auch für Nucleotide in Betracht zu ziehen, da Nucleotide, wie ausgeführt, nicht als antivirale Mittel zu wirken vermögen. Soweit eine in NiK27 (oder auch NiK26) nicht einmal angesprochene Möglichkeit erkennbar sein mag, dort gelistete Nucleoside durch Phosphorylierung in Nucleotide umzuwandeln, vermitteln diese Schriften dem Fachmann auch keine sinnvolle Anwendung im Sinne einer Anregung, diese Phosphorylierung vorzunehmen. Insbesondere findet sich keine Motivation für die Herstellung von 3'-O-Azidomethyl-Nucleotiden, denn beide Druckschriften stellen im Kern auf vielseitig umwandelbare Methylthiomethyl-geschützte Nucleoside ab und empfehlen, was den Azidomethylrest betrifft, dessen milde Reduktion, geben jedoch keinen erkennbaren Hinweis in Richtung seiner separaten Weiterverwendung als antivirales Mittel. Damit kommt es auf durch das Fachwissen des Synthesechemikers gestützte, aber erkennbar weitergehende Überlegungen hinsichtlich der Erfolgsaussichten einer Phosphorylierung von Azidomethylnucleosiden oder deren sich in einem weiteren Schritt anschließenden etwaigen Testung auf Verhinderung des Zellwachstums nicht an.

Nichts anderes ergibt sich für NiK46 als Ausgangspunkt. Denn diese mit der Untersuchung der Ribose-Ringkonformation und deren hydrolytischer Stabilität befasste wissenschaftliche Publikation beschreibt zwar auch ein 3'-azidomethylsubstituiertes-2',3'-Dideoxyribonukleosid, wobei dem Titel zufolge nur einige der dort behandelten Verbindungen potentielle HIV-Inhibitoren bilden. Zudem lässt die NiK46 offen, inwieweit Konformation oder Hydrolysestabilität ein Indiz für deren gelungenen Einsatz als antivirale Mittel bilden. Von NiK46 ausgehend findet sich für den Fachmann kein Hinweis, von dem dort behandelten Nukleosidkollektiv speziell das Azidomethylderivat herauszugreifen und die bereits zu NiK26/NiK27 ausgeführten weiteren Überlegungen anzustellen.

Nicht zuletzt befasst sich auch die NiK64 mit der hydrolytischen Stabilität von Nukleosiden, führt einleitend AZT, also ein 3'-Azidnukleosid als bekannten HIV-Wirkstoff auf (NiK64 S. 17 *INTRODUCTION*) und untersucht mögliche Zusammenhänge zwischen Hydrolysestabilität und Wirkstoffeffizienz, allerdings ohne konkrete Schlüsse zu präsentieren. Für den Fachmann beachtlich befindet NiK64 jedoch, dass die Stabilität der untersuchten Nukleoside mit dem elektronenziehenden Effekt (induktiver Sigma-Effekt) der Substituenten in der 3'-Position korreliert. Daher wird er im Lichte des σ^* -Wertes von 0,64 für den Azidomethylrest, der weitab von dem Wert 0,87 für den stabileren Azidrest der insoweit als bereits wirksam erkannten Verbindung AZT liegt (NiK64 S. 19 Abs. 2 und Tab. 2) gerade davon abgehalten, einem hydrolyseempfindlicheren Rest aus dem Kollektiv der dort genannten Verbindungen besondere Bedeutung beizumessen und für den Verwendungszweck als antivirales Agens in Betracht zu ziehen.

Als der NiK27 und der NiK46 vorausgehende Lehre führt der zahlenmäßig erfasste Befund der NiK64 zur vergleichsweise geringen Stabilität azidomethylsubstituierter Nukleoside von deren Einsatz als antivirale Mittel weg.

2.2. Hinsichtlich des Verwendungszwecks der erfindungsgemäßen Nukleotide im Sanger-Sequenzierverfahren sowie in Sequenzierverfahren der Sanger-Art (NiK1 Anspr. 28) gelten dieselben Erwägungen.

Selbst wenn es dem Fachwissen des Fachmanns zuzurechnen sein mag, dass im Zusammenhang mit antiviralen Mitteln vorgeschlagene 3'-Azidomethylnukleoside dem gleichen Wirkprinzip unterliegen wie die in den Sanger-Verfahren verwendeten 3'-geschützten Nukleotide, und selbst wenn NiK7 im Rahmen der Einführung eine beträchtliche Breite an möglichen Kombinationen von Terminatoren und Polymerasen für das Sanger-Verfahren anspricht (NiK7 S. 4259 INTRODUCTION 4. Satz), belegen die Versuche der NiK7 eine Terminierungsaktivität nur für einige der dort untersuchten Nukleotide (NiK7 S. 4263 Tab. 2). Eine Empfehlung oder ein Hinweis auf potentiell geeignete Nukleotide außerhalb der spezifischen Offenbarung der NiK7 wird nicht gegeben, insbesondere nicht für andere Anwendungsgebiete, wie sie in NiK27, NiK46 und NiK64 beschrieben sind. In keiner dieser Druckschriften findet sich, wie ausgeführt, eine erkennbare Qualifizierung des Azidomethylrests als besonders geeignet für Sanger-Sequenzierverfahren bzw. Sequenzierverfahren der Sanger-Art.

2.3 Was matrizenunabhängige Sequenzierverfahren betrifft, beschreibt die insoweit von der Klägerin angeführte NiK12 die Herstellung von einzelsträngigen Oligonukleotiden, indem zwischen jeweils zwei Nukleotiden mittels einer matrizenunabhängigen Polymerase eine Phosphodiester-Bindung bewirkt wird. Damit auf diese Weise in einem Verfahrenszyklus jeweils nur ein Nukleotid an den bestehenden Strang angehängt wird, kommen Nukleotidanaloga zum Einsatz, die an der 3'-Position der Ribose eine entfernbare Schutzgruppe aufweisen (NiK12 Sp. 4 Z. 12-48). Als geeignete Schutzgruppen listet NiK12 eine Vielzahl von Schutzgruppen auf, nämlich Carbonitrile, Phosphate, Carbonate, Carbamate, Ester, Ether, Borate, Nitrate, Zucker, Phosphoramidate, Phenylsulfenate, Sulfate und Sulfone (NiK12 Sp. 4 Z. 64-67). Soweit die Klägerin eingewendet hat, dass in NiK12 nur zehn Nukleotide konkret benannt seien und Ester als nachteilig

bezeichnet würden, was den Fachmann dazu brächte, sich vornehmlich der Untersuchung substituierter Ether zuzuwenden, vernachlässigt sie, dass NiK12 eine breite Aufstellung von Schutzgruppentypen mit unterschiedlichem Hydrolyseverhalten aufzeigt und dies den Fachmann gerade nicht dazu anhält, nur in den Beispielen untersuchte Verbindungen in Betracht zu ziehen. Gleichermaßen führt die Kombination von NiK12 mit NiK17 oder NiK26/27 nicht zur Auswahl einer Azidomethyl-Schutzgruppe, da weder NiK17 noch NiK26/27 ein Hinweis zu entnehmen ist, der die Azidomethylgruppe als für diesen Zweck besonders geeignet ausweisen würde.

2.4 Die übrigen von der Klägerin angeführten Entgegnungen geben entweder das Fachwissen des Fachmanns wieder oder unterscheiden sich noch in weiteren Merkmalen von den patentgemäßen Gegenständen. Sie führen zu keiner anderen Beurteilung der Sachlage. Keines der als Stand der Technik beachtlichen Dokumente geht über den Offenbarungsgehalt der vorstehend diskutierten Druckschriften hinaus oder bietet spezielle weitergehende Anregungen, die entweder in Richtung der erfindungsgemäßen Azidomethyl-Nukleotide weisen oder zur Aufklärung der „starken“ Nukleophile im Zentrum der Polymerase beitragen und ggf. Zweifel an der Lehre der NiK11 wecken könnten. Schließlich sind die übrigen Dokumente von der Klägerin auch nicht im Einzelnen zur Begründung mangelnder Patentfähigkeit herangezogen worden.

III.

Die Kostenentscheidung beruht auf § 84 Abs. 2 PatG i. V. m. § 91 Abs. 1 ZPO, die Entscheidung über die vorläufige Vollstreckbarkeit auf § 99 Abs. 1 PatG i. V. m. § 709 ZPO.

IV.

Gegen dieses Urteil ist das Rechtsmittel der Berufung gegeben.

Die Berufungsschrift muss von einer in der Bundesrepublik Deutschland zugelassenen Rechtsanwältin oder Patentanwältin oder von einem in der Bundesrepublik Deutschland zugelassenen Rechtsanwalt oder Patentanwalt unterzeichnet und innerhalb eines Monats beim Bundesgerichtshof, Herrenstraße 45a, 76133 Karlsruhe eingereicht werden. Die Berufungsfrist beginnt mit der Zustellung des in vollständiger Form abgefassten Urteils, spätestens aber mit dem Ablauf von fünf Monaten nach der Verkündung.

Die Berufungsschrift muss die Bezeichnung des Urteils, gegen das die Berufung gerichtet wird, sowie die Erklärung enthalten, dass gegen dieses Urteil Berufung eingelegt werde.

Schramm

Schwarz

Münzberg

Jäger

Freudenreich