



BUNDESPATENTGERICHT

IM NAMEN DES VOLKES

URTEIL

Verkündet am
25. Juni 2019

3 Ni 21/17 (EP)

(Aktenzeichen)

...

In der Patentnichtigkeitssache

...

betreffend das europäische Patent EP 1 831 250
(DE 60 2005 046 529)

hat der 3. Senat (Nichtigkeitssenat) des Bundespatentgerichts auf Grund der mündlichen Verhandlung vom 25. Juni 2019 durch den Vorsitzenden Richter Schramm sowie die Richterinnen Dipl.-Chem. Dr. Münzberg und die Richter Hermann, Dipl.-Chem. Dr. Wismeth 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 am 28. Dezember 2005 als PCT-Anmeldung PCT/JP2005/024280 (WO 2006/070944) angemeldeten, die japanischen Prioritäten 2004378604 und 2004378615, jeweils vom 28. Dezember 2004, sowie die japanische Priorität 2005262087 vom 09. September 2005 in Anspruch nehmenden und mit Wirkung für die Bundesrepublik Deutschland in der regionalen Phase erteilten Patents EP 1 831 250, dessen Erteilung am 6. Mai 2015 veröffentlicht worden ist. Vom Deutschen Patent- und Markenamt wird es unter der Nummer DE 60 2005 046 529 geführt. Das erteilte Patent betrifft „L-Glutamic acid-producing microorganism and a method for producing L-Glutamic acid“ („L-Glutaminsäure produzierender Mikroorganismus sowie Verfahren zur Produktion von L-Glutaminsäure“) und umfasst 12 Patentansprüche. Die erteilten Patentansprüche lauten in der Verfahrenssprache Englisch wie folgt:

1. A yggB gene encoding any one of SEQ ID NO: 6, 62, 68, 84 or 85 having a threonine at position 100, and/or having a valine or threonine at position 111 (mutant-type yggB gene).
2. The mutant-type yggB gene according to claim 1, wherein said yggB gene encodes any one of SEQ ID NO: 6, 62, 68, 84 or 85, having a threonine at amino acid position 100.
3. The mutant-type yggB gene according to claim 2, encoding the amino acid sequence of SEQ ID NO: 22.
4. The mutant-type yggB gene according to claim 1, wherein said yggB gene encodes any one of SEQ ID NO: 6, 62, 68, 84 or 85, having a threonine or valine at amino acid position 111.
5. The mutant-type yggB gene according to claim 4, encoding the amino acid sequence of SEQ ID NO: 24 or 64.
6. A coryneform bacterium having L-glutamic acid-producing ability, comprising the mutant-type yggB gene according to any one of claims 1 to 5.
7. The coryneform bacterium according to claim 6, wherein said coryneform bacterium is further modified to inactivate a symA gene comprising nucleotides 585 to 1121 of SEQ ID No: 86.
8. The coryneform bacterium according to claim 6 or 7, wherein said coryneform bacterium is further modified to decrease α -ketoglutarate dehydrogenase activity.
9. The coryneform bacterium according to any one of claims 6 to 8, wherein said coryneform bacterium belongs to the genus *Corynebacterium* or the genus *Brevibacterium*.
10. The coryneform bacterium according to claim 9, wherein said coryneform bacterium is *Corynebacterium glutamicum*.
11. A method for producing L-glutamic acid comprising culturing the coryneform bacterium according to any one of claims 6 to 10 in a medium so to cause accumulation of L-glutamic acid in the medium or the bacterium, and collecting L-glutamic acid from the medium or the bacterium.
12. A method for producing a seasoning, comprising producing L-glutamic acid according to the method of claim 11.

Die Klägerin greift das Patent im Umfang der Patentansprüche 1 bis 6 und 8 bis 12 an. Als Nichtigkeitsgrund macht die Klägerin mangelnde erfinderische Tätigkeit geltend. Zur Stütze ihres Vorbringens verweist die Klägerin im Wesentlichen auf folgende Dokumente:

- | | |
|------|--|
| NK1 | EP 1 831 250 B1 (= Streitpatent) |
| NK9 | R. Kelle et al., <i>Biotechnology and Bioengineering</i> , (1996) 40 bis 50 |
| NK10 | S. Morbach et al., <i>Applied and Environmental Microbiology</i> , (1996) 4345 bis 4351 |
| NK11 | D.J. Reinscheid et al., <i>Applied and Environmental Microbiology</i> , (1994) 126 bis 132 |
| NK12 | P. Lapujade et al., <i>Metabolic Engineering</i> , (1999) 255 bis 261 |
| NK13 | D. Nottebrock et al., <i>FEMS Microbiology Letters</i> , (2003) 305 bis 309 |
| NK14 | S. Ruffert et al., <i>European Journal of Biochemistry</i> , (1997) 572 bis 580 |

- NK15 S. Miller et al., The EMBO Journal, (2003) 36 bis 46
- NK16 R.B. Bass et al., Science, (2002) 1582 bis 1587
- NK17 M. Sotomayor und K. Schulten, Biophysical Journal, (2004), 3050 bis 3065
- NK21 DE 695 22 690 T2
- NK34 M.D. Edwards et al., Current Opinion in Microbiology (2004), 163 bis 167
- NK35 Dissertation von S... an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Köln, Februar 2004, insb. Seiten 1 bis 9
- NK36 E. Perozo und D.C. Rees, Current Opinion in Structural Biology, (2003) 432 bis 442
- NK37 R. Krämer, FEMS Microbiology Reviews, (1994) 75 bis 94
- NK38 K. Yoshimura et al., Biophysical Journal, (1999) 1960 bis 1972
- NK40 C.D. Pivetti et al., Microbiology and Molecular Biology Reviews, (2003) 66 bis 85
- NK48 F. Duperray et al., Biochimica et Biophysica Acta, (1992) 250 bis 258
- NK54 Kommentiertes Alignment aus NB10 (Seite 8), Anlage zum Protokoll der mündlichen Verhandlung vom 25. Juni 2019

Die Klägerin setzt als bekannt voraus, dass coryneforme Bakterien, wie *Corynebacterium glutamicum*, in der fermentativen Herstellung von Glutaminsäure bzw. Glutamat seit Jahrzehnten eingesetzt werden. Als bekannt könne aus ihrer Sicht ferner vorausgesetzt werden, dass dabei der Transport der Aminosäure aus den Zellen heraus der für die Produktion limitierende Faktor sei, wie sich aus NK12 ergebe. Auf dieser Grundlage sei von den Autoren der NK13 festgestellt worden, dass *Corynebacterium glutamicum* die zwei mechanosensitiven Kanäle MscL und MscS/YggB besitze, die homolog zu den entsprechenden Kanälen in *E. coli* seien. Ergänzend dazu offenbare die Druckschrift NK14, dass der Ausstrom von Glutamat im *Corynebacterium glutamicum* durch einen mechanosensitiven Kanal beschränkt sei und dieser Kanal dem MscS/YggB-Kanal von *E. coli* ähnele. Das Wissen über den MscS/YggB-Kanal in *E. coli* sei sehr umfangreich. So sei aus NK15,

NK16 und NK17 bekannt, dass mit sogenannten „Gain-of-Function (GOF)“-Mutationen in der kanalbildenden Transmembranhelix TM3 des MscS/YggB-Kanals eine Öffnung des Kanals bzw. eine Erniedrigung dessen Kanalöffnungsschwelle erreicht werden könne. In Kenntnis dessen suche der Fachmann nach Ansicht der Klägerin zur Verbesserung der Glutamat-Herstellung nicht nach einem unbekanntem Glutamat-Carrier, sondern nach geeigneten Mutanten des MscS/YggB-Proteins in coryneformen Bakterien. Aus der Sicht der Klägerin seien die mit der vorliegenden Nichtigkeitsklage angegriffenen Gegenstände des Streitpatents ausgehend von NK12 unter gleichzeitiger Berücksichtigung der NK14 sowie jeder der in den Dokumenten NK15, NK16 und NK17 offenbarten Lehre daher naheliegend.

Alternativ dazu komme aus der Sicht der Klägerin als nächstliegender Stand der Technik die Druckschrift NK34 in Frage, in der Glutamat als eines der in bakteriellen Zellen akkumulierten gelösten Moleküle benannt werde, welches im Falle der Öffnung eines mechanosensitiven Kanals wie MscS/YggB aus der Zelle ausgeschleust werde. Ergänzend dazu weise die NK36 auf „Gain-of-Function“-Mutationen sowohl im MscS/YggB- als auch im MscL-Kanal von *E. coli* und anderen Prokaryonten hin. Der Schwerpunkt der Druckschrift NK38 liege schließlich auf einer speziellen GOF-Mutante in der Transmembranhelix TM1 des MscL-Kanals von *E. coli*. Der Fachmann müsse das Wissen über das *E. coli* MscL-Protein daher nur mittels eines routinemäßigen Sequenzvergleichs, wie in NK54 gezeigt, auf das MscS/YggB-Protein von *Corynebacterium glutamicum* übertragen, was durch den in NK36 aufgezeigten Vergleich von MscL und MscS/YggB sowie die in der Druckschrift NK34 hergestellte Verbindung zwischen MscS/YggB und einer Glutamat-Ausschleusung auf der Hand liege. Eine Kombination der Druckschrift NK34 und/oder NK36 mit der Druckschrift NK38 führe daher ebenfalls auf naheliegende Weise zu den Gegenständen des Streitpatents. Zu den patentgemäßen Gegenständen gelange der Fachmann nach Ansicht der Klägerin auch dann, wenn er die Druckschrift NK12 bzw. NK14 mit den Druckschriften NK36 und NK38 kombiniere.

Dabei sei ferner zu berücksichtigen, dass der genaue Mechanismus des Glutamat-Exports aus den Zellen von Corynebakterien in der Fachwelt nicht bekannt

sei, so dass für den Fachmann die Herstellung eines Zusammenhangs zwischen dem Glutamat-Export bei Corynebakterien und den gut untersuchten mechanosensitiven Kanälen in *E. coli* naheliege. Dies folge insbesondere aus der Druckschrift NB5, in der ein Vergleich des vermeintlichen Glutamat-Carriers mit den mechanosensitiven Kanälen von *E. coli* gezogen werde. Dadurch erhalte der Fachmann nach Ansicht der Klägerin eine Veranlassung dafür, sich mit den mechanosensitiven Kanälen von *E. coli*, wie sie z.B. in NK15 bis NK17, NK34, NK36 oder NK38 beschrieben würden, auch im Zusammenhang mit dem Glutamat-Ausstoß bei Corynebakterien zu beschäftigen.

Die Klägerin beantragt,

das europäische Patent 1 831 250 im Umfang der Patentansprüche 1 bis 6 und 8 bis 12 mit der Wirkung für das Hoheitsgebiet der Bundesrepublik Deutschland für nichtig zu erklären.

Die Beklagte beantragt,

die Klage abzuweisen, hilfsweise die Klage mit der Maßgabe abzuweisen, dass das Streitpatent im angegriffenen Umfang die Fassung des Hilfsantrags 1 gemäß Schriftsatz vom 10. April 2019 (in der Verfahrenssprache) erhält.

Die Beklagte widerspricht dem Vorbringen der Klägerin vollumfänglich. Zur Stütze ihres Vorbringens reicht die Beklagte u.a. folgende Dokumente ein:

- NB1 C. Hoischen und R. Krämer, Archives of Microbiology, (1989) 342 bis 347
- NB2 M. Gutmann et al., Biochimica et Biophysica Acta, (1992) 115 bis 123
- NB5 C. Lambert et al., Applied and Environmental Microbiology, (1995) 4334 bis 4342

NB7 P. Gourdon et al., Journal of Biotechnology, (2003), 77 bis 85

NB15 Sicherheitsdatenblatt der Firma Sigma-Aldrich zur Substanz Tetracain,
Version 5.0, überarbeitet am 13.11.2012

Nach Auffassung der Beklagten suche der Fachmann nach einem verbesserten Herstellungsverfahren für Glutamat und berücksichtige daher Kenntnisse über die Notfallreaktionen von Zellen bei hypoosmotischem Schock nicht. Denn sämtliche in der Fachwelt bekannten Aminosäure-Exporter seien der Klasse der Carrier zuzuordnen, wie sich u. a. aus NB1 und NB2 ergebe. Dies stelle die NK12 nicht in Frage und liefere daher auch keine Anregung, sich osmoregulatorischen Kanälen zuzuwenden. Ausgehend von NK12 sei eine Berücksichtigung von Stand der Technik, der sich mit den durch einen hypoosmotischen Schock aktivierten Notfallventilen befasse, daher fernliegend. Dies erkläre sich auch damit, dass der plötzliche und nur kurz auftretende Ausstrom von Zellinhaltsstoffen in Folge einer Notfallreaktion auf einen hypoosmotischen Schock einerseits, sowie die kontinuierliche Freisetzung von Glutamat während der Fermentation unter hyperosmotischen Bedingungen andererseits, unterschiedlich und demzufolge nicht miteinander vereinbar seien. NK14 sei infolgedessen kein geeigneter Ausgangspunkt, denn der Fachmann suche nach verbesserten Verfahren für die Glutamat-Herstellung, bei denen der hypoosmotische Schock definitiv nicht angewendet werde. Dass sich NK14 mit der Glutamat-Herstellung in keiner Weise befasse, ergebe sich zudem aus der Tatsache, dass Glutamat darin lediglich als Kontrollsubstanz verwendet werde. Im Übrigen bestätige NK14 im Einklang mit NB1 und NB2 die Lehren zum Glutamat-Export-Carrier, der unter Einsatz von Energie Glutamat selektiv und selbst gegen einen Konzentrationsgradienten aktiv aus der Zelle transportiere. Hierzu seien osmoregulatorische Kanäle, wie sie in NK14 untersucht würden, jedoch nicht in der Lage. Zu beachten sei ferner, dass – wie in NB5 festgestellt – hypoosmotische Bedingungen allein nicht zu einer Freisetzung von Glutamat führen würden. Auch andere Dokumente, wie NK13, lieferten keinen Hinweis darauf, welches Export-System für den Glutamat-Ausstrom unter fermentativen Bedingungen verantwortlich sei.

Selbst wenn der Fachmann dem Austritt von Glutamat unter hypoosmotischen Bedingungen für die Glutamat-Herstellung eine Bedeutung beimessen würde, erschließe sich ihm nach Ansicht der Beklagten aus dem Stand der Technik, wie er vorliegend u.a. durch die Druckschriften NK15, NK16 und N17 repräsentiert werde, nicht, wie er einen osmoregulatorischen Kanal zur Verbesserung der fermentativen Glutamat-Herstellung in coryneformen Bakterien verändern müsse. Denn diejenigen Informationen, die die Fachwelt in einem völlig anderen Zusammenhang über die mechanosensitiven Kanal-Proteine MscS/YggB und MscL in *E. coli* in Erfahrung gebracht habe, könnten nicht auf das MscS/YggB-Protein in Corynebakterien übertragen werden. Hiergegen spreche, dass die Proteine in den verschiedenen Bakterien zwar homolog aber nicht identisch seien, was der Sequenzvergleich in NK54 deutlich mache, und es sich andererseits bei MscL und MscS um zwei Proteinfamilien handle, deren Proteine sich in Größe und Organisation deutlich voneinander unterscheiden.

Auch die im Stand der Technik beschriebenen „Gain of Function“-Mutanten im MscS/YggB-Kanal oder MscL-Kanal von *E. coli* vermittelten dem Fachmann keine Anregung, die in Richtung der patentgemäßen Lösung weise, da die Bakterien dadurch so stark geschädigt würden, dass sie kaum überlebensfähig seien.

Mit ihrem Hilfsantrag vom 10. April 2019 begehrt die Beklagte vorsorglich ausschließlich Schutz für ein Verfahren zur Herstellung von Glutaminsäure.

Entscheidungsgründe

Die auf den Nichtigkeitsgrund der mangelnden Patentfähigkeit (Art. II § 6 Abs. 1 Nr. 1 IntPatÜG i. V. m. Art. 138 Abs. 1 lit. a) EPÜ und Art. 56 EPÜ) gestützte Klage ist zulässig, aber unbegründet und deshalb abzuweisen.

I.

Das Streitpatent betrifft die Glutaminsäure- bzw. Glutamat-Herstellung unter Einsatz von coryneformen Bakterien (vgl. NK1, Abs. [0001] i. V. m. Patentansprüchen 1, 6, 11 und 12).

1. In seiner Beschreibung berichtet das Streitpatent einleitend davon, dass Glutaminsäure ein gängiger Stoff in der Lebensmittelindustrie und u. a. die Grundlage bei der Herstellung vieler Würzmischungen ist. Im industriellen Maßstab wird Glutaminsäure mittels fermentativer Techniken unter Einsatz von coryneformen Bakterien hergestellt, die die Fähigkeit besitzen, Glutaminsäure zu produzieren. Zu diesen Bakterien gehören Bakterien des Genus *Brevibacterium* oder *Corynebacterium*. Die Wildtyp-Stämme der Corynebakterien produzieren allerdings keine Glutaminsäure, wenn in deren Umgebung Biotin (= Vitamin B7) im Überschuss vorhanden ist. Dementsprechend wird Glutaminsäure in Corynebakterien typischerweise unter Biotin-limitierten Bedingungen hergestellt oder dem Kulturmedium entweder ein Tensid oder Penicillin zugegeben. Eine weitere Alternative sieht den Einsatz von mutierten Corynebakterien vor, die in Gegenwart eines Überschusses von Biotin kultiviert werden können. Dazu gehören neben einem Tensid-Temperatur-empfindlichen Bakterienstamm auch ein Penicillin-empfindlicher sowie ein Lysozym-empfindlicher Stamm. Nachteilig an diesen Bakterienstämmen ist jedoch, dass diese eine Abnahme der Fettsäure- oder Zellwandbiosynthese zeigen, was letztendlich den Einsatz derartiger Bakterienstämme zur Herstellung von Glutaminsäure erschwert, da sie hierfür kein ausreichendes Wachstum zeigen. Auch Bakterienstämme, bei denen das für die α -Ketoglutar-säure Dehydrogenase (kurz α -KGDH) kodierende Gen inaktiviert wurde, werden zur Herstellung von Glutaminsäure in Gegenwart eines Überschusses von Biotin eingesetzt. Allerdings zeigen auch die α -KGDH-negativen Bakterienstämme für die Glutaminsäure-Produktion ein zu langsames Wachstum.

Bekannt ist den Angaben im Streitpatent zufolge ferner, dass das *yggB* Gen in coryneformen Bakterien ein Homolog zum *yggB*-Gen im Bakterium *Escherichia*

coli (kurz *E. coli*) darstellt und es sich dabei um eine Art mechanosensitiven Kanal handelt. Über dessen Bedeutung für die Glutaminsäure-Produktion wurde bisher allerdings nichts berichtet. Das Streitpatent führt ferner aus, dass an anderen Stellen in der Literatur das vollständige Genom des coryneformen Bakteriums *Corynebacterium glutamicum* (ATCC 13032) beschrieben oder die mechanosensitiven Kanäle im *Corynebacterium glutamicum* aus molekularer und biochemischer Sicht charakterisiert werden (vgl. NK1, Abs. [0002 bis 0006]).

2. Vor diesem Hintergrund liegt dem Streitpatent die technische Aufgabe zugrunde, eine neue Methode zur verbesserten Herstellung von Glutaminsäure in coryneformen Bakterien bereitzustellen (vgl. NK1, Abs. [0007]).

3. Diese Aufgabe wird u.a. durch das mutierte *yggB*-Gen des geltenden Patentanspruchs 1 nach Hauptantrag gelöst, welches folgende Merkmale aufweist:

- Das mutierte *yggB*-Gen, das eine der aus einem coryneformen Bakterium stammenden SEQ ID NO: 6, 62, 68, 84 oder 85 kodiert,
- weist ein Threonin an der Position 100 und/oder
- ein Valin oder Threonin an der Position 111 auf.

4. Zuständiger Fachmann ist ein Biologe, Biochemiker oder Biotechnologe, der einschlägige Berufserfahrung auf dem Gebiet der fermentativen Herstellung von Aminosäuren besitzt.

II.

Die Gegenstände der mit der Klage angegriffenen Patentansprüche beruhen auf erfinderischer Tätigkeit.

1. Der Gegenstand des erteilten und geltenden Patentanspruchs 1 nach Hauptantrag war unter Berücksichtigung der vorliegend zitierten Dokumente für

den hier angesprochenen Fachmann zum Prioritätszeitpunkt des Streitpatents entgegen der Rechtsauffassung der Klägerin nicht nahegelegt.

1.1 Druckschrift NK12 als Ausgangspunkt

Zur Lösung der Aufgabe, die Herstellung von Glutaminsäure in coryneformen Bakterien zu verbessern, orientiert sich der Fachmann im Stand der Technik an Druckschriften, die sich mit der Ausschleusung von Glutaminsäure aus Corynebakterien befassen, da Glutaminsäure großtechnisch stets aus dem Kulturmedium gewonnen wird. Eine solche Druckschrift ist die vorliegend als NK12 bezeichnete Veröffentlichung von Lapujade et al., die aus dem Jahr 1999 stammt und damit weit vor dem Prioritätsdatum des Streitpatents (2004) veröffentlicht wurde.

Lapujade et al. beschreiben in der NK12 die Ergebnisse ihrer Studie zur Glutamat-Exkretion im Corynebakterien-Stamm *Corynebacterium glutamicum* 2262 unter verschiedenen thermischen Bedingungen (vgl. NK12, S. 255, Titel i. V. m. Abstract, erster Satz und re. Sp., dritter Abs., erster Satz). Dies ist für den Fachmann ein interessanter Ansatz, da eine Temperaturveränderung technisch einfach zu realisieren ist, keinen Zusatz weiterer stofflicher Komponenten zum Kulturmedium oder eine gentechnische Veränderung der Bakterienzellen erfordert und damit nicht nur relativ kostengünstig sondern auch zeitsparend ist.

Den Angaben der NK12 zufolge haben Lapujade et al. mit ihrer Studie herausgefunden, dass die schnellste Glutamat-Exkretion im *Corynebacterium glutamicum* bei einer Temperatur von 40°C stattfindet. Den damit verbundenen 6-fachen Anstieg des Glutamat-Ausstoßes erklären die Autoren der NK12 mit einem spezifischen Effekt der Temperatur auf die intrinsische Kapazität des Glutamat-Exportsystems, wobei die thermische Aktivierung der daran beteiligten Enzyme als ein Teilaspekt gesehen wird (vgl. NK12, S. 260, re. Sp., erster Abs., erster vollständiger Satz). Dieses Ergebnis erachtet der Fachmann als vielversprechend.

Allerdings stößt der Fachmann beim Studium der NK12 zugleich auf die von Lapujade et al. geäußerte Annahme, dass das Exportsystem bei der Ausschleusung von Glutamat der ausschlaggebende limitierende Faktor sein könnte. Diese Annahme spiegelt sich nicht nur im Titel der Druckschrift wider, sondern wird von Lapujade et al. auch in der Formulierung „...*the glutamate export system which appears as the major kinetic bottleneck for the glutamate production flux*“ deutlich zum Ausdruck gebracht (vgl. NK12, S. 255, Abstract, vorletzter Satz). Zu dieser Schlussfolgerung gelangen die Autoren der NK12 aufgrund ihrer Beobachtung, dass sich Glutamat selbst unter den Bedingungen für den schnellsten Glutamat-Ausstrom innerhalb der Zelle weiterhin anreichert und dadurch den Biosyntheseweg für Glutamat unterdrückt (vgl. NK12, S. 255, Abstract, letzter Satz i. V. m. Figur 5). Diese Form der „Rückkopplungshemmung“ oder „feedback inhibition“ sprechen die Autoren der NK12 unter dem Abschnitt „Discussion“ erneut ausführlich an, wodurch sie diesem Aspekt ihrer Forschungsergebnisse eine beachtliche Bedeutung beimessen, so dass auch der Fachmann dieser Information Aufmerksamkeit schenkt (vgl. NK12, S. 259/260, übergreifender Abs. und S. 260, li. Sp. zweiter Abs. erster Satz). Lapujade et al. weisen im Abschnitt „Discussion“ darauf hin, dass bereits in früheren Studien zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren – wie Lysin, Isoleucin und Threonin – der Ausstrom dieser Aminosäuren im *Corynebacterium glutamicum* als limitierender Faktor für die Aminosäureproduktion vermutet wurde (vgl. NK12, S. 260, re. Sp., letzter Abs., erster und zweiter Satz). Um dieser Limitierung bei der Glutamat-Exkretion begegnen zu können, regen Lapujade et al. an, die Kapazität der Aminosäure-Ausschleusung aus der Zelle zu erhöhen und damit gleichzeitig die interne Glutamat-Anreicherung zu reduzieren. Sie weisen in diesem Zusammenhang auf den Artikel von Gutmann et al. aus dem Jahre 1992 hin, der vorliegend als NB2 bezeichnet wird. In diesem wird das für den Ausstrom von Glutamat aus dem *Corynebacterium glutamicum* verantwortliche Transportsystem als ein Carrier-System beschrieben (vgl. NB2, Titel). In Anbetracht dessen motivieren die Autoren der NK12 den Fachmann dazu, die Menge an Glutamat-Carrier in der Zelle zu erhöhen oder die mit der Membran verbundenen Faktoren zu verändern, um auf diese Weise das Glutamat-Exportsystem zu aktivieren (vgl. NK12, S. 260, re. Sp., letzter Abs. Sätze eins und zwei von unten).

Der Klägerin ist daher insoweit zuzustimmen, als der Fachmann ausgehend von NK12 eine Anregung dafür erhält, sich zur Verbesserung des Glutamat-Ausstoßes auf das Glutamat-Exportsystem von Corynebakterien zu konzentrieren und sich nicht mit der in der NK12 angegebenen Temperaturerhöhung zufrieden zu geben. Auf eine solche Temperaturerhöhung lässt sich der mit der fermentativen Glutamat-Herstellung befasste Fachmann ohnehin nicht ein, da der schnellste Glutamat-Ausstrom in NK12 eine Temperatur von 40°C erfordert, bei der jedoch das Zellwachstum zum Stillstand kommt (vgl. NK12, S. 259, re. Sp., letzter Abs., erster Satz) und sich der in NK12 angegebene Glutamat-Ausstoß von 85 g/L im Vergleich zu dem aus dem Stand der Technik bekannten, mit dem Bakterium *Corynebacterium glutamicum* erreichbare Ausstoß von 100g/L eher als nachteilig erweist (vgl. NK12, S. 255, re. Sp., dritter Abs., zweiter Satz im Vergleich zu NB7, S. 78, re. Sp., vierter Satz).

In Kenntnis der NK12 sieht sich der Fachmann daher veranlasst, bei seiner Suche nach einer Lösung für die patentgemäße Aufgabe weitere Druckschriften in Betracht zu ziehen und zwar solche, die sich mit dem Exportsystem von Corynebakterien befassen.

1.2 Druckschrift NK14

Mit exakt diesem Thema beschäftigt sich die Druckschrift NK14. Deren Lehre ist auf den Ausstrom von Substanzen geringer Molekülmasse aus dem *Corynebacterium glutamicum* via osmoregulatorischer Kanäle gerichtet (vgl. NK14, Titel und Abstract, Z. 1). Obwohl die wissenschaftlichen Untersuchungen der NK14 somit nicht direkt auf den Ausstrom von Glutamat konzentriert sind, befasst sich der Fachmann dennoch näher mit diesem Dokument, da Ruffert et al. bei ihren Untersuchungen nicht nur die Menge an ausströmenden Substanzen wie Betain (= Glycin-Derivat) und Prolin bestimmen, sondern dabei auch die Glutamat-Menge erfassen (vgl. NK14, S. 575, Tabelle 1, linke Sp. i. V. m. S. 575, re. Sp., erster vollständiger Abs., erster bis dritter Satz). Der Blick des Fachmanns richtet sich daher vorrangig auf die in der Tabelle 1 zusammengestellten Mengen, in denen die jeweiligen Moleküle bei zunehmender Verdünnung des Kulturmediums das Bakte-

rium verlassen. Tabelle 1 macht deutlich, dass Glutamat mit steigendem osmotischen Druck nur in sehr geringem Maß aus den Bakterienzellen ausgeschleust wird. Selbst unter den Bedingungen eines hypoosmotischen Schocks verbleibt Glutamat nach wie vor zu 80% in der Zelle. Stärker als Glutamat wird unter den Bedingungen eines hypoosmotischen Schocks gemäß Tabelle 1 mit 99% nur noch ATP zurückgehalten (vgl. NK14, S. 575, Tabelle 1, re. Sp., Zeilen 3 und 5 von unten i. V. m. S. 572, Abstract, dritter bis fünfter Satz). Wie in NK14 ausgeführt, ergibt sich daraus, dass ein osmotisch ausgelöster Ausstrom von Substanzen aus dem *Corynebacterium glutamicum* eine deutliche Präferenz für bestimmte Moleküle zeigt, wobei Glutamat eindeutig nicht zu den bevorzugten Molekülen gehört (vgl. NK14, S. 575, re. Sp. zweiter Abs., fünfter Satz).

In Kenntnis dessen liegt für den Fachmann der Schluss nahe, dass die Aktivierung osmotisch regulierter Kanäle für die Steigerung des Glutamat-Ausstroms bei der fermentativen Herstellung von Glutamat in Corynebakterien nicht geeignet ist.

Hierfür spricht nicht nur die in NK14 berichtete, starke Zurückhaltung von Glutamat selbst unter hypoosmotischen Bedingungen. Gegen eine Aktivierung osmoregulierter Kanäle zur Steigerung des Glutamat-Ausstoßes spricht außerdem, dass hierfür die Einstellung von hypoosmotischen Bedingungen in der Zellkultur erforderlich ist, was eine extreme Verdünnung des Kulturmediums bedeutet. Dies wiederum ist mit viel Aufwand und hohen Kosten verbunden. Hinzu kommt, dass das Auftreten eines hypoosmotischen Schocks bei der fermentativen Herstellung von Glutamat unter allen Umständen vermieden werden muss, da es sich hierbei für die Zellen – wenn schon nicht um eine letale – so aber in jedem Fall um eine Notfallsituation handelt, in der die Zellen ihre gesamte Energie für den Lebenserhalt aufwenden müssen und daher nicht mehr zu einer überdurchschnittlichen Glutamat-Produktion in der Lage sind.

Dies geht aus der Druckschrift NK14 sogar eindeutig hervor:

Ausgangspunkt der in Tabelle 1 gezeigten Versuchsreihe sind hyperosmotische Bedingungen, unter denen die Zellen in einer Zellkultur normalerweise kultiviert

werden. Erst bei einer Verdünnung des Kulturmediums bis zu 540 mOsm tritt der hypoosmotische Schock ein (vgl. NK14, S. 575, Text zu Tabelle 1). Figur 1 verdeutlicht, dass auf dem Weg zum hypoosmotischen Schock das Volumen des Cytoplasmas der Zelle durch die Diffusion von Wasser in das Zellinnere stetig ansteigt, bis die Zelle unter hypoosmotischen Bedingungen schließlich zu platzen droht (vgl. NK14, S. 573, re. Sp., Fig. 1). Um einen solchen Notfall zu verhindern, besitzt das *Corynebacterium glutamicum* die in NK14 angesprochenen osmoregulatorischen Kanäle, über die das Bakterium in Wasser gelöste Moleküle in kürzester Zeit – in der NK14 wird hierfür eine Zeit von 10 Sekunden angegeben – ausschleust (vgl. NK14, S. 573, li. Sp., erster Abs. i. V. m. S. 574, re. Sp., letzter Abs., erster und zweiter Satz). Die Daten in Tabelle 1 belegen jedoch, dass das *Corynebacterium glutamicum* – wie bereits zuvor angesprochen – diese Kanäle selbst bei einem Notfall, wie dem hypoosmotischen Schock, nicht für den Ausstoß der Aminosäure Glutamat nutzt.

1.2.1 Einbeziehung von Fachwissen aus NK37 und NB5

An dieser Stelle mag sich der Fachmann daran erinnern, in der Fachliteratur, wie z. B. NK37, gelesen zu haben, dass das *Corynebacterium glutamicum* auf einen hypoosmotischen Schock mit dem Ausstrom von Glutamat reagiert (vgl. NK37, S. 75, Abstract, letzter Satz, S. 77, re. Sp., erster Abs., Satz nach der Ref. [21, 22] und S. 83, re. Sp., letzter Abs., erster und zweiter Satz). In der NK37 werden zum Ausmaß des Glutamat-Ausstroms allerdings keinerlei Angaben gemacht, so dass der Fachmann in Kenntnis der zeitlich jüngeren NK14 davon ausgehen muss, dass dieser Ausstrom in einem Umfang erfolgt, der allenfalls zur Reduzierung des hypoosmotischen Schocks einen Beitrag leistet, aber für die fermentative Produktion von Glutamat keinesfalls von Interesse ist. Eine solche Beurteilung des in NK37 angesprochenen Glutamat-Ausstroms unterstützt die in NK37 ebenfalls enthaltene Aussage, dass für eine effektive Glutamat-Produktion in der Zelle zwei Voraussetzungen geschaffen werden müssen: Demnach muss erstens ein sog. „Überfluss-Metabolismus“ erzeugt werden und zweitens muss die Plasma-Membran derart verändert werden, dass dadurch der „Glutamat-Sekretions-Carrier“ aktiviert wird, ohne zugleich eine generelle Membranpermeabilität zu erzeugen (vgl.

NK37, S. 88, re. Sp., erster vollständiger Abs.). Da ein hypoosmotischer Schock jedoch eine generelle Membranöffnung bewirkt, schließt die NK37 dessen Einsatz zur gezielten Glutamat-Freisetzung mit dieser Äußerung folglich aus.

Bekräftigt wird die Einschätzung, dass ein hypoosmotischer Schock für das Ausschleusen größerer Glutamat-Mengen, wie sie bei der fermentativen Glutamat-Produktion beabsichtigt sind, nicht ausreicht, ferner durch die Angaben der NB5, einer weiteren Druckschrift, die ebenfalls das Grundlagenwissen des einschlägig tätigen Fachmanns wiedergibt. Lambert et al. berichten in der NB5 über ihre Erkenntnis, dass der Ausstrom von Glutamat aus dem Bakterienstamm *Corynebacterium glutamicum* erhöht werden kann, indem die Zellen nicht nur osmotischem Stress, sondern zugleich dem Lokalanästhetikum Tetracain ausgesetzt werden, da eine derartige Kombination die Zellmembran für Glutamat durchlässiger macht (vgl. NB5, S. 4334, Titel i. V. m. Abstract, erster Satz, S. 4340, re. Sp., dritter Abs., Z. 13 bis 20 und S. 4341, li. Sp., Zeilen 1 bis 11 von unten). Die Autoren der NB5 setzen für eine verbesserte Glutamat-Exkretion im *Corynebacterium glutamicum* auf eine solche Kombination, da auch sie davon ausgehen, dass im Gegensatz zu Bakterien wie *E. coli* bei Bakterien vom Typ *Corynebacterium glutamicum* ein hypoosmotischer Schock alleine nicht zu einem schnelleren Ausstrom von Glutamat führt (vgl. NB5, S. 4340, re. Sp., Z. 21 bis 18 von unten). Infolgedessen findet der Fachmann in der Druckschrift NB5 eine weitere Bestätigung dafür, dass osmotischer Stress zur Steigerung des Glutamat-Ausstroms aus dem *Corynebacterium glutamicum* nicht geeignet ist.

Selbst den in der NB5 beschriebenen Ansatz, osmotischen Stress mit einem Lokalanästhetikum, wie Tetracain, zu kombinieren, verfolgt der einschlägig tätige Fachmann nicht weiter, da es sich dem Sicherheitsdatenblatt für Tetracain zufolge bei diesem Lokalanästhetikum um eine überaus toxische Substanz handelt, deren Einsatz bei der Herstellung eines für die Lebensmittelindustrie geeigneten Zusatzmittels, wie Glutamat, von vornherein ausgeschlossen ist (vgl. NB15, Seite 1, Punkte 2 bis 2.2).

1.2.2 Osmoregulatorischer Kanal versus Carrier-System

Der in NK14 untersuchte Ausstrom von kleinen gelösten Molekülen, einschließlich Glutamat, aus dem *Corynebacterium glutamicum* unter den Bedingungen eines hypoosmotischen Schocks, liefert dem Fachmann demzufolge keine Anregung dafür, dass durch die Aktivierung von osmoregulatorischen Kanälen in coryneformen Bakterien der Glutamat-Ausstoß verbessert werden kann.

Zweifel am Erfolg eines solchen Vorgehens hegt der Fachmann auch deshalb, weil in der Fachliteratur die Meinung vorherrscht, dass die Ausschleusung von Glutamat aus coryneformen Bakterien durch einen sog. Carrier vermittelt wird, der – anders als ein Kanal – Substanzen unter Einsatz von Energie auch entgegen eines Konzentrationsgradienten nach außen schleusen kann, während Substanzen über einen Kanal aus dem Zellinneren nur dann nach außen gelangen, wenn deren Konzentration in dem die Zelle umgebenden Medium geringer ist als im Zellinneren. Diese in der Fachwelt etablierte Meinung findet sich in einer Vielzahl der bereits zitierten Dokumente (vgl. z. B. NB1, NB2, jeweils Titel; NB5, S. 4341, li. Sp., letzter Abs., Z. 8 bis 11 von unten und NK37, S. 88, re. Sp., erster vollständiger Abs., letzter Satz). Hiervon weichen auch die Autoren der NK14 nicht ab. Dies wird vor allem am Ende ihrer wissenschaftlichen Publikation deutlich, indem sie ausführen, dass der Glutamat-Efflux im *Corynebacterium glutamicum* unter den für eine kontinuierliche Glutamat-Produktion vorherrschenden Bedingungen zwar auf osmotische Veränderung im Zellkulturmedium reagiert, dieser aber dennoch durch ein energieabhängiges, spezifisches Carrier-System vermittelt wird, wie es z. B. Gutmann et al. in NB2 ansprechen (vgl. NK14, S. 579, li. Sp., zweiter vollständiger Abs.).

Da der Fachmann wissenschaftliche Publikationen, wie die NK14, in aller Regel nicht nur stichpunktartig studiert, sondern deren gesamten Inhalt zur Kenntnis nimmt, kann der Klägerin zugestimmt werden, dass der Fachmann in NK14 ergänzend zu den bereits zuvor zitierten Stellen auch diejenigen Stellen beachtet, in denen Ruffert et al. auf das allgemeine Efflux-System des *Corynebacteriums glutamicum* näher eingehen.

Die sicherlich markanteste Stelle befindet sich in diesem Zusammenhang auf der Seite 578, an der Ruffert et al. die Meinung äußern, dass der unter hypoosmotischem Schock für den Efflux kleiner gelöster Moleküle zuständige Kanal im *Corynebacterium glutamicum* dem MscS (= *mechanosensitive channel of small conductance*)-Kanal von *E. coli* – der in der Fachliteratur auch als YggB-Kanal bezeichnet wird – ähneln könnte (vgl. NK14, S. 578, li. Sp., dritter Abs., dritter Satz und re. Sp., dritter Abs., letzter Satz).

Ruffert et al. ziehen dieses Fazit allerdings, obwohl ihnen bewusst ist, dass ihre Studien einen deutlichen Unterschied zwischen den Kanälen in *E. coli* und im *Corynebacterium glutamicum* zeigen. So geben sie selbst an, dass *E. coli* unter einem schweren hypoosmotischen Schock nahezu alle Moleküle geringer Molekülmasse ausschleust, während das *Corynebacterium glutamicum* unter diesen Bedingungen Moleküle nach wie vor selektiv freisetzt (vgl. NK14, S. 578, re. Sp., zweiter Abs., Sätze eins bis fünf). Sie gestehen daher zu, dass sich der Efflux-Kanal von *Corynebacterium glutamicum* vom *E. coli* Efflux-System unterscheiden muss und postulieren in Anbetracht dessen das Vorliegen einer Vielzahl von Kanälen im *Corynebacterium glutamicum* mit unterschiedlichen Spezifitäten, da ihnen die molekulare Identität des bei einem hypoosmotischen Schock im *Corynebacterium glutamicum* genutzten Efflux-Kanals unbekannt ist (vgl. NK14, S. 578, re. Sp., zweiter Abs., sechster und siebter Satz).

Konkrete, fachlich überzeugende Argumente dafür, dass der Glutamat-Ausstrom im *Corynebacterium glutamicum* unter den bei der fermentativen Herstellung von Glutamat üblichen Produktionsbedingungen über einen Kanal verbessert werden kann, der dem MscS/YggB-Kanal von *E. coli* ähnelt, liefert die NK14 somit nicht.

Daran ändert auch die Äußerung in der Druckschrift NK14 nichts, dass es keinen Anhaltspunkt dafür gibt, dass ein „Efflux-Carrier-System“ im *Corynebacterium glutamicum* unter den Bedingungen eines hypoosmotischen Schocks für den schnellen Ausstrom kleiner gelöster Moleküle eine entscheidende Rolle spielt (vgl. NK14, S. 578, re. Sp., erster Abs., letzter Satz). Denn die Bedingungen eines hy-

hypoosmotischen Schocks unterscheiden sich nach wie vor nicht nur hinsichtlich des osmotischen Drucks in den Zellen, sondern auch in zeitlicher Hinsicht grundlegend von der über mehrere Stunden, unter hyperosmotischen Bedingungen erfolgenden fermentativen Herstellung von Glutamat. Außerdem basieren die in NK14 präsentierten Ergebnisse auf einer Vielzahl von Annahmen, was den Fachmann dazu veranlasst, die von Ruffert et al. aufgestellten Theorien zum Efflux von Glutamat aus dem *Corynebacterium glutamicum* über einen Kanal, der dem MscS/YggB-Kanal aus *E. coli* ähnelt, nicht ungeprüft zu übernehmen, sondern weiter zu hinterfragen. Dies gebietet schon allein die Tatsache, dass sowohl die vorliegend als Ausgangspunkt gewählte Druckschrift NK12, ebenso wie die bereits zitierten Dokumente NB1, NB2, NB5 und NK37, als auch die Druckschriften NK9, NK10 und NK11 im Zusammenhang mit dem Efflux von Aminosäuren, wie

- L-Lysin (vgl. NK9, S. 40, Abstract),
- L-Isoleucin (vgl. NK10, S. 4350, li. Sp., zweiter Abs., Z. 1 bis 9)
und
- Threonin (vgl. NK11, S. 131, li. Sp., erster Abs., letzter Satz),

davon ausgehen, dass der Ausstrom dieser Aminosäuren – einschließlich Glutaminsäure – unter den üblichen Kulturbedingungen aus dem *Corynebacterium glutamicum* nach wie vor über ein aktives, energieabhängiges Carrier-System erfolgt. Aufgrund dessen sind die in der NK14 geäußerten Vermutungen betreffend einen „Kanal-basierten“ Glutamat-Efflux im *Corynebacterium glutamicum* während eines hypoosmotischen Schocks nicht geeignet, den Fachmann von seiner Suche nach einem Carrier-basierten System für den Glutamat-Ausstrom aus dem *Corynebacterium glutamicum* unter den für eine fermentative Glutamat-Produktion erforderlichen Bedingungen abzubringen.

Der Argumentation der Klägerin, dass der Fachmann für die beabsichtigte Steigerung der fermentativen Glutamat-Herstellung mangels Kenntnis des Glutamat-Carriers keine andere Wahl gehabt habe, als sich intensiv mit dem in NK14 angesprochenen mechanosensitiven MscS/YggB-Kanal von *E. coli* zu beschäftigen, kann

nicht gefolgt werden. Denn aus dem Stand der Technik ist ersichtlich, dass die Fachwelt bis zu dem für das Streitpatent relevanten Zeitrang im Zusammenhang mit einer Steigerung der fermentativen Glutamat-Produktion bereits diverse andere Optionen getestet hat, wie z. B. die gentechnische Veränderung coryneformer Bakterien (vgl. NK21, Anspruch 1) oder die Stimulierung der Glutamat-Exkretion mittels bestimmter Zusätze im Kulturmedium (vgl. NK48, S. 250, Titel i. V. m. Abstract, erster und zweiter Satz). Es kann somit keine Rede davon sein, dass der Fachmann in Unkenntnis des Glutamat-Carriers keine andere Möglichkeit gesehen hat, als sich mit dem MscS/YggB-Kanal von *E. coli* zu beschäftigen.

Zutreffend ist allenfalls, dass dem Fachmann die Homologie von mechanosensitiven Kanälen in *E. coli* und im *Corynebacterium glutamicum* bekannt ist (vgl. NK1, Abs. [0005] mit Referenz auf Dokument NK13). Nachdem jedoch über den in der NK14 berichteten Kanal im *Corynebacterium glutamicum*, der dem MscS/YggB-Kanal in *E. coli* ähneln soll, selbst unter hypoosmotischem Schock nur 20% des Glutamats die Zelle verlassen, verbindet der Fachmann – entgegen der von der Klägerin vertretenen Auffassung – mit diesem Kanal nicht die Erwartung, dass sich mit dessen Hilfe der Glutamat-Ausstrom im *Corynebacterium glutamicum* unter den Bedingungen einer fermentativen Glutamat-Produktion erhöhen lässt.

1.3 Mechanosensitive Kanäle im *Corynebacterium glutamicum* und in *E. coli*

Aber selbst unter der Annahme, dass sich der Fachmann in einer quasi „ausweglosen“ Situation befindet, die ihn dazu veranlasst, seine Suche nach dem unter Kulturbedingungen für den Ausstrom von Glutamat in coryneformen Bakterien verantwortlichen Carrier zurückzustellen und sich Dokumenten, wie NK13, NK15 bis NK17, NK34, NK36 und/oder NK38, zuzuwenden, die sich nicht mit dem produktiven Glutamat-Ausstrom beschäftigen sondern ausschließlich mit mechanosensitiven Kanälen, erhält er dadurch keinen Hinweis, der ein von coryneformen Bakterien stammendes yggB-Gen nahelegt, welches die im geltenden Patentanspruch 1 gemäß Hauptantrag beschriebene Mutation aufweist.

Über die mechanosensitiven Kanäle im *Corynebacterium glutamicum* weiß der Fachmann, dass an der Ausschleusung von kleinen gelösten Molekülen - sog. internen Soluten – unter hypoosmotischen Bedingungen mindestens drei mechanosensitive Kanäle beteiligt sein müssen. Von diesen sind ihm allerdings nur zwei Kanäle bekannt, welche der MscL- bzw. MscS/YggB-Proteinfamilie angehören, die beide erstmalig in *E. coli* beschrieben wurden. Die Identität des dritten Kanals ist dagegen noch ungeklärt (vgl. NK35, S. 3, dritter Abs. Z. 1 bis 13 und S. 5, Abb. 1). Demzufolge konzentriert sich der Fachmann bei seinen weiteren Recherchen ausschließlich auf die beiden bekannten mechanosensitiven Kanäle MscS/YggB und MscL.

1.3.1 Druckschrift NK13

Die Druckschrift NK13 stützt diese Kenntnis, indem sie beschreibt, dass die Kanäle MscL und MscS/YggB im *Corynebacterium glutamicum* auf genetischer Ebene Ähnlichkeiten zu den mechanosensitiven Kanälen MscL und MscS/YggB in *E. coli* aufweisen (vgl. NK13, S. 305, Abstract, erster Satz i. V. m. S. 306, li. Sp., erster Abs., letzter Satz und S. 307, Abschnitt 2.6 und Punkt 3., Sätze 1 bis 3 sowie S. 308/309, seitenübergreifender Satz). In funktioneller Hinsicht spricht für die Autoren der NK13 jedoch einiges dafür, dass sich die beiden Kanäle in *E. coli* anders verhalten als im *Corynebacterium glutamicum*. Die Autoren beabsichtigen daher anhand von weiteren Untersuchungen herauszufinden, ob das *Corynebacterium glutamicum* einen zusätzlichen mechanosensitiven Kanal besitzt, der möglicherweise sogar einer bisher unbekanntem Familie von mechanosensitiven Kanälen angehört (vgl. NK13, S. 309, li. Sp., erster Abs., Z. 1 bis 14 von unten).

Zur physiologischen Rolle der beiden Kanäle im Zusammenhang mit dem Glutamat-Efflux im *Corynebacterium glutamicum* unter fermentativen Produktionsbedingungen erfährt der Fachmann in NK13 allerdings nichts, da die Autoren dieses Dokuments nur den durch hypoosmotischen Schock ausgelösten Betain (= Glycin-Derivat)-Efflux näher untersuchen (vgl. NK13, S. 305, Abstract, dritter Satz und S. 308, Fig. 1 i. V. m. Text zu Fig. 1). Infolgedessen geht die Lehre der Druckschrift NK13 nicht über das zuvor beschriebene allgemeine Fachwissen hinaus.

1.3.2 Druckschriften NK15 bis NK17

Weitere Details zum MscS/YggB mechanosensitiven Kanal in *E.coli* halten die Dokumente NK15 bis NK17 parat.

Ihnen entnimmt der Fachmann Angaben zum strukturellen Aufbau dieses Kanals. Dazu gehört u. a., dass es sich bei MscS/YggB um ein aus sieben Struktureinheiten bestehendes, die Zellmembran durchspannendes Protein handelt, wobei jede Einheit drei Transmembran-Helices (TM1, TM2 und TM3) aufweist, von denen jeweils die Transmembranhelix TM3 die Pore bildet (vgl. NK15, S. 37, Fig. 1D und NK16, S. 1582, Abstract). Ergänzend dazu bringen die genannten Dokumente sog. „Gain-of-Function“ (kurz GOF)-Mutanten im MscS/YggB-Kanal von *E. coli* ins Spiel. Mit den GOF-Mutanten beschreibt die Fachwelt diverse einzelne Mutationen, die in den MscS/YggB-Kanal von *E. coli* eingeführt werden und zu einer Öffnung des Kanals oder zumindest zu einer Verringerung dessen Kanalöffnungsschwelle führen.

NK15 hebt unter den MscS/YggB-Mutanten diejenigen Mutanten hervor, bei denen die Aminosäure Threonin in der Position 93 gegen die Aminosäure Arginin (T93R), das Alanin in der Position 102 gegen Prolin (A102P) oder das Leucin in der Position 109 gegen Serin (L109S) ausgetauscht wird, da diese Mutanten einen starken GOF-Phänotyp, d. h. in diesem Fall eine ausgeprägte Kanalöffnung, ausbilden (vgl. NK15, S. 36, Abstract). Die genannten Mutationen liegen im Bereich der periplasmatischen Schleife (= loop) sowie der Transmembranhelix TM3 und damit in einem Bereich, der den Angaben in der Druckschrift NK15 zufolge von den Aminosäuren in den Positionen 94 bis 117 kodiert wird (vgl. NK15, S. 37, Figur 1D). Anregungen oder Hinweise, dass entsprechende Mutanten auch im homologen MscS/YggB-Kanal des *Corynebacterium glutamicum* vorkommen, oder derartige GOF-Mutanten einen erhöhten Glutamat-Ausstrom fördern, finden sich in der NK15 jedoch nicht.

Sofern sich der Fachmann aufgrund des Fehlens solcher Hinweise den weiteren Informationen der NK15 überhaupt noch zuwendet, erkennt er darin allenfalls,

dass die Porenöffnung bei der Mutante L109S zum massivsten Ausstrom von Kaliumionen aus *E. coli* führt (vgl. NK15, S. 42, Fig. 5C i. V. m. Text zu Fig. 5C). Aus dieser Tatsache sowie dem schwachen, für die L109S-Mutante nachgewiesenen Zellwachstum leitet die Klägerin die Anregung ab, dass derartige GOF-Mutanten für das Zellwachstum nicht schädlich seien und ohne die Bedingungen eines hypoosmotischen Schocks zu einer Öffnung von Efflux-Kanälen führten, so dass das Auffinden ähnlicher Mutanten im *Corynebacterium glutamicum*, die für einen erhöhten Glutamat-Ausstrom eingesetzt werden könnten, naheliegend sei.

Dem kann nicht gefolgt werden. Einerseits beschreibt die NK15 Ergebnisse aus der Grundlagenforschung betreffend den MscS/YggB-Kanal in *E. coli* und stellt daher weder einen Bezug zu einem anderen Bakterium wie dem *Corynebacterium glutamicum* her, noch zu den Bedingungen einer fermentativen Aminosäure-Produktion. Andererseits vermittelt die L109S-Mutante keine Erfolgsaussichten, da deren in der Figur 5D gezeigtes Zellwachstum nur sehr schwach ausgeprägt ist (vgl. NK15, S. 42, Figur 5D, geschlossene Symbole). Darüber hinaus ist die in NK15 angesprochene L109S-Mutante nicht in der Lage, eine Mutation im MscS/YggB-Protein des *Corynebacteriums glutamicum* nahezulegen, bei der ein Alanin-Rest in der Position 100 bzw. 111 gegen einen Threonin- bzw. Valin-Rest, wie im geltenden Patentanspruch 1 nach Hauptantrag vorgesehen, ausgetauscht wird. Anhaltspunkte, die in Richtung der patentgemäßen Mutanten weisen, liefert auch die weitere in NK15 genannte, einen extremen GOF-Phänotyp kodierende A102P-Mutante nicht, da diese Mutante aufgrund ihrer extremen Porenöffnung kaum lebensfähig ist (vgl. NK15, S. 41, li. Sp., zweiter Abs., erster und letzter Satz).

Entgegen der Auffassung der Klägerin finden sich auch in der Druckschrift NK16 keine Angaben, die in die patentgemäße Richtung weisen. Ihr entnimmt der Fachmann außer der Wiederholung, dass die Transmembranhelix TM3 die Pore des MscS/YggB-Kanals bildet, lediglich die zusätzliche Information, dass der Kanal ein konserviertes Motiv aus Glycin- und Alanin-Resten enthält, welches sich in einer Verbindungsstelle zwischen den porenbildenden TM3-Helices befindet und

beim Übergang zwischen dem geschlossenen und offenen Zustand des Kanals eine Rolle spielt (vgl. NK16, S. 586, mittlere Sp., dritter Abs., ab Z. 7 bis re. Sp., erster Abs.). Angaben zum Glutamat-Efflux über die TM3-Pore oder die Bedeutung der genannten Glycin- und Alanin-Reste für den Glutamat-Ausstrom im *Corynebacterium glutamicum* finden sich in dem wissenschaftlichen Artikel NK16 nicht.

Ähnliche Informationen wie den Druckschriften NK15 und NK16 entnimmt der Fachmann auch der Druckschrift NK17. In ihr wird lediglich erneut zusammengefasst, dass sich die Mutationen T93R, L109S und A102P in der porenbildenden Transmembranhelix TM3 als starke GOF-Mutanten erweisen (vgl. NK17, S. 3051, re. Sp., erster vollständiger Abs. i. V. m. S. 3055, Fig. 6A). Über die konservierte Glycin-Sequenz der Transmembranhelix TM3 berichten die Autoren der NK17, dass diese durch die Glycin-Reste Gly¹⁰¹ und Gly¹¹³ definiert wird und insgesamt vier konservierte Glycin-Reste umfasst (vgl. NK17, S. 3055, li. Sp., zweiter Abs.). Sotomayor et al. erwähnen außerdem, dass an der Schließung der Pore die Alanin-Reste Ala¹⁰² und Ala¹⁰⁶ beteiligt sind (vgl. NK17, S. 3055, re. Sp., Fig. 6A i. V. m. Text zu Fig. 6A).

Das aus diesen Informationen von der Klägerin abgeleitete Argument, in Kenntnis dessen habe es für den Fachmann nahegelegenen Alanin-Reste in der Transmembranhelix TM3 des *Corynebacterium glutamicum* durch Helix-destabilisierende Reste, wie Threonin oder Valin, auszutauschen, um den Ausstrom von Glutamat zu erhöhen, ist nicht durchgreifend. Ein Grund hierfür ist, dass Sotomayor et al. an keiner Stelle ihrer Veröffentlichung einen konkreten Analogieschluss zwischen ihren Beobachtungen zum MscS/YggB-Kanal in *E. coli* und dem dazu homologen MscS/YggB-Kanal in coryneformen Bakterien ziehen. Ein weiterer Grund dafür, dass das zuvor genannte Argument der Klägerin nicht zu überzeugen vermag, besteht darin, dass in der NK17 weder der Austausch der Alanin-Reste Ala¹⁰² und Ala¹⁰⁶ noch beliebiger anderer Alanin-Reste in der Transmembranhelix TM3 angeregt wird. Solche Anregungen fehlen in der NK17, weil Sotomayor et al. für das Öffnen des MscS/YggB-Kanals in *E. coli* die Bildung einer Salzbrücke zwischen dem aus dem zytoplasmatischen Abschnitt stammenden Asp⁶² (Asparaginsäure in

der Position 62) und dem im Transmembran-Abschnitt liegenden Arg¹²⁸ (Arginin in der Position 128) als wesentlich erachten und daher eine patentgemäße Mutation von Alanin-Resten in der Transmembranhelix TM3 für eine Kanalöffnung nicht in Betracht ziehen. Schlussendlich wird der Glutamat-Ausstrom in der Druckschrift NK17 mit keiner Silbe erwähnt, sondern lediglich die Menge an Kalium- und Chloridionen im und um den MscS/YggB-Kanal herum näher untersucht (vgl. NK17, S. 3050, Abstract, letzter und vorletzter Satz).

1.3.3. Druckschrift NK34

Die Lehre der Druckschrift NK34 unterscheidet sich vom Inhalt der zuvor genannten Dokumente nicht wesentlich. Unter der Prämisse, dass mechanosensitive Kanäle eine wesentliche Rolle beim Schutz von Bakterien vor einem hypoosmotischen Schock spielen, widmen sich die Autoren der NK34 dem MscS/YggB-Kanal, um anhand dieser zweiten Klasse von mechanosensitiven Kanälen einen besseren Einblick in die Wirkungsweise dieser Kanäle zu erlangen (vgl. NK34, S. 163, Abstract). Edwards et al. konzentrieren sich dabei zwar nicht ausschließlich auf den MscS/YggB-Kanal von *E. coli*, sondern berücksichtigen auch Homologe in anderen Mikroorganismen, wie Archaeobakterien oder einigen Hefen (vgl. NK34, S. 163, re. Sp., erster vollständiger Abs., erster und zweiter Satz und S. 164, Tabelle 1, rechte Sp.). Dem homologen MscS/YggB-Kanal in *Corynebacterium glutamicum* schenken die Autoren der NK34 aber keine Beachtung.

Auch der Glutamat-Ausstrom ist für die Autoren der NK34 nicht von Interesse. Sie erwähnen lediglich, dass Solute – wie Kaliumionen, Glutamat, Trehalose, Betain und Prolin – Wasser in das Zellinnere ziehen, was unter den Bedingungen eines hypoosmotischen Schocks dazu führt, dass in kürzester Zeit Wasser schnell in die Zelle einströmt und so den Druck der Flüssigkeit im Zellinneren auf die Zellwand drastisch ansteigen lässt. Um die Lyse der Zelle während eines hypoosmotischen Schocks zu vermeiden, müssen die Solute folglich zusammen mit der Flüssigkeit die Zelle über mechanosensitive Kanäle spontan wieder verlassen, um so den Druck auf die Zellwand schnellstens abzubauen (vgl. NK34, S. 163, li. Sp., letzter Abs.). Damit erläutern Edwards et al. aber allenfalls das Prinzip des hypoosmoti-

schen Schocks. Informationen, die das gezielte Ausschleusen von Glutamat unter fermentativen Bedingungen betreffen, enthalten diese Ausführungen nicht.

Bezug nehmend auf die Druckschriften NK15 und NK16 berichten Edwards et al. in NK34 außerdem von den bekannten GOF-Mutanten in der TM3 des MscS/YggB-Kanals bzw. in der Schleife (= loop) zwischen TM2 und TM3 (vgl. NK34, S. 163, re. Sp., letzter Abs., zweiter und dritter Satz i. V. m. Ref. [8] und [9]). Wie schon zuvor in NK15 und NK16 erfolgt auch in der NK34 dieser Hinweis jedoch ohne jeglichen Bezug zum Glutamat-Efflux. Dies gilt auch für das in der NK34 genannte konservierte Motiv aus Glycin- und Alanin-Resten in der TM3 des MscS/YggB-Kanals, dem eine gewisse Bedeutung beim Übergang des Kanals vom offenen in den geschlossenen Zustand zugeschrieben wird (vgl. NK34, S. 166, li. Sp., mittlerer Abs., Z. 8 bis 19).

Infolgedessen erweist sich die Druckschrift NK34 weder als ein im Vergleich zur Druckschrift NK12 besserer Ausgangspunkt, noch enthält sie Angaben, die die im Patentanspruch 1 nach Hauptantrag beschriebene patentgemäße Lösung in das Blickfeld des Fachmanns rücken.

1.3.4 Druckschrift NK36

Das Vorliegen einer erfinderischen Tätigkeit im Zusammenhang mit der Bereitstellung der im geltenden Patentanspruch 1 gemäß Hauptantrag beschriebenen yggB-Mutante bestreitet die Klägerin ferner gegenüber einer Zusammenschau von NK12 bzw. NK34 mit NK36.

Der Inhalt der NK36 ist jedoch nicht geeignet, die in NK12 bzw. NK34 fehlenden Hinweise auf die patentgemäßen yggB-Mutanten vom Typ A100T und/oder A111T bzw. A111V in coryneformen Bakterien zur Erhöhung des Glutamat-Ausstroms zu ergänzen.

Zutreffend ist, dass die Druckschrift NK36 das im Jahr 2003 bekannte Wissen über die Struktur und die Funktionsweise von mechanosensitiven Kanälen in Pro-

karyonten zusammenfasst und dabei sowohl den MscS/YggB- als auch den MscL-Kanal anspricht (vgl. NK36, Titel i. V. m. S. 432, re. Sp., dritter Abs., erster Satz und S. 434, Fig. 2). Es wird herausgestellt, dass die Transmembranhelix TM1 bzw. die Transmembranhelix TM3 jeweils das porenbildende Protein von MscL (TM1) bzw. MscS/YggB (TM3) darstellt und in jedem dieser Kanäle ein konserviertes Sequenzmotiv aus Glycin- und Alanin-Resten zu finden ist, welches für die Funktion der Kanäle als bedeutsam erachtet wird (vgl. NK36, S. 435, re. Sp., zweiter Abs., erster Satz und dritter Abs., Sätze eins bis drei). Ergänzend dazu entnimmt der Fachmann der NK36, dass durch Zufallsmutagenese von MscL und MscS/YggB sog. „Gain-of-function(GOF)“-Mutanten und „Loss-of-function(LOF)“-Mutanten ermittelt wurden (vgl. NK36, S. 436, re. Sp., dritter Abs.). Neben LOF-Mutanten, die eine Kanalöffnung verhindern und daher für den Fachmann nicht von Interesse sind, erkennt er in der Figur 3b der NK36 die ihm bereits aus NK15 und NK17 bekannten GOF-Mutanten in der Transmembranhelix TM3 vom Typ T93, A102 und L109 (vgl. NK36, S. 437, Fig. 3).

Somit besteht zwar kein Zweifel daran, dass dem Fachmann die molekulare Basis für eine Öffnung mechanosensitiver Kanäle, wie MscS/YggB, in Prokaryonten – zu denen auch die coryneformen Bakterien zählen – durch eine gezielte Mutagenese im Bereich der die Pore des Kanals bildenden Transmembranhelix TM3 bekannt ist. Unbestritten ist ferner, dass den einschlägig tätigen Fachkreisen die für den Erhalt solcher GOF-Mutanten erforderlichen Techniken geläufig sind.

Trotz dieser Kenntnis findet sich in der NK36 aber keine Anregung dafür, in der TM3 des MscS/YggB-Kanals von coryneformen Bakterien nach entsprechenden GOF-Mutanten zu suchen, um auf diese Weise den Glutamat-Ausstrom zu erhöhen. Die Angabe in NK36, dass GOF-Mutanten während ihrer Expression dazu neigen, das Bakterienwachstum zu verlangsamen oder gar zu stoppen, führt eher dazu, dass der Fachmann bei der fermentativen Herstellung von Glutamat in coryneformen Bakterien auf solche Mutanten verzichtet, da eine fermentative Glutamat-Produktion stets ein ausreichendes Zellwachstum voraussetzt (vgl. NK36, S. 436, re. Sp., dritter Abs., letzter Satz). Das Fehlen einer Anregung, die die pa-

tentgemäße *yggB*-Mutante nahelegt, erklärt sich – wie auch schon bei den zuvor erörterten Druckschriften NK15 bis NK17 – ferner damit, dass die NK36 die darin beschriebenen GOF-Mutanten weder mit einem Glutamat-Ausstrom in Verbindung bringt, noch eine erhöhte Aminosäureproduktion zum Thema hat. Dies verwundert im Übrigen nicht weiter, da mechanosensitiven Kanälen, wie *MscL* und *MscS/YggB*, im Stand der Technik ausschließlich eine wesentliche Rolle zum Schutz der Bakterien vor einem hypoosmotischen Schock und damit eine Art Schutzfunktion zugeschrieben wird, aber keine Rolle als Aminosäure-Exporter (vgl. NK34, S. 163, Abstract).

1.3.5 Druckschrift NK38

Aus diesem Grund führt auch eine zusätzliche Berücksichtigung der Druckschrift NK38 zu keinem anderen Ergebnis.

Denn auch in der NK38 geht es darum, Bakterien nach einem hypoosmotischen Schock vor der Lyse zu schützen, indem die Kanalöffnungsschwelle eines mechanosensitiven Efflux-Kanals in *E. coli* gesenkt wird. Der einzige Unterschied zur Lehre der NK36 besteht darin, dass die Autoren der NK38 ihr Augenmerk nicht auf den *MscS/YggB*-Kanal sondern auf den mechanosensitiven *MscL*-Kanal in *E. coli* richten. Die Autoren der NK38 berichten davon, dass sie eine Substitution des in der Transmembranhelix TM1 von *MscL* in *E. coli* lokalisierten Glycins in der Position 22 durch 19 übliche Aminosäuren durchgeführt und dabei sowohl das Zellwachstum als auch das Kanalöffnungsverhalten untersucht haben (vgl. NK38, S. 1961, li. Sp., erster Abs., Sätze eins bis drei von unten i. V. m. S. 1968, li. Sp., zweiter Abs., erster und zweiter Satz). Dabei hat sich gezeigt, dass bei einem Austausch des Glycins in der Position 22 durch hydrophile Reste wie Threonin (G22T) ein im Vergleich zum Wildtyp-*MscL* niedrigerer Druck zum Öffnen des Kanals notwendig ist, der mit dem zum Öffnen des *MscS/YggB*-Kanals erforderlichen Druck vergleichbar ist. Diejenige Mutante, bei der das Glycin in der Position 22 durch Lysin (G22K) substituiert wird, öffnet den *MscL*-Kanal sogar noch vor dem *MscS*-Kanal (vgl. NK38, S. 1962, re. Sp., letzter Satz und S. 1964, li. Sp., erster Abs.).

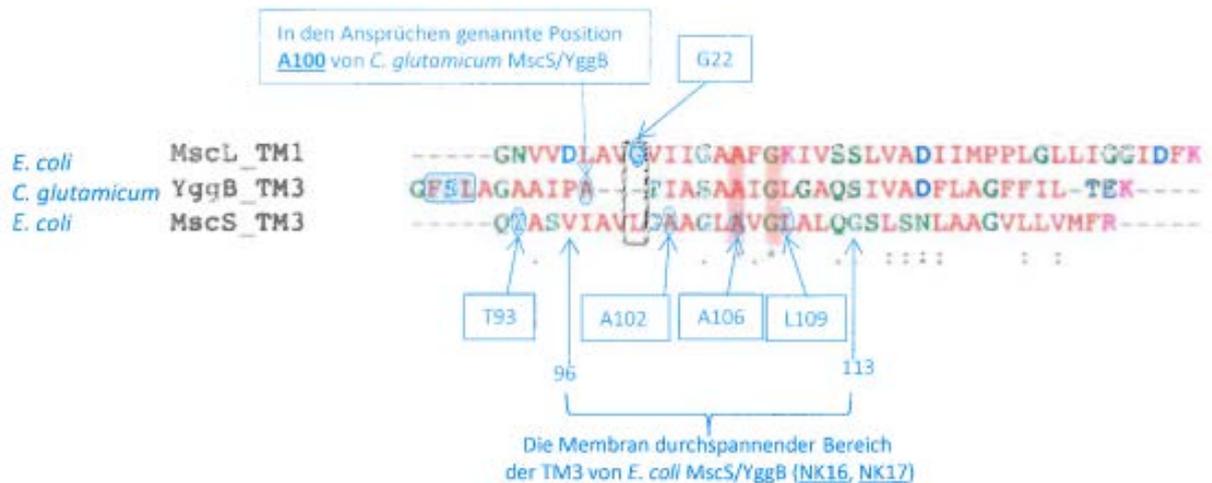
In diesen Ergebnissen der NK38 sieht die Klägerin einen starken Anreiz dafür, im MscS/YggB-Kanal von *Corynebacterium glutamicum* diejenige Aminosäure, die dem Glycin²² in TM1 von MscL in *E. coli* entspreche, durch hydrophilere Aminosäuren wie Threonin zu ersetzen, um so eine schnellere Kanalöffnung ohne hypoosmotischen Schock und damit verbunden einen erhöhten Glutamat-Ausstoß zu erreichen. Die zu Glycin²² korrespondierende Aminosäure im *Corynebacterium glutamicum* ermittle der Fachmann dem klägerseitigen Vortrag zufolge durch einen routinemäßigen Sequenzvergleich (= Alignment), bei dem die Sequenz der Transmembranhelix TM1 im MscL-Kanal von *E. coli* mit der entsprechenden, porrenbildenden Transmembranhelix TM3 im MscS/YggB-Kanal von *Corynebacterium glutamicum* verglichen werde. Somit gelange der Fachmann in naheliegender Weise zu der Erkenntnis, dass das Glycin²² im MscL-Kanal von *E. coli* dem Alanin in der Position 100 des MscS/YggB-Kanals von *Corynebacterium glutamicum* entspreche.

Dieser Auffassung kann sich der Senat nicht anschließen. Die Durchführung eines solchen Sequenzvergleichs ist für den vorliegend definierten Fachmann (siehe Punkt I.4) zweifelsohne möglich. Allerdings fehlt es in der NK38 an der Anregung, ein solches Alignment durchzuführen. Auch sonst enthält die Druckschrift NK38 keine Anregungen, Anstöße oder Hinweise, die das Naheliegen der patentgemäßen yggB-Mutante belegen könnten. Dies liegt darin begründet, dass die NK38 weder einen Querverweis zu coryneformen Bakterien enthält, noch die Öffnung eines Kanals zum Zwecke der Ausschleusung spezieller Aminosäuren wie Glutaminsäure beschreibt.

1.4 Alignments der NK54

Selbst unter der hypothetischen Annahme, dass der Fachmann Sequenzabschnitte aus *E. coli* betreffend die Transmembranhelix TM3 des MscS/YggB-Kanals oder die Transmembranhelix TM1 des MscL-Kanals mit dem Sequenzabschnitt aus der Transmembranhelix TM3 im MscS/YggB-Kanal von *Corynebacterium glutamicum* vergleicht, führt ein solcher Sequenzvergleich vorliegend nicht zum Gegenstand des geltenden Patentanspruchs 1 gemäß Hauptantrag.

Die Klägerin hat mit dem Dokument NK54 das Ergebnis eines solchen Vergleichs vorgelegt, welcher nachfolgend wiedergegeben ist:



Daraus ergibt sich auf den ersten Blick, dass das Bakterium *E. coli* weder im MscL-Kanal noch im MscS/YggB-Kanal an der Aminosäureposition 100 – an der sich im *Corynebacterium glutamicum* das patentgemäß mutierte Alanin befindet – ein Alanin enthält. In *E. coli* befindet sich an dieser Stelle in der TM1 des MscL-Kanals ein Leucin (L) und in der TM3 des MscS/YggB-Kanals ist an dieser Stelle ein Isoleucin (I) zu finden. Eine direkte Übertragbarkeit der im Bakterium *E. coli* identifizierten GOF-Mutanten auf das Bakterium *Corynebacterium glutamicum* erweist sich mangels ausreichender Sequenzhomologie damit als fragwürdig. Ein weiterer Aspekt, der gegen eine einfache Übertragung von GOF-Mutanten in *E. coli* auf das *Corynebacterium glutamicum* spricht, ist die Tatsache, dass das *Corynebacterium glutamicum* im Bereich vor der TM3 des MscS/YggB-Kanals zusätzliche Aminosäuren in Form des Motivs „GFSLA“ enthält, die – jedenfalls dem Alignment NK54 zufolge – sowohl vor der TM1 des MscL-Kanals als auch vor der TM3 des MscS/YggB-Kanals von *E. coli* fehlen. Dies macht deutlich, dass die exakte Bestimmung desjenigen Aminosäureabschnitts, der die TM3-Pore im MscS/YggB-Kanal der verschiedenen Bakterien definiert, eine exakte Analyse der Proteinstruktur der Pore voraussetzt.

Diese Problematik spiegelt sich auch im Stand der Technik wider: Den Angaben in der NK15 zufolge wird der Bereich der porenbildenden Transmembranhelix TM3 von *E. coli* durch die Aminosäuren 94 bis 117 bestimmt (vgl. NK15, S. 37, Fig. 1D). In NK17 werden hierfür die Aminosäurereste 96 bis 113 angegeben (vgl. NK17, S. 3059, li. Sp., zweiter Abs., letzter Satz) und in NK34 definierten die Aminosäuren in den Positionen 90 bis 112 die TM3-Pore des MscS/yggB-Kanals von *E. coli* (vgl. NK34, S. 164, Figur 1c mit Text).

Ein Alignment kann ungeachtet dessen, wie in NK54 gezeigt, erstellt werden, um die Positionen bekannter GOF-Mutanten in der TM1 und/oder TM3 von *E. coli* mit den entsprechenden Positionen in der TM3 des MscS/YggB-Kanals von *Corynebacterium glutamicum* zu vergleichen, zumal ein solches Vorgehen, wie die Druckschrift NK40 belegt, zum allgemeinen Können und Wissen des Fachmanns gehört (vgl. NK40, S. 66, Titel i. V. m. Inhaltsverzeichnis und S. 83, Fig. 11). Fraglich ist jedoch, wieviel Aussagekraft ein solches Alignment besitzt.

Im vorliegenden Fall führt das Alignment NK54 u. a. zu dem Ergebnis, dass das *Corynebacterium glutamicum* keine entsprechende Aminosäure für das aus NK38 bekannte Glycin²² in der TM1 des MscL-Kanals von *E. coli* enthält. Die Klägerin argumentiert, dass sich der Fachmann in einem Fall wie diesem an den Resten von *Corynebacterium glutamicum* orientiere und die Positionen links und rechts von der Aminosäurelücke für eine entsprechende Mutation im *Corynebacterium glutamicum* auswähle, was unausweichlich zu den Resten Alanin¹⁰⁰ und Threonin¹⁰¹ führe.

Diese Argumentation vermag aus zweierlei Gründen nicht zu greifen:

Gegen ein solches Vorgehen spricht zum einen, dass in der Druckschrift NK38 eine Übertragung der darin gelehnten GOF-Mutante an der Position des Glycins²² in *E. coli* auf ein anderes Bakterium nicht vorgesehen ist. Zum anderen setzt die von der Klägerin vorgeschlagene Vorgehensweise voraus, dass der Fachmann die Verlagerung der GOF-Mutante Glycin²² in der TM1 des MscL-Kanals von *E. coli* auf die Position Alanin¹⁰⁰ bzw. Threonin¹⁰¹ in der TM3 des MscS/YggB-Kanals von

Corynebacterium glutamicum mit der Erfolgserwartung verbindet, auf diese Weise die Durchlässigkeit des MscS/YggB-Kanals im *Corynebacterium glutamicum* erhöhen und so die Glutamatproduktion verbessern zu können. Eine solche Erfolgserwartung vermittelt der vorliegend erörterte Stand der Technik aus den bereits zuvor genannten Gründen allerdings an keiner Stelle.

Die übrigen, im zitierten Stand der Technik genannten GOF-Mutanten, wie die Mutanten T93R, A102P, A106 und L109S (vgl. NK15, NK17 und NK36), liegen im Bereich oder nahe der Transmembranhelix TM3 des MscS/YggB-Kanals von *E. coli*. Der diesbezügliche, in NK54 ebenfalls dargestellte Sequenzvergleich betreffend die TM3 von *E. coli* mit der TM3 des *Corynebacterium glutamicum* macht allerdings deutlich, dass von den im Bakterium *E. coli* nachgewiesenen Mutanten keine in einer Position liegt, die der Position 100 bzw. 111 im *Corynebacterium glutamicum* entspricht. Auch die im Patentanspruch 1 nach Hauptantrag vorgesehene Art der Mutation, wonach Alanin durch ein Threonin bzw. Valin ausgetauscht wird, rückt das Alignment nicht in das Blickfeld des Fachmanns. In Anbetracht dessen liefert ein Alignment im vorliegenden Fall keine Informationen, die in die patentgemäße Richtung weisen.

2. Der gemäß Hauptantrag verteidigte erteilte Patentanspruch 1 hat somit Bestand. Mit ihm haben auch die darauf rückbezogenen, vorteilhafte Ausführungsformen des Patentanspruchs 1 betreffenden Patentansprüche 2 bis 5 Bestand.

Mit der vorliegenden Nichtigkeitsklage wird ferner das im nebengeordneten Patentanspruch 6 beschriebene coryneforme Bakterium, sowie die in den beiden nebengeordneten Patentansprüchen 11 und 12 beschriebenen Verfahren angegriffen, bei denen es sich im Falle des erteilten Patentanspruchs 11 um ein Verfahren zur Herstellung von Glutaminsäure in coryneformen Bakterien und im Falle des erteilten Patentanspruchs 12 um ein Verfahren zur Herstellung eines Würzmittels handelt. Nachdem allerdings sowohl das coryneforme Bakterium als auch die patentgemäßen Verfahren ausschließlich durch das im erteilten Patentanspruch 1 beschriebene mutierte yggB-Gen gekennzeichnet werden, gelten die vorangegan-

genen Ausführungen zum erteilten Patentanspruch 1 für die nebengeordneten Patentansprüche 6, 11 und 12 hier entsprechend, so dass auch die Gegenstände dieser Patentansprüche auf einer erfinderischen Tätigkeit beruhen.

Mit dem Patentanspruch 6 haben auch die darauf rückbezogenen, mit der vorliegenden Nichtigkeitsklage gleichfalls angegriffenen und vorteilhafte Ausführungsformen des Patentanspruchs 6 betreffenden Patentansprüche 8 bis 10 Bestand.

III.

Die Kostenentscheidung beruht auf § 84 Abs. 2 PatG i. V. m. § 91 Abs. 1 ZPO.

Die Entscheidung über die vorläufige Vollstreckbarkeit folgt aus § 99 Abs. 1 PatG i. V. m. § 709 Satz 1 und Satz 2 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 Dr. Münzberg Hermann Dr. Wismeth Dr. Freudenreich

Pr