

A		B		C	X
---	--	---	--	---	---

Aktenzeichen: T 0865/91 - 3.3.2
Anmeldenummer: 86 114 931.8
Veröffentlichungs-Nr.: 0 221 493
Klassifikation: C12N 5/00
Bezeichnung der Erfindung: Verwendung von Gyrasehemmern zur
Dekontamination von Mycoplasma-infizierten
Zellkulturen

E N T S C H E I D U N G
vom 28. September 1993

Anmelder: BAYER AG
Patentinhaber: -
Einsprechender: -

Stichwort: Dekontamination von Mycoplasma/BAYER
EPÜ: Art. 56
Schlagwort: "Erfinderische Tätigkeit (ja)" - "Nicht naheliegende Lösung"

Leitsatz
Orientierungssatz



**Europäisches
Patentamt**

**European
Patent Office**

**Office européen
des brevets**

Beschwerdekammern

Boards of Appeal

Chambres de recours

Aktenzeichen: T 0865/91 - 3.3.2

E N T S C H E I D U N G
der Technischen Beschwerdekammer 3.3.2
vom 28. September 1993

Beschwerdeführer: BAYER AG
D - 51368 Leverkusen (DE)

Vertreter:

Angefochtene Entscheidung: Entscheidung der Prüfungsabteilung des Europäischen Patentamts vom 28. Juni 1991, mit der die europäische Patentanmeldung Nr. 86 114 931.8 aufgrund des Artikels 97 (1) EPÜ zurückgewiesen worden ist.

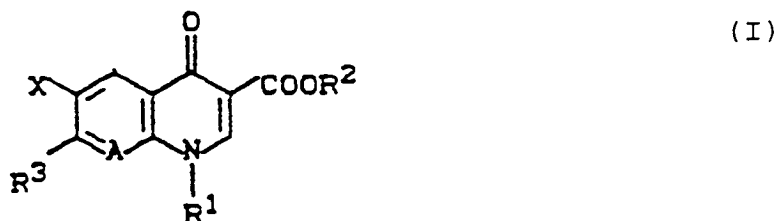
Zusammensetzung der Kammer:

Vorsitzender: A.J. Nuss
Mitglieder: U.M. Kinkeldey
C. Holtz

Sachverhalt und Anträge

I. Die europäische Patentanmeldung Nr. 86 114 931.8 (Veröffentlichungsnummer 0 221 493) wurde von der Prüfungsabteilung zurückgewiesen. Der Entscheidung lagen die ursprünglich eingereichten Ansprüche 1 bis 13 zugrunde. Anspruch 1 lautet:

"1. Verwendung von Chinolon- und 1,8-Naphthyridoncarbonsäuren der Formel (I)

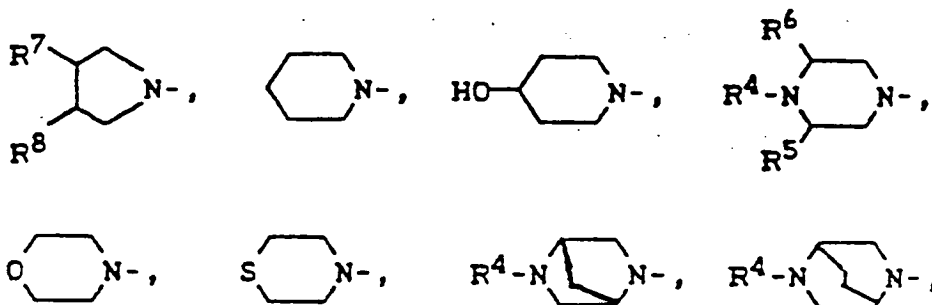


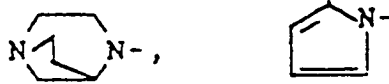
in welcher

R¹ für Methyl, Ethyl, Propyl, Isopropyl, Cyclopropyl, Vinyl, 2-Hydroxyethyl, 2-Fluorethyl, Methoxy, Amino, Methylamino, Dimethylamino, Ethylamino, Phenyl, 4-Fluorphenyl, 2,4-Difluorphenyl,

R² für Wasserstoff, Alkyl mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen, (5-Methyl-2-oxo-1,3-dioxol-4-yl)-methyl,

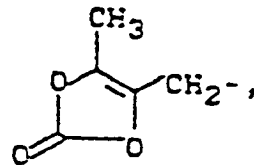
R³ für Methyl oder eine cyclische Aminogruppe wie





steht, worin

R⁴ für Wasserstoff, Alkyl mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen, 2-Hydroxyethyl, Allyl, Propargyl, 2-Oxopropyl, 3-Oxobutyl, Phenacyl, Formyl, CFCl₂-S-, CFCl₂-SO₂-, CH₃O-CO-S-, Benzyl, 4-Aminobenzyl,



R⁵ für Wasserstoff, Methyl,

R⁶ für Wasserstoff, Alkyl mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen, Phenyl, Benzyloxmethyl,

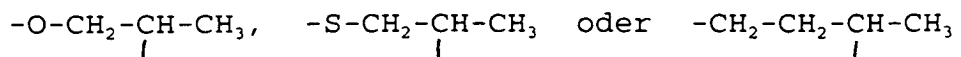
R⁷ für Wasserstoff, Amino, Methylamino, Ethylamino, Aminomethyl, Methylaminomethyl, Ethylaminomethyl, Dimethylaminomethyl, Hydroxy, Hydroxymethyl,

R⁸ für Wasserstoff, Methyl, Ethyl oder Chlor steht,

X für Fluor, Chlor oder Nitro und

A für N oder C-R⁹ steht, worin

R⁹ für Wasserstoff, Halogen wie Fluor oder Chlor, Methyl oder Nitro steht oder auch gemeinsam mit R¹ eine Brücke der Struktur

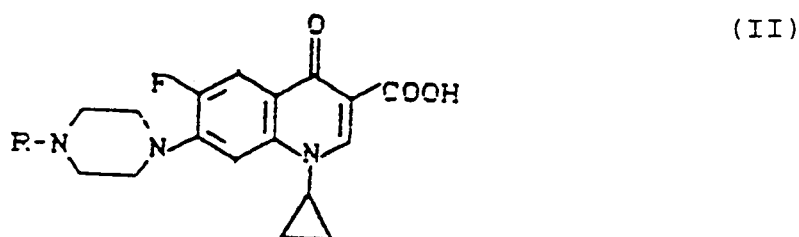


bilden kann,

zur Dekontamination von Mycoplasma-infizierten Zellkulturen."

Ein weiterer unabhängiger Anspruch ist Anspruch 3, der sich auf die Verwendung von

1-Cyclopropyl-6-fluor-1,4-dihydro-4-oxo-7-piperazinochinolin-3-carbonsäuren der Formel II



in der

R Wasserstoff, Methyl, Ethyl oder Hydroxyethyl bedeutet,

und von ihren pharmazeutisch verwendbaren Säureadditionssalzen und Hydraten zur Dekontamination von Mykoplasmen-infizierten Zellkulturen

bezieht.

Alle weiteren Ansprüche stellen Unteransprüche zu diesen beiden Ansprüchen dar und beziehen sich auf besondere Ausführungsformen.

II. Die Prüfungsabteilung gründete die Zurückweisung der Anmeldung darauf, daß es für den Fachmann naheliegend gewesen sei, Chinolon- und 1,8-Naphthyridoncarbonsäuren zur Dekontamination von Mykoplasma-infizierten Zellkulturen einzusetzen. Die Verwendung von Chinolon- und 1,8-Naphthyridoncarbonsäuren schiene daher die logischste Konsequenz der vom Stand der Technik vermittelten Lehre. Somit seien die Erfordernisse des Artikels 56 EPÜ durch die Ansprüche 1 bis 4, 7 und 9 bis 12 nicht erfüllt.

Das gleiche gelte auch für die Ansprüche 5, 6, 8 und 13, die ein Gemisch aus Chinolon- bzw. 1,8-Naphthyridon-carbonsäuren und Tiamulin und/oder Minocyclin betreffen, da die Verwendung dieser Substanzen für diesen Zweck bereits im Stand der Technik vorgeschlagen worden sei und als Mittel zur Bekämpfung von Mykoplasmen in Zellkulturen bekannt gewesen sei. Die Einwände wurden insbesondere auf folgende Dokumente gestützt:

- (1) J.Imm. Meth. 1988, 109, 17 - 25
(nachveröffentlicht)
- (2) The Mykoplasmas, 1985, Vol. IV, 353 - 390,
Academic Press.
- (4) J. Inher, Metab. Dis., 1986, 9, 398 - 399
(nachveröffentlicht)
- (7) Fortschritte der antimikrobiellen und
antineoplastischen Chemotherapie, 1984, Band 3 -
5, 629 - 632
- (8) Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1983, 23
(3), 509 - 511
- (9) Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1983, 23
(5), 641 - 648
- (10) European Journal of Clinical Microbiology, 1984,
3 (4), 344 - 346
- (11) European Journal of Clinical Microbiology, 1983,
2 (5), 479 - 480
- (12) Exper. Cell Research 1984, 152, 565 - 570

- III. Die Beschwerdeführerin legte gegen diese Entscheidung Beschwerde ein, zahlte die Beschwerdegebühr und begründete die Beschwerde.
- IV. In der Beschwerdebegründung hat die Beschwerdeführerin im wesentlichen folgendes vorgetragen:

Gegenstand der zurückgewiesenen Ansprüche sei nicht die Verwendung von Chinolon- und 1,8-Naphthyridoncarbonsäuren im allgemeinen zum Zwecke der Dekontamination Mykoplasma-infizierter Zellkulturen. Vielmehr erfasse Anspruch 1 eine ausgewählte Gruppe von Substanzen dieser Klasse gemäß der allgemeinen Formel (I), wenngleich diese Gruppe auch umfangreich sei. Dieser Umfang korrespondiere jedoch mit der erfinderischen Qualität der anmeldungsgemäß vermittelten technischen Lehre. Es gäbe zwar eine große Anzahl von Veröffentlichungen, die die Wirkung von Chinolon- und 1,8-Naphthyridoncarbonsäuren gegen Mykoplasma sowohl *in vivo* als auch *in vitro* beschreiben; diese Tatsache sei jedoch bei der Suche nach einem sicheren und einfachen Verfahren zur Dekontamination von Zellkulturen nicht hilfreich. Insbesondere hätte den Fachmann am Prioritätstag nichts motivieren können, gerade die anmeldungsgemäßen Gyrasehemmer aus der Fülle der potentiell zur Verfügung stehenden *in vivo* und/oder *in vitro* gegen Mykoplasmen wirksamen antibiotischen Mittel auszuwählen. Der Schluß, daß *in vitro* und/oder *in vivo* gegen Mykoplasmen wirksame antibakterielle Mittel auch in Zellkulturen diese Wirkung entfalten und darüber hinaus die Zellkultur nicht schädigen, sei nicht zulässig. Gemäß der Aussage einer Kapazität auf dem Gebiet der Zellkulturen in Dokument (2) stelle selbst noch im Prioritätsjahr der vorliegenden Anmeldung nach Meinung der Fachwelt die beste Methode zur Bekämpfung von Mykoplasmenbefall einer Zellkultur die Verwerfung dieser Zellkultur dar, da schon die Vielzahl von bekannt gewordenen Methoden zum Eliminieren von Mykoplasmen aus

Zellkulturen zeige, daß viele dieser Methoden unzuverlässig seien. Ein weiteres Indiz dafür, daß es zur Entwicklung des anmeldungsgemäßen Verfahrens einer erfinderischen Tätigkeit bedurfte, wird in der Tatsache gesehen, daß nach der Einführung eines Chinoloncarbon-säure-Derivats zum Zwecke der Dekontaminierung von Zellkulturen in der Literatur das Problem der Kontamination kein Thema mehr zu sein schien, das weiterer Publikationen bedurft hätte.

Die Zurückweisung der Ansprüche 5, 6, 8 und 13 sei nicht gerechtfertigt, da es sich um Variationen des in den Hauptansprüchen formulierten Verfahrens handle.

- V. Die Beschwerdeführerin beantragt, die Zurückweisungsentscheidung aufzuheben und ein Patent auf die ursprünglich eingereichten Ansprüche 1 bis 13 zu erteilen.

Entscheidungsgründe

1. Die Beschwerde ist zulässig.
2. *Relevanter Stand der Technik*

Von den insgesamt 13 im vorliegenden Verfahren befindlichen Dokumenten, von denen 9 im Recherchenbericht genannt wurden und 4 weitere von der Beschwerdeführerin während des Prüfungsverfahrens eingeführt wurden, erachtet die Kammer die oben in Paragraph II zitierten, sowie das folgende Dokument als relevant:

- (13) Journal of Antimicrob. Chemother., 1985, 15 (6),
787 - 789

Zwar sind die Dokumente (1) und (4) nachveröffentlicht, die Kammer mißt ihnen jedoch gutachtliche Bedeutung für die Frage der erfinderischen Tätigkeit bei.

3. *Neuheit (Art. 54 EPÜ)*

Keine der Entgegenhaltungen betrifft die Verwendung von Chinolon- und 1,8-Naphthyridoncarbonsäuren zur Dekontamination Mykoplasmen-infizierter Zellkulturen. Der Gegenstand der unabhängigen Ansprüche 1 und 3 erfüllt daher, wie auch von der Prüfungsabteilung anerkannt, die Erfordernisse des Artikels 54 EPÜ.

4. *Erfinderische Tätigkeit (Art. 56 EPÜ)*

4.1 Die Anmeldung betrifft die Verwendung von Chinolon- und 1,8-Naphthyridoncarbonsäuren der Formel (I) (Anspruch 1) oder der Formel (II) (Anspruch 3) zur Dekontamination von Mykoplasma-infizierten Zellkulturen.

4.2 Nach Auffassung der Kammer ist der nächstkommende Stand der Technik durch Dokument (12) repräsentiert, in dem die Behandlung von Mykoplasmen-infizierten Gewebekulturen mit den Antibiotika Minocyclin und Tiamutin beschrieben ist. Es wurde ein Verfahren entwickelt, mittels dessen durch aufeinanderfolgende Behandlung der Kulturen während eines Zeitraums von drei Wochen und einer nachfolgenden Klonierung der Zellen Mykoplasmen wirksam eliminiert werden können. In diesem Dokument, das ein Jahr vor dem Prioritätszeitpunkt der vorliegenden Anmeldung veröffentlicht wurde, wird die Kontamination von Gewebekulturen durch Mykoplasmen als eines der Hauptprobleme beschrieben, das in der biologischen Grundlagenforschung bei der Verwendung von kultivierten Zellen auftritt. Um diesem Problem näher zu kommen, seien kürzlich schnelle und empfindliche Verfahren entwickelt worden, mit Hilfe derer Mykoplasma-verseuchte Gewebekulturen aufgedeckt

werden können. Der nächste Schritt sei nun eine einfache und wirksame Methode, mit der die kontaminierenden Mykoplasmen aus den Zellkulturen wieder entfernt werden könnten. Zwar seien eine Reihe von Methoden beschrieben, die in der Lage seien, Mykoplasmen zu eliminieren; die effizientesten Methoden dieser Art seien aber essentiell störend im Hinblick auf eine Reihe von physiologischen Zellfunktionen. Auch wenn schon einige Antibiotika als wirksam in der Kontrolle von Mykoplasmen beschrieben seien, entwickelten doch die entsprechenden Stämme leicht Resistenzen gegen die Antibiotika ehe man sie eliminieren kann. Als eine solche wirksame Methode wird sodann die Verwendung der Antibiotika Minocyclin und Tiamutin beschrieben (siehe S. 565, 1. und 2. Absatz). Gemäß einer Tabelle 1 auf Seite 567, ist die Wirkung der beiden Antibiotika in einem Zeitraum von 16 bis 22 Tage nach Beginn der Behandlung der kontaminierten Zellen anderen, bis dahin im Stand der Technik verwendeten Antibiotika, überlegen.

Die Kammer erachtet diese Druckschrift deshalb als den nächstkommenden Stand der Technik, weil hier die Wirkung von Antibiotika bei der Kontrolle von Mykoplasmen-Infektionen bei kontaminierten Zellkulturen beschrieben ist.

- 4.3 Gegenüber diesem Stand der Technik kann die der Anmeldung zugrundeliegende technische Aufgabe darin gesehen werden, weitere Antibiotika zur Verfügung zu stellen, die zur Dekontamination von Mykoplasma-infizierten Zellkulturen verwendet werden können.

Diese Aufgabe wird gemäß der Ansprüche 1 und 3 durch die Verwendung der Verbindungen der Formeln (I) bzw. (II) gelöst. Die in den drei Tabellen wiedergegebenen Ergebnisse der *in vivo* Versuche, wie sie in den

Beispielen 1 bis 3 beschrieben sind, lassen es glaubhaft erscheinen, daß die bestehende Aufgabe tatsächlich gelöst worden ist.

- 4.4 Im folgenden ist die Frage zu beantworten, ob dem Fachmann die Verwendung der beanspruchten Chinolon- und 1,8-Naphthyridoncarbonsäuren zum wirksamen Eliminieren von Mykoplasmen aus Zellkulturen in naheliegender Weise zur Verfügung gestanden hat.

Dokument (12) gibt keinerlei Hinweis darauf, als Alternative zu den dort beschriebenen Antibiotika die beanspruchten Verbindungen für den genannten Zweck zu verwenden. Es stellt sich die Frage, ob der Fachmann aus einer der anderen, im Verfahren befindlichen Druckschriften eine solche Anregung hätte entnehmen können.

- 4.5 Es ist anzunehmen, daß die Fachwelt auf der Suche nach einer Lösung für die oben definierte Aufgabe die Lehre des Dokuments (7) in Betracht gezogen hätte. Dieses Dokument beschreibt die *in vitro*-Aktivität von Gyrasehemmern gegen Mykoplasmen. Verschiedene Mykoplasmenarten sind pathogen für den Menschen, so daß nach therapeutischen Maßnahmen gegen Mykoplasma-Infektionen gesucht wurde. Die Autoren des Dokuments (7) haben daher die neuen Chinolone Norfloxacin, Ofloxacin und Ciprofloxacin auf ihre Wirkung auf Mykoplasmen untersucht und festgestellt, daß sie sich durch ein verbreitertes Spektrum und eine stärkere Aktivität als beispielsweise Nalidixinsäure auszeichnen. Wie die Abbildung 1 auf Seite 630 zeigt, wirken die neuen Nalidixinsäurederivate Norfloxacin, Ofloxacin und Ciprofloxacin bei 25 verschiedenen *Mykoplasma hominis*-Stämmen, wobei Ofloxacin und Ciprofloxacin bereits bei niedrigeren Konzentrationen wirksam sind als Norfloxacin. Der *in vitro* Test wurde so durchgeführt, daß 25 Stämme von *Mykoplasma hominis* frisch isoliert wurden, sodann ein flüssiges Hayflick-Medium,

angereichert mit Arginin, pH 6,8, mit 10^6 Keimen infiziert wurde, wozu der Hemmstoff in fallenden Konzentrationen zugegeben wird und sodann bei 37°C drei bis vier Tage anaerob bebrütet wurde (siehe S. 629, Tabelle 1). Die konkrete technische Lehre, die der Fachmann aus dieser Druckschrift entnehmen kann, besteht also darin, daß in einem *in vitro* Ansatz die Wirkung dreier Chinolone auf die Art *Mykoplasma hominis* zum Zwecke einer weiteren klinischen Erprobung zur Bekämpfung von *Mykoplasma hominis*-Infektionen untersucht wurde und eine unterschiedliche Wirkung für die untersuchten Chinolone festgestellt wird.

- 4.6 Auf den ersten Blick mag man aufgrund dieser Lehre zu der von der Prüfungsabteilung gezogenen Schlußfolgerung gelangen, daß die hier *in vitro* gezeigte Wirkung von Chinolonen, wie sie auch unter den Anspruch 1 fallen und in der Beschreibung als bevorzugte Ausführungsbeispiele genannt sind (Seite 5, Zeilen 27 bis 30), in naheliegender Weise vom Fachmann für die Dekontamination von Mykoplasma-infizierten Zellkulturen in Betracht gezogen würden.

Bei genauerem Hinsehen muß man jedoch nach Auffassung der Kammer zu einem anderen Ergebnis kommen. Erstens wird die Wirkung der genannten Chinolone nur auf eine Mykoplasmaart untersucht, die klinische Relevanz hat, nämlich *Mykoplasma hominis*. Da in der Regel nicht bekannt ist, mit welcher Mykoplasmaart Zellkulturen, wie sie in den Labors in der in der Anmeldung beschriebenen Weise verwendet werden, infiziert sind, wäre hier bereits ein erstes Extrapolieren auf gegebenenfalls unbekanntes Mykoplasmenarten notwendig. Zweitens handelt es sich bei den Untersuchungen um *in vitro*-Versuche, die bekanntermaßen nicht notwendigerweise direkt übertragbar sind auf *in vivo*-Versuche. Dies insbesondere dann nicht, wenn, wie in der vorliegenden Anmeldung, die Zellkulturen, die

möglicherweise Mykoplasma-verseucht sind, wertvoll und zu schützen sind, so daß gegebenenfalls toxische Wirkungen auf die Zellkulturen vorher abgeklärt sein müssen. Die Kammer kann daher den Ausführungen der Prüfungsabteilung in der angefochtenen Entscheidung, daß die "Verwendung von Chinolon- und 1,8-Naphthyridoncarbonsäuren ... daher die logischste Konsequenz der vom Stand der Technik vermittelten Lehre" zu sein scheint, nicht folgen.

- 4.7 Die Kammer vermißt weiterhin eine Diskussion durch die Prüfungsabteilung der aus dem Dokument (13) vermittelten Lehre in ihrer Entscheidung. In diesem Dokument wird die *in vitro* Wirkung der Chinolone Ciprofloxacin und Enoxacin (AT-2266) auf Mykoplasmen beschrieben. Die Methode der *in vitro*-Züchtung der Mykoplasmen und der Zugabe zu den Züchtungsmedien von den getesteten Chinolonen entspricht der in Dokument (7) beschriebenen. Die sich aus diesen Versuchen ergebenden Resultate (siehe S. 787, Spalten 1 und 2) vermitteln jedoch die Lehre, daß *Mykoplasma pneumoniae* und *Mykoplasma hominis* verhältnismäßig unempfindlich gegen Ciprofloxacin sind und praktisch resistent gegen Enoxacin (AT-2266), einem Chinolon, das als besonderes Ausführungsbeispiel in der vorliegenden Anmeldung genannt ist (S. 5, Zeile 29 der veröffentlichten Anmeldung). Eine andere Mykoplasmaart, nämlich *Mykoplasma fermentans* hingegen zeigte sich sensitiv gegen Ciprofloxacin und weniger sensitiv gegen Enoxacin (AT-2266). Die Autoren dieser Druckschrift kommen daher zu dem Ergebnis, daß aufgrund ihrer Beobachtungen Chinolone bei der Behandlung von Infektionen mit *Mykoplasma pneumoniae* oder *Mykoplasma hominis* keine Rolle spielen dürften (siehe S. 788, Spalte 2, letzter Absatz). Die technische Lehre dieser jüngeren Druckschrift widerspricht somit den Aussagen in Dokument (7). Die Kammer ist davon überzeugt, daß den Fachmann die Lehre dieser jüngeren Druckschrift von der Idee abbringen würde, Mykoplasmen-infizierte Zellkulturen mit Chinolonen zu

behandeln, und zwar mangels einer vernünftigen Aussicht auf Erfolg. Aufgrund der Diskrepanz zwischen den technischen Lehren der Dokumente (7) und (13) besteht für den Fachmann zumindest eine erhebliche Unsicherheit bezüglich einer aussichtsreichen Verwendung dieser Chinolone zum Eliminieren von Mykoplasmen aus Zellkulturen, so daß es alles andere als naheliegend sein konnte, diese Chinolone für diesen Zweck zu verwenden.

- 4.8 Auf der weiteren Suche nach nützlicher Information für die zu lösende Aufgabe würde der Fachmann weiterhin die technische Lehre des Dokuments (10) in Betracht ziehen. Sie beschreibt die *in vitro* Wirksamkeit von Ciprofloxacin gegen klinische Isolate von *Mykoplasma hominis*. Wie die Tabelle 4 auf Seite 345 zeigt, ist Ciprofloxacin etwa vergleichbar wirksam gegen *Mykoplasma hominis* wie ein herkömmliches Antibiotikum, nämlich Oxytetracyclin. Die *in vitro* Aktivität von Ciprofloxacin wurde weiterhin gegen *Chlamydia trachomatis* und *Ureaplasma urealyticum* getestet und die Untersuchung kommt abschließend zu dem Resultat, daß die *in vitro* Aktivität von Ciprofloxacin gegen die genannten Erreger und *Mykoplasma hominis* ermutigend seien. Klinische Studien unter Verwendung dieser Antibiotika, im Besonderen im Bereich der sexuell übertragenen Krankheiten, seien angezeigt (siehe S. 345, Spalte 2, letzter Absatz). Diese positive Beurteilung der Wirkung von Ciprofloxacin ist im Zusammenhang der Gesamtoffenbarung dieser Druckschrift zu lesen, die die Suche nach einem Antibiotikum beschreibt, das gegen die Infektion durch mehrere Erreger wirkt. In diesem Zusammenhang sind die mit Ciprofloxacin erzielten Ergebnisse ermutigend. Der Offenbarungsgehalt dieser Druckschrift entspricht somit dem des Dokuments (7) und die Schlußfolgerungen, die der Fachmann ziehen wird, im Sinne einer Lösung der oben gestellten Aufgabe, werden dieselben sein wie dort (siehe oben Punkt 4.5).

- 4.9 Einer der Autoren des Dokuments (11) ist derselbe wie der des Dokuments (7). Er beschreibt die Wirkung von Norfloxacin gegen *Mykoplasma hominis*, dessen Wirkung im Vergleich mit den später in Dokument (7) hinzugenommenen anderen Chinolonen geringer ist. Die technische Lehre dieses Dokuments liegt somit weiter ab.
- 4.10 Dokument (8) beschreibt die Wirkung von Ofloxacin auf *Mykoplasma pneumoniae*. Es handelt sich wiederum um *in vitro* Versuche gegen nur diese eine Mykoplasmenart und es wurde festgestellt, daß das *in vitro*-Spektrum seiner Wirksamkeit besser war als das anderer Chinolone und Tetracycline (siehe S. 509, Abstract). Die technische Lehre dieses Dokuments entspricht somit derjenigen von Dokument (7) (siehe oben Punkt 4.5), so daß auf die dort von der Kammer gezogene Schlußfolgerung auf Vorliegen einer erfinderischen Tätigkeit hingewiesen werden kann.
- 4.11 Die technische Lehre des Dokuments (9) zeigt einen Vergleich der *in vitro* Aktivität eines Chinolonderivats, nämlich des AT-2266 (Enoxacin) mit derjenigen von Norfloxacin. Aufgrund der Tatsache, daß diese beiden Vertreter der Chinolone im weitesten Sinne in mancher Beziehung verschieden sind, jedoch eine gemeinsame δ -Pyridon- β -Carbonsäurestruktur aufwiesen, scheine diese wesentlich für die antibakterielle Aktivität zu sein (siehe S. 641, linke Spalte, 2. Satz). Diese Erkenntnis gibt dem Fachmann nicht mehr technische Information an die Hand, als bereits in Dokument (7) enthalten ist.
- 4.12 Dokument (2), das im Prioritätsjahr veröffentlicht wurde, befaßt sich in einem umfangreichen Übersichtsartikel mit dem Problem der Mykoplasmen in Zellkulturen deren Wirkung auf Zellkulturen, Methoden zu ihrer Feststellung und Methoden ihrer Eliminierung (siehe Inhaltsverzeichnis auf Seite 353).

Wie insbesondere auf Seite 383 in Kapitel IV ausgeführt wird, hatten die Autoren von 54 Dokumenten Kenntnis, die sich mit dem Eliminieren von Mykoplasmen aus Zellkulturen befassen. Die Autoren vermerken wörtlich "This number tells us something". Sie fahren weiter fort, daß diese Tatsache impliziere, daß viele Methoden unzuverlässig seien. Es impliziere weiterhin, daß bestimmte Techniken zwar auf manche aber nicht auf alle Mykoplasmenarten und -stämme anwendbar seien. Es gebe drei Fragen, die sich der Zellbiologe stellen müsse, wenn er das Eliminieren von Mykoplasmen aus Zellkulturen ins Auge fasse, nämlich:

1. Ist das ausgewählte Verfahren zuverlässig und wirksam?
2. Wird sich die Zellkultur als Folge des Verfahrens ändern?
3. Sind der Zeit- und sonstige Aufwand, der nötig ist, die Sache wert?

Es wird sodann empfohlen, daß, wann immer möglich, es viel leichter sei, die infizierte Kultur zu verwerfen. Die Kammer schließt aus alledem, daß zur Zeit der Priorität der vorliegenden Anmeldung der Fachmann mit einer Fülle von mehr oder weniger zufriedenstellenden Anregungen für das Eliminieren von Mykoplasmen aus Zellkulturen konfrontiert war. Von einer "logischsten Konsequenz" wie es die Prüfungsabteilung in ihrer Entscheidung ausgedrückt hat, von der vom Stand der Technik vermittelten Lehre auf die Verwendung von Chinolon- und 1,8-Naphthyridoncarbonsäuren für diesen Zweck überzugehen, scheint die Auffassung der Fachleute zum Prioritätszeitpunkt weit entfernt gewesen zu sein.

- 4.13 Die sonstigen, im Verfahren vorliegenden Druckschriften liegen weiter ab von den hier diskutierten und beschreiben in allgemeiner Form die Wirksamkeit unterschiedlicher Antibiotika auf Mykoplasmen.
- 4.14 Die Prüfungsabteilung hat in ihrer Entscheidung unter den Punkten 9 und 10 argumentiert, daß aus den Dokumenten (1)

bis (6) zu entnehmen sei, daß ein Bedürfnis nach einer wirksamen Methode zur Dekontamination von Mykoplasma-infizierten Zellkulturen bestand und sie deshalb der Meinung sei, daß es für den Fachmann naheliegend gewesen sei, Chinolon- und 1,8-Naphthyridoncarbonsäuren zur Dekontamination von Mykoplasma-infizierten Zellkulturen einzusetzen. Da die Prüfungsstelle somit in ihre Meinungsbildung auch die beiden nachveröffentlichten Dokumente (1) und (4) miteinbezieht, sieht sich die Kammer veranlaßt, die Aussagen und technischen Lehren dieser Dokumente im Sinne einer gutachtlichen Stellungnahme zu analysieren und ihren Einfluß auf die Beantwortung der Frage nach der erfinderischen Tätigkeit zu untersuchen.

- 4.15 Dokument (1) wurde 1988 veröffentlicht, also drei Jahre nach dem Prioritätszeitpunkt der vorliegenden Anmeldung. Der einleitende Teil der Veröffentlichung (Seite 17, linke Spalte) beginnt mit der Feststellung, daß das ungelöste, ernste Problem der Mykoplasmainfektion von Zellkulturen in der Immunologie und anderen Bereichen der Zellbiologie dringend einen Durchbruch erfordere, nicht nur im Abtöten der Mykoplasmen, sondern ebenso im Retten der oft äußerst wertvollen Zelllinien und deren funktionaler Charakteristika. Es sei ein breites Spektrum an Verfahren bekannt, um Mykoplasmenkontaminationen zu eliminieren, einschließlich von *in vivo* Passagen von Tumorzelllinien, der gleichzeitigen Kultivierung von infizierten Zellen mit Makrophagen mit oder ohne Antibiotika, das Induzieren chromosomaler Schäden in den Mykoplasmen, der Supplementierung des Kulturmediums mit spezifischen Antiseren gegen Mykoplasmen, Antibiotikabehandlung und andere. Es wird festgestellt, daß einige Autoren immer noch empfehlen, die infizierten Zellen zu verwerfen wann immer es möglich sei, da alle genannten Methoden nicht effektiv und nicht praktikabel seien und in jedem Fall die Eigenschaften der Zellen beeinflussen,

wenn sie nicht sogar toxisch seien. Zwar wird im folgenden die Verwendung von Antibiotika zur Kontrolle der bakteriellen Kontamination als noch zuverlässigste Methode beschrieben, wobei Antibiotika wie Tetracycline, Kanamycin, Lincomycin, Erythromycin usw. empfohlen werden (Seite 17, rechte Spalte übergreifend auf Seite 18 linke Spalte). Auch die Verwendung von Minocyclin und Tiamutin ist beschrieben. Da bei dieser Behandlungsmethode jedoch das Klonieren der Zellen im Anschluß an die Behandlung nötig sei, werden diese Methoden als unzulänglich beschrieben. Es wird sodann die Verwendung von Ciprofloxacin geprüft. Zwar wird erwähnt, unter Bezug auf Dokument (10), daß das für Menschen pathogene *Mykoplasma hominis* bereits *in vitro* als empfindlich für Ciprofloxacin beschrieben sei. Die Verwendung von Ciprofloxacin für die Behandlung von **Zellkulturen**, die mit Mykoplasmen infiziert sind, sei jedoch noch nicht beschrieben gewesen.

- 4.16 Die Kammer hält es für bemerkenswert, daß drei Jahre nach dem Prioritätszeitpunkt der vorliegenden Anmeldung eine ausführliche Veröffentlichung über die Verwendung von Ciprofloxacin zum Eliminieren von Mykoplasmen aus Zellkulturen publiziert wird. Die Kammer deutet dies als Indiz dafür, daß für die Fachwelt diese Verwendung keineswegs selbstverständlich war. Wie insbesondere aus dem Diskussionsteil der Veröffentlichung hervorgeht (insbesondere Seite 24, rechte Spalte, Absatz 2 ff. übergreifend auf Seite 25, linke Spalte), sind bei der Anwendung des Ciprofloxacins auf **Zellkulturen** besondere Rücksichten zu nehmen. Beispielsweise muß der Einfluß von Ciprofloxacin auf die Zellteilungsrate getestet werden; sodann sind andere Zellaktivitäten unter dem Einfluß von Ciprofloxacin zu überprüfen, beispielsweise war die Antikörpersekretion bei Maus-Hybridomzellen nach einer bestimmten Behandlungsweise nicht beeinflusst. Weiterhin schien die Ciprofloxacin-Behandlung die Interleukin-

sekretion nicht zu beeinflussen. Auch die Zellteilung, induziert durch andere Agenzien, scheint nicht beeinträchtigt zu sein. Lediglich höhere Dosen von Ciprofloxacin scheinen teilweise die Vermehrungsrate der menschlichen T-Zellen in diesem komplexen Testsystem zu reduzieren. Alles in allem führen sämtliche, in diesem nachveröffentlichten Dokument beschriebenen, Versuche zu dem Resultat, daß Ciprofloxacin geeignet sei, um Mykoplasmen- Infektionen aus Zellkulturen zu entfernen, wobei diese Methode als leichter und wirksamer als früher angewandte Methoden bezeichnet wird (Seite 25, linke Spalte, Absatz 3).

4.17 In Dokument (4) wird bemerkenswerter Weise noch im Jahre 1986, also einem Jahr nach Prioritätszeitpunkt, angesichts des ungelösten Problems des Entfernens von Mykoplasmen aus Zellkulturen vorgeschlagen, eine Kombination von vier konventionellen Antibiotika mit Trypsin zu verwenden (siehe S. 398, 2. Absatz).

4.18 Aus alledem folgt, daß es einer erfinderischen Tätigkeit bedurfte, um zur Lehre des Anspruchs 1 zu gelangen. Da der an sich unabhängige Anspruch 3 eine besondere Ausführungsform der in Anspruch 1 genannten Formel betrifft, gilt gleiches für diesen Anspruch.

Die erfinderische Tätigkeit aller anderen abhängigen Ansprüche wird mitgetragen durch die der Ansprüche 1 und 3.

Entscheidungsformel

Aus diesen Gründen wird entschieden:

1. Die angefochtene Entscheidung wird aufgehoben.
2. Das Patent wird erteilt auf der Grundlage der ursprünglich eingereichten Unterlagen.

Der Geschäftsstellenbeamte:

Der Vorsitzende:

P. Martorana

A. Nuss

