

Interner Verteilerschlüssel:

- (A) Veröffentlichung im ABl.
(B) An Vorsitzende und Mitglieder
(C) An Vorsitzende

E N T S C H E I D U N G
vom 15. März 1996

Beschwerde-Aktenzeichen: T 0850/92 - 3.3.4
Anmeldenummer: 86109103.1
Veröffentlichungsnummer: 0220379
IPC: C12N 5/02
Verfahrenssprache: DE

Bezeichnung der Erfindung:

Verwendung von Glutamin in Form seiner Di- und Tripeptide im
Nährmedium für Zellkulturen

Patentinhaber:

Pharmacia GmbH

Einsprechender:

Degussa AG, Frankfurt - Zweigniederlassung Wolfgang -
Zentrale Abteilung Patente

Stichwort:

Glutamin Di- und Tripeptide / PHARMACIA

Relevante Rechtsnormen:

EPÜ Art. 56

Schlagwort:

"Erfinderische Tätigkeit - (nein)"

Zitierte Entscheidungen:

-

Orientierungssatz:

-



Aktenzeichen: T 0850/92 - 3.3.4

E N T S C H E I D U N G
der Technischen Beschwerdekammer 3.3.4
vom 15. März 1996

Beschwerdeführer: Pharmacia GmbH
(Patentinhaber) Hofmannstraße 26
D-91052 Erlangen (DE)

Vertreter: Dr. Wibbelmann, Jobst
Wuesthoff & Wuesthoff
Patent- und Rechtsanwälte
Schweigerstraße 2
D-81541 München (DE)

Beschwerdegegner: Degussa AG, Frankfurt
(Einsprechender) - Zweigniederlassung Wolfgang -
Zentrale Abteilung Patente
Rodenbacher Chaussee 4
Postfach 1345
D-63403 Hanau (DE)

Vertreter: -

Angefochtene Entscheidung: Entscheidung der Einspruchsabteilung des
Europäischen Patentamts vom 13. Juli 1992,
mit der das europäische Patent Nr. 0 220 379
aufgrund des Artikels 102 (1) EPÜ widerrufen
worden ist.

Zusammensetzung der Kammer:

Vorsitzende: U. M. Kinkeldey
Mitglieder: R. E. Gramaglia
W. Moser

Sachverhalt und Anträge

I. Die Beschwerdeführerin ist Inhaberin des europäischen Patents Nr. 0 220 379 (Anmeldenummer: 86 109 103.1), dessen geltender Patentanspruch 1 lautet:

"1. Verwendung von Di- und/oder Tripeptiden des Glutamins in Aminosäuren, Glucose und Mineralsalze enthaltenden Zellkulturmedien zur Züchtung isolierter Gewebszellen."

Im Beschwerdeverfahren sind die folgenden Entgegenhaltungen von Bedeutung:

- (1) EP-A-0 087 750
- (4) "Lexikon Biochemie", Verlag Chemie, S. 456 - 457 (1980)
- (5) Prospekt der Firma Life Technologies über "Glutamax" (nachveröffentlicht)
- (6) Burston et al., "Mechanism of Peptide Transport" in "Peptide Transport and Hydrolysis", CIBA Symposium, Elsevier, Amsterdam, Seiten 79 - 98 (1977)
- (7) Matthews and Payne, "Peptide Transport in Protein Nutrition" in "Frontiers of Biology", Volume 37, North-Holland Publishing Company, Seiten 39 - 60 (1975)
- (8) Eagle H., Science, Volume 130, Seiten 432 - 437 (1959)
- (9) Eagle H., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Volume 89, Seiten 96 - 99 (1955)

- II. Die Beschwerdegegnerin (Einsprechende) hat gegen das erteilte Patent Einspruch eingelegt und beantragt, das Patent mangels Patentfähigkeit nach den Artikeln 52 bis 57 (100(a)) EPÜ zu widerrufen.
- III. Mit ihrer, am 13. Juli 1992 zur Post gegebenen Entscheidung hat die Einspruchsabteilung das europäische Patent widerrufen. Sie hat ihren Widerruf darauf gestützt, daß die Lehre des Patentanspruchs 1 im Hinblick auf die als nächstkommender Stand der Technik betrachtete Entgegenhaltung (1) nahegelegend sei.
- IV. Gegen diese Entscheidung legte die Beschwerdeführerin unter gleichzeitiger Zahlung der vorgeschriebenen Gebühr Beschwerde ein. Die Beschwerdebegründung wurde eingereicht.
- V. Zur Begründung der Beschwerde wurde im wesentlichen folgendes vorgetragen:

Aus der Entgegenhaltung (1) seien zwar Infusionslösungen zur parenteralen Ernährung bekannt, die Di- oder Tripeptide des Glutamins enthalten. Die Verwendung dieser Lösungen als Kulturmedium bei der Vermehrung von Gewebszellen sei aber diesem Dokument nicht zu entnehmen und die von der Einspruchsabteilung zum Ausdruck gebrachte Vermutung, daß die Spaltung und Freisetzung von Glutamin in Säugetiergewebe in entsprechender Weise auch für isolierte Säugetierzellen angenommen werden kann, sei durch nichts belegt.

Der Stand der Technik umfasse keinen einzigen Beleg, der zeige, daß bei der Züchtung von isolierten Gewebszellen, anstelle von Glutamin, dessen Di- und/oder Tripeptid eingesetzt werden könnten. Die von der Beschwerdegegnerin neu vorgelegten Entgegenhaltungen (6) und (7) gäben nur vage Hinweise. Weiterhin müsse als überraschend gewertet

werden, daß die erfindungsgemäßen Di- und Tripeptide des Glutamins bei der Aufzucht von Zellen ebenso gut wie Glutamin (siehe Entgegenhaltung (5)) und besser als Acetyl-Glutamin (siehe Fig. 1 bis 3 der Patenschrift) verwertet worden seien.

Im Beschwerdeverfahren seien die Entgegenhaltungen (8) und (9) neu eingereicht worden, die zwar den Einsatz von Di- und Tripeptiden zur Züchtung von Zellkulturen zeigten; es falle jedoch auf, daß gerade keine Di- und Tripeptide des Glutamins beschrieben seien. Des weiteren stammten die genannten Entgegenhaltungen aus den Jahren 1955 und 1959, und es müsse doch verwundern, daß bis zum Zeitpunkt des Einreichens der vorliegenden Erfindung niemand für diesen Zweck Di- und Tripeptide des Glutamins verwendet habe.

Weiterhin sei zu befürchten, daß nach Spaltung der Di- und Tripeptide des Glutamins die andere Aminosäure toxische Wirkung im Züchtungsmedium haben könnte.

VI. Die Argumente der Beschwerdegegnerin lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Aus der Entgegenhaltung (1) sei eine Lösung mit einer Form des Glutamins bekannt, die alle erforderlichen Eigenschaften, z.B die Hitzesterilisierbarkeit, aufweise, außer, daß nicht bekannt sei, ob die oben genannte Lösung für die Ernährung von Zellen in Zellkulturen verwendbar sei. Es sei jedoch aus den während des Beschwerdeverfahrens neu eingeführten Entgegenhaltungen (6) und (7) belegt, daß isolierte Zellen nicht nur Aminosäuren, sondern auch Dipeptide und Tripeptide verwerten könnten. Darüber hinaus würden gemäß Entgegenhaltung (1) (siehe S. 2, Z. 31 - 35) die in der Infusionslösung enthaltenen Di- und Tripeptide durch körpereigene Amino-peptidase aufgespalten. Würde somit das Produkt gemäß Dokument (1)

als Kulturmedium zur Züchtung isolierter Gewebszellen verwandt, so sähe der Fachmann hierin eine vernünftige Aussicht auf Erfolg.

VII. In der mündlichen Verhandlung vom 15. März 1996 reichte die Beschwerdeführerin einen neuen Anspruch 1 als Hilfsantrag ein, der sich von dem erteilten Anspruch 1 dadurch unterscheidet, daß Glutamin **nur** in Form seiner Di- und/oder Tripeptide in Zellkulturmedien eingesetzt werden sollte.

VIII. Die Beschwerdeführerin beantragt die Aufhebung der angefochtenen Entscheidung und die Aufrechthaltung des Patents in der erteilten Fassung und, hilfsweise, die Aufrechterhaltung des Patents mit den folgenden Unterlagen:

- Anspruch 1, überreicht in der mündlichen Verhandlung
- Ansprüche 2 bis 4, Beschreibung, Zeichnungen, wie erteilt.

Die Beschwerdegegnerin beantragt, die Beschwerde zurückzuweisen und das europäische Patent zu widerrufen.

Entscheidungsgründe

1. Die Beschwerde ist zulässig.

Hauptantrag

Neuheit

2. Der Gegenstand der Ansprüche ist nach Auffassung der Kammer neu im Sinne des Artikels 54 EPÜ. Im übrigen wurde die Neuheit der Ansprüche nicht bestritten.

Erfinderische Tätigkeit

Der nächstkommende Stand der Technik

3. Die Kammer hat die von der Beschwerdegegnerin bzw. Beschwerdeführerin erstmalig im Beschwerdeverfahren genannten Entgegenhaltungen (6) bis (9) auf ihre Bedeutung geprüft und ist zu der Überzeugung gelangt, daß bei der Beurteilung der erfinderischen Tätigkeit der in diesen Entgegenhaltungen offenbarte Stand der Technik, was die Verwertbarkeit von Di- und Tripeptiden im Allgemeinen durch isolierte Zellen betrifft, als relevanter anzusehen ist als der bis dahin herangezogene, auf Entgegnung (1) gestützte Stand der Technik. Die nachgereichten Entgegenhaltungen werden daher nach Artikel 114 (1) EPÜ berücksichtigt.
4. Die Einspruchsabteilung hat ihre Entscheidung, das Patent zu widerrufen, im wesentlichen auf Entgegnung (1) gestützt. Sie stellte u. a. auf Seite 1, letzter Absatz fest, daß die Di- und Tripeptide des Glutamins nach der Infusion in den Organismus durch körpereigene Aminopeptidase, z. B. durch die in Säugertiergeweben vorhandenen Peptidhydrolasen, unter Freisetzung von Glutamin aufgespalten werden. Der Fachmann könne daraus die Möglichkeit herleiten, daß Zellen auch außerhalb des Zellverbandes, d. h. also auch isolierte Gewebezellen, die Umwandlung und Aufnahme der Di- und Tripeptide des Glutamins in den Zellen bewerkstelligen könnten. Die Beschwerdegegnerin trug ebenfalls vor, Entgegnung (1) sei der nächstliegende Stand der Technik und Ausgangspunkt für die Beurteilung der erfinderischen Tätigkeit. Die Kammer kann sich jedoch dieser Beurteilung nicht anschließen.
5. Sie vertritt vielmehr die Meinung, daß sich das Gebiet der parenteralen Verabreichung von Aminosäuren und

Peptiden von dem der Züchtung von isolierten Zellen mit Aminosäuren und Peptiden in einem wichtigen Punkt unterscheidet. Werden Aminosäuren und Peptide parenteral zugeführt, so könnten die im Blut vorhandenen, von anderen Organen oder Geweben sekretierten Carrier-Proteine und Enzyme eine wichtige Rolle für deren Verwertung durch die Gewebszellen spielen. Ob diese Carrier-Proteine oder zirkulierenden Enzymen auch in Kulturmedien zu finden sind, ist zweifelhaft, und das Gleichstellen von Blut mit Kulturzellenmedium bezüglich der Verwertung von Di- oder Tripeptiden erscheint wegen dieses physiologischen Unterschieds nicht angemessen.

6. Während der Ausdruck "Peptidhydrolase" sich auf die Gesamtheit der proteolytischen Enzyme bezieht, die für die hydrolytische Spaltung der Peptidbindung verantwortlich sind, hat der Begriff "Amino-peptidase" ferner für den Fachmann eine **präzise** Bedeutung und umfaßt nur eine bestimmte Unterfamilie der Peptidhydrolasen, nämlich solche Exopeptidasen, die am N-terminalen Kettenende der Proteine oder Peptide angreifen (siehe Entgegenhaltung (4), Seite 456). Der letzte Absatz auf Seite 1 der Entgegenhaltung (1) stellt jedoch fest, daß die Peptidhydrolasen, eine Unterfamilie der Amino-peptidasen sind. Die Kammer ist der Auffassung, daß der Fachmann sich nicht auf diesen, im Widerspruch zu lexikalem Wissen (Entgegenhaltung (4)) stehenden Absatz von Entgegenhaltung (1) stützen würde, um den erfindungsgemäß beschrittenen Weg einzuschlagen.
7. Es werden somit Entgegenhaltungen (6) bis (9) im Hinblick auf ihre Eignung als nächstkommender Stand der Technik untersucht.
8. Entgegenhaltung (6) bezieht sich auf die Aufnahme durch Zellen von Peptiden wie β -Ala-His, Gly-Sar und Gly-Sar-Sar, die außergewöhnlich hydrolysebeständig sind

(siehe Seiten 80 und 87). Da die erfindungsgemäßen Di- und Tripeptide des Glutamins keine ungewöhnlichen Aminosäuren wie Sar (N-Methylglycin) oder β -Ala beinhalten, besteht kein Anlaß zu vermuten, daß sie hydrolysebeständig sind. Daher kommt Entgegenhaltung (6) nicht als nächstliegender Stand der Technik in Betracht.

9. Entgegenhaltungen (7), (8) und (9) beschreiben die Aufnahme durch Zellen in Zellenmedien u. a. von Di- und Tripeptiden, nämlich Glu-Glu, Gly-Gly, Gly-Gly-Gly, Phe-Gly, Gly-Leu, Gly-Tyr, Leu-Tyr und Gly-Ile und eignen sich somit gleichermaßen als nächstliegender Stand der Technik.

Aufgabe und Lösung

10. Ausgehend von Entgegenhaltungen (7) bis (9) als nächstliegendem Stand der Technik kann die Aufgabe der vorliegenden Erfindung darin gesehen werden, Di- und Tripeptide zur Züchtung isolierter Gewebezellen unter Verwendung eines Zellkulturmediums bereitzustellen, in dem Glutamin als wesentlicher Wachstumsfaktor und Energiequelle vorgesehen ist. Daß die gemäß Anspruch 1 vorgeschlagene Verwendung von Di- und/oder Tripeptiden des Glutamins die Aufgabe löst, wird von der Kammer anerkannt.
11. Bei der Frage der erfinderischen Tätigkeit geht es darum, ob die Entgegenhaltungen (7) bis (9) den Fachmann in naheliegender Weise auf die Erfindung hinführen. Nach Auffassung der Kammer ist dies der Fall. Die Tabellen II und III auf Seite 98 der Entgegenhaltung (9) zeigen z. B., daß Dipeptide aus den Aminosäuren Gly, Leu, Ile, Tyr, Phe, etc, wie Gly-Leu, Gly-Ile, Gly-Phe, Gly-Tyr und Leu-Tyr durch Maus Fibroblasten und HeLa-Karzinoma-Zellen aufgenommen und verwertet werden. Die erforderlichen Konzentrationen der Dipeptide, um ein optimales

Zellwachstum zu erreichen, sind mit denen der entsprechenden einzelnen Aminosäuren vergleichbar (siehe Seite 99, linke Spalte, zweiten Absatz). Die Lehre des Anspruchs 1 des Streitpatents besteht gemäß Beschreibung darin, die Dipeptide des Glutamins Gly-Gln und Ala-Gln in einem Zellmedium einzusetzen, und zu prüfen, ob auch diese Peptide von verschiedenen Zellen aufgenommen und verwertet werden. Die Kammer kann nichts Erfinderisches in der Tatsache sehen, daß die oben genannten glutaminhaltigen Peptide sich genau wie die Peptide der Entgegenhaltung verhalten. Dies zeigt ein Vergleich der Werte auf Seite 99, linke Spalte, zweiter Absatz der Entgegenhaltung (9) mit Entgegenhaltung (5), Seite 2, unten, die für Dipeptide gemäß Streitpatent feststellt: "Optimales Zellwachstum wird erreicht wenn die Glutamax-Konzentration equimolar zu L-Glutamin eingesetzt wird". Die Tabelle II der Entgegenhaltung (9) sowie Entgegenhaltung (5) zeigen Variationen in der Verwertbarkeit der Dipeptide in Abhängigkeit der Aminosäurekombination und des Zelltyps. Eine spezielle Kombination ist jedoch nicht beansprucht, und eventuelle ungewöhnliche Wirkungen können daher nicht berücksichtigt werden.

12. Die Beschwerdeführerin machte den Einwand geltend, die erfindungsgemäßen glutaminhaltigen Peptide könnten nicht mit den in Entgegenhaltung (9) beschriebenen verglichen werden, weil im Gegensatz zu den nicht essentiellen Aminosäuren von Entgegenhaltung (9), Glutamin ein wichtiger wachstumbegrenzender Faktor sei, der u. a. zum Aufbau der Nucleotide diene, und weil die in der Beschreibung des Streitpatents erwähnten minimalen, einer Log-Phase angepaßten Konzentrationen viel höher als die der Entgegenhaltung (9) seien. Es könnten in diesem Zustand zytotoxische Konzentrationen von Aminosäuren durch Spaltung der Peptide entstehen.

11. Die Kammer kann diesen Argumenten der Beschwerdeführerin nicht zustimmen, weil der Lehre der Entgegenhaltung (9) (Seite 96, rechte Spalte, 1. Zeile und Seite 99, 1. Absatz der linken Spalte) bereits zu entnehmen ist, daß die Dipeptide Gly-Leu, Gly-Ile, Gly-Phe, Gly-Tyr und Leu-Tyr essentielle Aminosäuren enthalten und als Wachstumsfaktoren wirken (ibidem, siehe Tabellen II und III: "Growth response...").

12. Auch das Argument, die beanspruchten Dipeptide des Glutamins lägen in viel höherer Konzentration vor als diejenigen der Entgegenhaltung (9), kann nicht durchgreifen. Das Beispiel in der Beschreibung des Streitpatents (Seite 3, Zeile 57) erwähnt zwar eine 200 mM Lösung an Ala-Gln oder Gly-Gln (10 ml einer Lösung, die 200 mmol Ala-Gln oder Gly-Gln enthielt, wurden einem Liter Medium zugegeben, so daß die Endkonzentration an glutaminhaltigem Dipeptid $200 \text{ mmol} \times [1000 + 10]^{-1} \sim 200 \text{ mM}$ betrug, die bei den im Streitpatent beschriebenen Tests mit Zellkulturen eingesetzt wurde. Es ist jedoch aus Entgegenhaltung (5) zu entnehmen (siehe Seite 2, unten), daß optimales Zellwachstum erreicht wird, wenn die Glutamax-Konzentration equimolar zu L-Glutamin eingesetzt wird. Die Konzentration an Glutamin in Zellmedien ist 2mM (siehe Entgegenhaltung (8), Seite 433, Tabelle 1), und dieser Wert stimmt mit 500 mg/Liter Ala-Gln überein ($500/217 \sim 2\text{mM}$), wie es auf Seite 3, Zeile 21 der Beschreibung des Streitpatents beschrieben ist. Die zweite Figur auf Seite 2 von Entgegenhaltung (5) zeigt ebenfalls, daß "Glutamax", die Dipeptide L-Alanyl-L-Glutamin und L-Glycyl-L-Glutamin des Streitpatents, in niedrigen, mit denen der Entgegenhaltung (9) vergleichbaren Konzentrationen (3,5 mM) eingesetzt werden kann.

13. Auch das Argument der Beschwerdeführerin, es sei überraschend, daß die Di- und Tripeptide des Glutamins von isolierten Zellen besser als Acetyl-Glutamin verwertet werden überzeugt nicht. Es ist im Gebiet der Peptide allgemein bekannt, daß ein N-terminaler Acetylrest als eine Blockierungsgruppe wirkt und oft in Peptide eingeführt wird, um diese vor Angriffen durch Exopeptidasen zu schützen. Damit erhöht sich deren Halbwertszeit im Blut.

Obwohl die Kammer Entgegenhaltung (1) nicht als nächstliegenden Stand der Technik betrachtet (siehe Punkte 4 bis 7 oben), läßt die Lehre, daß Di- und Tripeptide des Glutamins, also die anspruchsgemäß verwendeten Substanzen, in Infusionslösungen ohne die Gefahr der Bildung toxischer Zyklierungsprodukte gut verwendbar sind, mindestens den Schluß zu, daß auch in Zellkulturen deren Verwendung untoxisch sein könnte. Jedenfalls ist die Offenbarung in Entgegenhaltung (1) nicht geeignet, den Fachmann davon abzuhalten, diese Substanzen mit einer geringfügigen Aussicht auf Erfolg auch zur Züchtung von Zellkulturen auszuprobieren.

14. Aus alledem folgt, daß der Gegenstand des Patentanspruchs 1 gemäß Hauptantrag nicht auf einer erfinderischen Tätigkeit beruht (Artikel 56 EPÜ).

Hilfsantrag

Erfordernisse des Artikel 123 (2) und (3) EPÜ

15. Der Anspruch 1 gemäß Hilfsantrag ist als eine beschränkte Form des Anspruchs 1 des Hauptantrags anzusehen, wobei Glutamin **nur** in Form seiner Di- und/oder Tripeptide eingesetzt werden soll, also ohne begleitende Zugabe der einzelnen Aminosäure Glutamin. Eine Stütze ist auf Seite 3, Zeile 55 und Seite 4, Zeile 5 ("glutaminfrei")

der Beschreibung zu finden. Deshalb verletzt dieser geänderte Anspruch 1 weder Artikel 123 (2) noch Artikel 123 (3) EPÜ.

Erfinderische Tätigkeit

16. Die in der Entgegenhaltung (9) beschriebenen Dipeptide werden ebenfalls in Abwesenheit der entsprechenden einzelnen Aminosäuren im Zellmedium eingesetzt (siehe Tabellen II und III: "Essential amino acid omitted from medium"). Dieses Merkmal kann somit nicht zur Anerkennung der erfinderischen Tätigkeit der gemäß Hilfantrag beanspruchten Verwendung verhelfen.

Entscheidungsformel

Aus diesen Gründen wird entschieden:

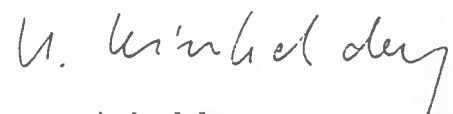
Die Beschwerde wird zurückgewiesen.

Der Geschäftsstellenbeamte:



L. Mc Garry

Die Vorsitzende:



U. Kinkeldey

