



BUNDESGERICHTSHOF

IM NAMEN DES VOLKES

URTEIL

X ZR 96/19

Verkündet am:
16. November 2021
Anderer
Justizangestellte
als Urkundsbeamtin
der Geschäftsstelle

in der Patentnichtigkeitssache

Der X. Zivilsenat des Bundesgerichtshofs hat auf die mündliche Verhandlung vom 16. November 2021 durch den Vorsitzenden Richter Dr. Bacher, den Richter Dr. Grabinski, die Richterinnen Dr. Kober-Dehm und Dr. Marx sowie den Richter Dr. Rensen

für Recht erkannt:

Die Berufung gegen das Urteil des 3. Senats (Nichtigkeitssenats) des Bundespatentgerichts vom 25. Juni 2019 wird auf Kosten der Klägerin zurückgewiesen.

Von Rechts wegen

Tatbestand:

1 Die Beklagte ist eingetragene Inhaberin des mit Wirkung für die Bundesrepublik Deutschland erteilten europäischen Patents 1 831 250 (Streitpatents), das am 28. Dezember 2005 angemeldet worden ist und japanische Prioritäten vom 28. Dezember 2004 sowie vom 9. September 2005 in Anspruch nimmt. Das Schutzrecht betrifft einen L-Glutaminsäure produzierenden Mikroorganismus sowie ein Verfahren zur Produktion von L-Glutaminsäure. Patentanspruch 1, auf den neun weitere Ansprüche zurückbezogen sind, lautet in der Verfahrenssprache:

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 Patentanspruch 11, auf den ein weiterer Anspruch zurückbezogen ist, schützt ein Verfahren zur Herstellung von L-Glutaminsäure.

3 Die Klägerin hat das Streitpatent im Umfang der Patentansprüche 1 bis 6 und 8 bis 12 angegriffen und geltend gemacht, der angegriffene Gegenstand sei nicht patentfähig. Die Beklagte hat das Streitpatent in seiner erteilten Fassung sowie mit einem Hilfsantrag verteidigt.

4 Das Patentgericht hat die Klage abgewiesen. Dagegen richtet sich die Berufung der Klägerin, die ihren erstinstanzlichen Antrag weiterverfolgt. Die Beklagte tritt dem Rechtsmittel mit ihren erstinstanzlichen Anträgen entgegen.

Entscheidungsgründe:

5 Die zulässige Berufung ist nicht begründet.

6 Das Patentgericht hat die Klage zu Recht und mit zutreffender Begründung abgewiesen. Auch das neue Vorbringen der Klägerin rechtfertigt keine andere Beurteilung.

7 I. Das Streitpatent betrifft die Herstellung von L-Glutaminsäure (nachfolgend: Glutaminsäure) und deren Salzen (Glutamate) im Wege der Fermentation.

8 1. Nach der Beschreibung des Streitpatents werden zur industriellen Herstellung von Glutaminsäure gewöhnlich coryneforme (an einem Ende keulenförmig verdickte) Bakterien eingesetzt.

9 Die Wildtypen dieser Bakterien produzierten keine Glutaminsäure, wenn in der Umgebung ein Überschuss von Biotin herrsche. Deshalb werde die Biotin-Menge in der Umgebung begrenzt oder dem Kulturmedium ein Tensid oder Penicillin beigegeben. Ferner könnten mutierte Corynebakterien eingesetzt werden. Einige dieser Stämme hätten den Nachteil einer verringerten Fettsäure- oder Zellwandbiosynthese (Abs. 2 bis 4).

10 2. Vor diesem Hintergrund liegt dem Streitpatent die Aufgabe zugrunde, bessere Möglichkeiten zur Herstellung von Glutaminsäure zur Verfügung zu stellen.

11 3. Zur Lösung schlägt das Streitpatent nach Patentanspruch 1 ein Gen mit den folgenden Merkmalen vor:

1. Mutierte Variante des yggB-Gens,
 - 1.1 das eine der Sequenzen mit der Nr. 6, 62, 68, 84 oder 85 kodiert und
 - 1.2 ein Threonin an der Position 100
 - 1.3 oder ein Valin oder Threonin an der Position 111 aufweist.

12 4. Die in Merkmal 1.1 aufgeführten Sequenzen sind in der Patentschrift auf S. 43 ff. (Nr. 6), S. 125 ff. (Nr. 62), S. 133 ff. (Nr. 68), S. 150 f. (Nr. 84) und S. 152 ff. (Nr. 85) aufgelistet.

13 Danach entstammen die Sequenzen Nr. 6, 62, 84 und 85 *Corynebacterium glutamicum*; Sequenz Nr. 68 entstammt *Corynebacterium melassecola*.

14 II. Das Patentgericht hat seine Entscheidung im Wesentlichen wie folgt begründet:

15 Zur Lösung der Aufgabe wende sich der Fachmann, ein Biologe, Biochemiker oder Biotechnologe, der über einschlägige Berufserfahrung auf dem Gebiet der fermentativen Herstellung von Aminosäuren verfüge, Druckschriften zu, welche die Ausschleusung von Glutaminsäure aus Corynebakterien betreffen. Dazu gehöre der Beitrag von Lapujade et al. (Glutamate Excretion as a Major Kinetic Bottleneck for the Thermally Triggered Production of Glutamic Acid by *Corynebacterium glutamicum*, *Metabolic Engineering* 1999, 255-261, NK12). NK12 rege dazu an, den Ausstrom von Glutamat aus Corynebakterien zu erhöhen und damit seine für die gewünschte Biosynthese hinderliche Anreicherung im Zellinneren zu unterdrücken. In diesem Zusammenhang verweise die Entgegenhaltung auf einen Beitrag von Gutmann et al. (Carrier-mediated glutamate secretion by *Corynebacterium glutamicum* under biotin limitation, *Biochimica et Biophysica Acta* 1992, 115-123, NB2). Dort werde das maßgebende System als Carrier-System beschrieben. Daraus ergebe sich die Anregung, die Menge der Glutamat-Carrier in der Zelle zu erhöhen oder die mit der Membran verbundenen Faktoren zu ändern, um das Glutamat-Exportsystem zu aktivieren.

- 16 Ausgehend von NK12 wende sich der Fachmann der Veröffentlichung von Ruffert et al. (Efflux of compatible solutes in *Corynebacterium glutamicum* mediated by osmoregulated channel activity, *European Journal of Biochemistry* 1997, 572-580, NK14) zu. Aus dieser Entgegenhaltung ergebe sich die Schlussfolgerung, dass der Glutamat-Ausstrom nicht mittels Aktivierung osmotisch regulierter Kanäle gesteigert werden könne. Zudem erfordere eine solche Aktivierung die aufwändige Einstellung hypoosmotischer Bedingungen, was dazu führe, dass die Zellen nicht mehr zu überdurchschnittlicher Produktion von Glutamat im Wege der Biosynthese in der Lage seien.
- 17 Vor dem Hintergrund dieser Erkenntnisse wende sich der Fachmann der Fachliteratur zu, zu welcher die Veröffentlichung von Krämer (Secretion of amino acids by bacteria, *Physiology and mechanism, Microbiology Reviews* 1994, 75-94, NK37) gehöre. Diesem Beitrag lasse sich zwar entnehmen, dass das *Corynebacterium glutamicum* auf einen hypoosmotischen Schock mit dem Ausstrom von Glutamat reagiere. Da NK37 keine Angaben über das Ausmaß dieses Ausstroms enthalte, gehe der Fachmann insofern aber von der jüngeren Untersuchung in NK14 aus und nehme an, dass der Ausstrom nicht in einem für die industrielle Produktion relevanten Ausmaß erfolge. Zudem setze eine effektive Glutamat-Produktion nach NK37 eine Carrier-Aktivierung ohne generelle Membranöffnung voraus. Ein hypoosmotischer Schock habe jedoch eine solche Öffnung zur Folge.
- 18 Die Veröffentlichung von Lambert et al. (Triggering Glutamate Excretion in *Corynebacterium glutamicum* by Modulating the Membrane State with Local Anesthetics and Osmotic Gradients, *Applied and Environmental Microbiology* p995, 4334-4342, NB5), die auch allgemeines Fachwissen zum Gegenstand habe, zeige ebenfalls, dass ein hypoosmotischer Schock für den gewünschten Ausstrom größerer Glutamat-Mengen nicht ausreiche. Deshalb werde in NB5 zusätzlich das Lokalanästhetikum Tetracin eingesetzt, das die Zellmembran für

Glutamat durchlässiger mache. Diesen Ansatz verfolge der Fachmann nicht weiter, weil Tetracin überaus toxisch sei und deshalb für die Herstellung von Zusätzen für Lebensmittel nicht in Betracht komme.

19 Einer Vielzahl von Dokumenten sei die herrschende Meinung zu entnehmen gewesen, dass die Ausschleusung von Glutamat aus coryneformen Bakterien durch einen Carrier vermittelt werde, also unter Energieeinsatz und unabhängig vom Konzentrationsgradienten geschehe, nicht hingegen unter Gebrauch eines Kanals und mit Rücksicht auf Konzentrationsunterschiede. Davon weiche NK14 nicht ab. Zwar offenbare die Entgegenhaltung, dass der für den Ausstrom kleiner gelöster Moleküle unter hypoosmotischem Schock zuständige Kanal des *Corynebacterium glutamicum* dem entsprechenden mechanosensitiven Kanal in *Escherichia coli* ähneln könne, der auch als yggB-Kanal bezeichnet werde. NK14 zeige aber auch, dass sich die beiden Kanäle unterscheiden müssten. Denn unter den Bedingungen eines hypoosmotischen Schocks schleuse *Escherichia coli* nahezu sämtliche Moleküle mit geringer Masse aus, während *Corynebacterium glutamicum* nach wie vor selektiere.

20 Eine abweichende Beurteilung ergebe sich nicht aus dem in NK14 enthaltenen Hinweis, es lägen keine Anhaltspunkte für eine ausschlaggebende Bedeutung eines Efflux-Carrier-Systems unter den Bedingungen eines hypoosmotischen Schocks in *Corynebacterium glutamicum* vor. Die betreffenden Bedingungen entsprächen nicht den hyperosmotischen Bedingungen einer über mehrere Stunden erfolgenden Fermentation. Auch beruhten die Ergebnisse der NK14 auf einer Vielzahl von Annahmen, die der Fachmann nicht ungeprüft übernehme, sondern hinterfrage.

21 Es treffe nicht zu, dass der Fachmann mangels Kenntnis des Glutamat-Carriers keine andere Wahl gehabt habe, als sich intensiv mit dem in NK14 angesprochenen mechanosensitiven Kanal MscS/yggB des Bakteriums *Escherichia coli* auseinanderzusetzen. So sei bis zum Prioritätszeitpunkt bereits die genetische Veränderung coryneformer Bakterien versucht worden

(DE 695 22 690 T2, NK21). Andere hätten die Stimulierung des Glutamat-Ausstoßes mit Hilfe von Zusätzen im Kulturmedium unternommen (Duperray et al., Excretion of glutamate from *Corynebacterium glutamicum* triggered by amine surfactants, *Biochimica et Biophysica Acta* 1992, 250-258, NK48). Zwar sei die Ähnlichkeit der mechanosensitiven Kanäle in *Escherichia coli* und in *Corynebacterium glutamicum* bekannt gewesen. Aufgrund des unterschiedlichen Verhaltens beim Ausschleusen von Glutamat selbst unter den Bedingungen eines hypoosmotischen Schocks habe eine Weiterverfolgung der Hinweise aus NK14 in diese Richtung aber keine Erfolgserwartung begründet.

22 Unabhängig davon habe sich aus Veröffentlichungen zu mechanosensitiven Kanälen kein Hinweis auf ein im Sinne des Streitpatents mutiertes *yggB*-Gen ergeben. Dies gelte für die Veröffentlichungen von Nottebrock et al. (*Molecular and biochemical characterization of mechanosensitive channels in Corynebacterium glutamicum*, *FEMS Microbiology Letters* 2003, 305-309, NK13), Miller et al. (*Domain organization of the MscS mechanosensitive channel of Escherichia coli*, *The EMBO Journal* 2003, 36-46, NK15), Bass et al. (*Crystal Structure of Escherichia coli MscS, a Voltage-Modulated and Mechanosensitive Channel*, *Science* 2002, 1582-1587, NK16), Sotomayor und Schulten (*Molecular Dynamics Study of Gating in the Mechanosensitive Channel of Small Conductance MscS*, *Biophysical Journal* 2004, 3050-3065, NK17), Edwards et al. (*Gating the bacterial mechanosensitive channels: MscS a new paradigm?*, *Current Opinion in Microbiology* 2004, 163-167, NK34), Perozo und Rees (*Structure and mechanism in prokaryotic mechanosensitive channels*, *Current Opinion in Structural Biology* 2003, 432-442, NK36) sowie Yoshimura et al. (*Hydrophilicity of a Single Residue within MscL Correlates with Increased Channel Mechanosensitivity*, *Biophysical Journal* 1999, 1960-1972, NK38).

23 III. Diese Beurteilung hält der Überprüfung im Berufungsverfahren
stand.

24 Zu Recht hat das Patentgericht entschieden, dass der Gegenstand des
Streitpatents weder ausgehend von NK12 und NK14 noch von einem anderen
Ausgangspunkt aus nahegelegt war.

25 1. NK12 befasst sich mit der Frage, welcher Einfluss bei der Herstel-
lung von Glutamat durch *Corynebacterium glutamicum* der Ausscheidung des
produzierten Stoffs zukommt.

26 Bei den in NK12 beschriebenen Versuchen wurde ein bestimmter Stamm
von *Corynebacterium glutamicum* unterschiedlichen Temperaturen im Bereich
zwischen 33 und 40 °C ausgesetzt (NK12 S. 255 rechts Abs. 3). Als Ergebnis
wird berichtet, bei den niedrigsten Versuchstemperaturen sei das Zellwachstum
am größten, die Ausscheidungsrate hingegen am geringsten (NK12 S. 259
rechts Abs. 3). Die höchste Ausscheidungsrate sei gemessen worden, als das
Zellwachstum bei 40 °C zum Stillstand gekommen sei (NK12 S. 259 rechts
Abs. 5). Allerdings sei selbst bei optimalen Ausscheidungsbedingungen ein rela-
tiv hoher Glutamatspiegel im Zellinneren gemessen worden (NK12 S. 260 links
Abs. 2).

27 Auf dieser Grundlage äußert NK12 die Einschätzung, die deutliche Erhö-
hung der Ausscheidungsrate könne nur teilweise auf eine thermische Aktivierung
beteiligter enzymatischer Reaktionen zurückgeführt werden; sie beruhe zum gro-
ßen Teil auf der thermischen Einwirkung auf das Glutamatexportsystem (NK12
S. 260 rechts Abs. 1 letzter Satz). Die Glutamatausscheidung könne damit als
wesentlicher Engpass für die Produktion von Glutamat angesehen werden. Die
künftige Forschung müsse der Erhöhung des Aminosäure-Exports zwecks Re-
duzierung der Glutamat-Akkumulation im Zellinneren gelten. Wenn der Glutamat-
export ein spezifisches Transportsystem umfasse, wie dies in NB2 vorgeschla-
gen worden sei, könne das genannte Ziel möglicherweise durch eine Erhöhung

des Spiegels des Glutamat-Transporters oder durch Veränderung von membranbezogenen Faktoren wie der Zusammensetzung oder des Fließvermögens erreicht werden (NK12 S. 260 rechts letzter Absatz).

28 2. Ob sich der in NK12 enthaltene Hinweis auf membranbezogene Faktoren nur auf eine Veränderung der Membran mit dem Ziel einer besseren Wirksamkeit des in NB2 behandelten Carriers bezieht oder auch auf andere Einwirkungen auf die Membran und ob unter dem zuletzt genannten Aspekt ausgehend von NK12 Anlass bestand, ergänzend NK14 heranzuziehen, bedarf keiner abschließenden Entscheidung. Selbst wenn die Frage mit dem Patentgericht zu bejahen wäre, ergäbe sich, wie das Patentgericht zutreffend ausgeführt hat, auch aus NK14 keine Anregung im Sinne des Gegenstands des Streitpatents.

29 a) NK14 befasst sich mit dem Ausstrom kompatibler Solute in *Corynebacterium glutamicum*.

30 In NK14 wird ausgeführt, hypoosmotischer Stress führe zu massivem Eindringen von Wasser in die Zelle und könne das Reißen der Plasmamembran zur Folge haben. Bei Bakterien bestehe eine Strategie zur Bewältigung dieser Situation im schnellen Freisetzen von Molekülen mit geringer Molekularmasse. Bei einem gemäßigten Abfall des osmotischen Drucks setzten Bakterien eine Reihe von Verbindungen frei, die als kompatible Solute bekannt seien, zum Beispiel Kalium-Ionen, Glutamat, Prolin, Glycinbetain und Trehalose. Bei einem stärkeren Schock würden andere Verbindungen freigesetzt.

31 Für *Escherichia coli* seien mechanosensitive Kanäle beschrieben worden, die auf Änderungen des Turgordrucks reagierten und von denen man annehme, dass sie für die Freisetzung dieser Substanzen verantwortlich seien. Für *Escherichia coli* seien mindestens drei Unterfamilien von Kanälen identifiziert worden. Das Gen, das einen dieser Kanäle codierte, MscL von *Escherichia coli*, sei kloniert und sequenziert worden.

32 Andererseits gebe es Hinweise darauf, dass der Solutenausfluss als Reaktion auf osmotische Veränderungen auch durch Carrier vermittelt werden könne. Unter anderem könne der Ausstoß von Glutamat durch eine Veränderung des osmotischen Gradienten in *Corynebacterium glutamicum* beeinflusst werden.

33 Vor diesem Hintergrund berichtet NK14 über Versuche, bei denen der Ausstrom von Glycinbetain, Prolin, Lysin, Alanin, Glutamat, Ectoin, Natrium, Kalium und Adenosintriphosphat (ATP) bei abnehmendem osmotischem Druck gemessen wurde. Ausweislich der in Tabelle 1 zusammengestellten Ergebnisse verbleibt selbst bei einem als hypoosmotischer Schock bezeichneten Absinken der osmotischen Konzentration auf 540 mOsm noch 80 % der Glutamat-Menge in der Zelle. Ein vergleichbarer Wert (75 %) ist für Lysin angegeben, ein noch höherer Wert (99 %) für ATP. Alle anderen untersuchten Substanzen weisen deutlich geringere Werte (zwischen 65 % und 3 %) auf.

Table 1. Specificity of solute efflux after hypoosmotic shock in *C. glutamicum*. Cells were loaded with solutes under hyperosmotic conditions (1860 mOsm and 2100 mOsm, respectively) either by accumulation of labeled or unlabeled compatible solutes (glycine betaine, proline, ectoine), or by addition of dipeptides (lysine, alanine). The cells were diluted as given in the table. Efflux was measured 1 min after the hypoosmotic shock in both the supernatant and the pellet of the silicone oil centrifugation using scintillation counting (sc.count.), HPLC, enzymatic assay, NMR, luciferin/luciferase assay, or flame photometry (flame ph.). The values are in $\mu\text{mol} \cdot \text{mg dm}^{-3}$, since correcting to the true internal concentration according to the changed cytoplasmic volume would give misleading results of the net changes. All values are means of at least three experiments. For isoosmolar dilution and for hypoosmotic shock to 540 mOsm, relative values of retained solutes are given.

Efflux solute	Analytical method	Solute retained after dilution to osmolality of					
		before	1860	1060	860	710	540
$\mu\text{mol} \cdot \text{mg dm}^{-3}$ (%)							
Glycine betaine	sc. count	0.92	0.90 (98)	0.69	0.56	0.43	0.28 (30)
Proline	sc. count	0.94	0.91 (97)	0.63	0.50	0.38	0.27 (29)
Ectoine	NMR	0.52	0.51 (98)	0.50	0.46	0.44	0.29 (56)
Glycine betaine ^a	NMR	0.35	—	—	0.15	0.11	0.01 (3)
+ ectoine ^a	NMR	0.45	—	—	0.34	0.32	0.23 (51)
Alanine ^d	HPLC	0.32	0.32 (100)	0.22	0.20	0.20	0.15 (47)
Glutamate ^c	enzyme	0.46	0.42 (91)	0.40	0.41	—	0.37 (80)
Lysine ^d	HPLC	0.20	0.18 (90)	0.15	0.16	0.15	0.15 (75)
ATP ^b	luciferase	0.007	0.007 (100)	0.007	0.007	0.007	0.007 (99)
Na ^{+,c,d}	flame ph.	0.57	0.22 (39)	—	0.21	0.17	0.16 (28)
K ^{+,c,d}	flame ph.	1.03	0.95 (92)	—	0.86	0.79	0.67 (65)

^a Loading with both glycine betaine (3 mM) and ectoine (3 mM) at the same time.

^b Efflux of ATP never exceeded 2% of the total ATP content in the cytoplasm.

^c The case of Na⁺ and K⁺, the steps in osmolality were 2100, 1140, 820, 600, 420 mOsm.

^d Loading in the presence of 2 mM glycine betaine, in order to create a competitive situation (see text).

- 34 Hieraus wird in NK14 die Schlussfolgerung abgeleitet, angesichts der ausgeprägten Präferenz für bestimmte Substrate könne der beobachtete Ausstrom nicht durch ein Membranleck vermittelt werden. Ferner sei die beobachtete Ausstromrate vermutlich zu hoch, um durch einen Carrier-Mechanismus katalysiert zu werden. Zudem habe die Zugabe von externem Transportsubstrat nicht zu einem nennenswerten Unterschied in Menge oder Zeitverlauf des Ausstroms geführt (S. 575 links Abs. 2).
- 35 Bei der Diskussion der Ergebnisse wird ausgeführt, als Bodenbakterium verfüge *Corynebacterium glutamicum* über effektive Mechanismen, um auf häufig auftretende Notlagen in Gestalt eines hypoosmotischen Schocks zu reagieren. Das untersuchte Ausstromsystem reagiere in qualitativ ähnlicher Weise wie die bereits beschriebenen mechanosensitiven Kanäle in *Escherichia coli* und *Lactobacillus plantarum*. Der Kanal von *Corynebacterium glutamicum* zeige aber eine Anzahl von besonderen Eigenschaften in Bezug auf die Spezifität und die Regulation der Ausstromaktivität (S. 578 links vorletzter Absatz). Die Möglichkeit eines Membranlecks sei aufgrund der ausgeprägten Präferenz für bestimmte Substanzen ausgeschlossen. Die Beteiligung eines Carriers habe sich aufgrund mehrerer experimenteller Ergebnisse als sehr unwahrscheinlich erwiesen (S. 578 links letzter Absatz). Solange die molekulare Identität des Kanals in *Corynebacterium glutamicum* nicht bekannt sei, könne die beobachtete Durchlässigkeit auch durch eine Vielzahl von Kanälen mit unterschiedlicher Spezifität erklärt werden (S. 578 rechts Abs. 2). Dass der beobachtete Ausstromkanal in *Corynebacterium glutamicum* nicht auf den unspezifischen Kanalblocker Gd^{3+} reagiere, zeige, dass er sich von dem MscL-Kanal in *Escherichia coli* unterscheide. In Frage komme aber eine Ähnlichkeit zum MscS-Kanal in *Escherichia coli* (NK14 S. 578 rechts Abs. 3).
- 36 Abschließend wird hervorgehoben, der beschriebene Ausstromkanal weise keine Beziehung auf zu dem bekannten Ausstrom von Glutamat, der unter bestimmten metabolischen Bedingungen beobachtet worden sei. Der Ausfluss von Glutamat unter kontinuierlichen Produktionsbedingungen schein zwar auf

osmotische Veränderungen zu reagieren. Er werde aber, wie unter anderem in NB2 gezeigt worden sei, durch ein spezifisches Carrier-System vermittelt (S. 579 links Abs. 3).

37 b) Daraus ergab sich keine Anregung, den MscS-Kanal von Escherichia coli als Mittel zur Verbesserung der Effizienz bei der Herstellung von Glutamat in Betracht zu ziehen.

38 aa) Tabelle 1 von NK14 zeigt allerdings einen in gewissem Umfang erhöhten Ausstrom von Glutamat bei einem starken hypoosmotischen Schock. Dies gab für sich gesehen jedoch allenfalls einen schwachen Anreiz, dieses Phänomen als mögliches Mittel für einen verbesserten Export von Glutamat in Betracht zu ziehen.

39 Wie etwa aus NK13 (Tabelle 1) bekannt war, führt ein starker hypoosmotischer Schock dazu, dass sich die Überlebensrate der zur Produktion benötigten Bakterien deutlich verringert. Dies mag kein Grund gewesen sein, diesen Ansatz von vornherein als ungeeignet zu verwerfen, führt aber jedenfalls dazu, dass er sich gegenüber anderen vorgeschlagenen Wegen nicht als besonders vorteilhaft oder erfolgversprechend darstellte.

40 bb) Entgegen der Auffassung der Beklagten ergaben sich ausgehend von NK14 keine hinreichenden Anhaltspunkte dafür, dass auch bei weniger extremen Bedingungen eine für Herstellungsprozesse attraktive Steigerung des Glutamat-Ausstoßes zu erwarten war.

41 Aus Tabelle 1 der NK14 ergibt sich, dass der bei einem hypoosmotischen Schock (540 mOsm) beobachtete Ausstoß von 20 % deutlich höher liegt als der für isoosmotische Bedingungen (1860 mOsm) angegebene Wert von 9 %. Tabelle 1 lässt aber nicht erkennen, dass diese Steigerung um elf Prozentpunkte - also auf mehr als das Doppelte des isoosmotischen Werts - linear verläuft. Vielmehr liegen die Werte für 1060 und 860 mOsm relativ nahe beim ersten Wert, und ein

Absenken der Osmolalität von 1060 auf 860 mOsm führt sogar zu einem leichten Anstieg des Glutamatwerts in der Zelle.

42 c) Ausgehend davon ergab sich aus NK14 keine hinreichende Aussicht darauf, dass eine nennenswerte Steigerung des Glutamatausstoßes durch andere Maßnahmen wie etwa den Einsatz von gain-of-function-Mutanten erzielt werden könnte.

43 aa) Nach der Rechtsprechung des Senats lassen sich die Anforderungen an eine angemessene Erfolgserwartung, die Veranlassung gibt, einen in Betracht kommenden Lösungsweg trotz nicht sicherer Vorhersehbarkeit der Resultate zu beschreiten, nicht allgemeingültig formulieren. Sie sind vielmehr jeweils im Einzelfall unter Berücksichtigung des in Rede stehenden Fachgebiets, der Größe des Anreizes für den Fachmann, des erforderlichen Aufwands für das Beschreiten und Verfolgen eines bestimmten Ansatzes und der gegebenenfalls in Betracht kommenden Alternativen sowie ihrer jeweiligen Vor- und Nachteile zu bestimmen (BGH, Urteil vom 7. Juli 2020 - X ZR 150/18, GRUR 2020, 1178 Rn. 108 - Pemetrexed II).

44 bb) Bei Anlegung dieses Maßstabs bestand im Streitfall keine angemessene Erfolgserwartung.

45 (1) Entscheidend beeinträchtigt wurden die Erfolgsaussichten bereits durch den im letzten Absatz von NK14 enthaltenen Hinweis, dass die beobachteten Mechanismen keine Beziehung zu dem bekannten Ausstrom von Glutamat unter bestimmten metabolischen Bedingungen aufweisen.

46 Dieser Hinweis schloss zwar nicht zwingend aus, dass es mehrere Mechanismen gibt, die für den Ausstrom von Glutamat unter Produktionsbedingungen von Bedeutung sind und dass deshalb auch die in NK14 dokumentierten Mechanismen einer Betrachtung wert sein könnten. Ein solcher Ansatz hätte jedoch eine Abkehr von dem erfordert, was NK14 selbst als naheliegend ansah.

47 (2) Selbst wenn eine solche Abkehr aus fachlicher Sicht als denkbar
erschieden wäre, hätte sich das yggB-Gen von *Corynebacterium glutamicum*,
das die Entsprechung zu dem in NK14 hervorgehobenen MscS-Kanal von
Escherichia coli darstellt, nicht als besonders erfolgversprechender Kandidat in
Bezug auf den Ausstoß von Glutamat angeboten.

48 Wie bereits oben ausgeführt wurde, gelangten die Autoren der NK14 aller-
dings zu dem Ergebnis, dass in *Corynebacterium glutamicum* ähnlich wie in
Escherichia coli ein MscS-Kanal vorhanden und für den Ausstrom kompatibler
Solute verantwortlich sein müsse. Daraus ergaben sich aber allenfalls schwache
Hinweise darauf, dass dieser Kanal auch oder insbesondere für den Ausstoß von
Glutamat von Bedeutung sein könnte.

49 Diesbezügliche Hinweise wurden insbesondere relativiert durch den Um-
stand, dass NK14 ausdrücklich auch Unterschiede zwischen *Corynebacterium*
glutamicum und *Escherichia coli* hervorhob, und zwar gerade auch in Bezug auf
den Ausstrom von Glutamat. Darüber hinaus hielten es die Autoren von NK14
angesichts der beobachteten Spezifität für möglich, dass eine Mehrzahl von Ka-
nälen für den Ausstoß der unterschiedlichen Substanzen verantwortlich sein
könnte.

50 Insgesamt stellte sich die Möglichkeit, dass dem aus *Escherichia coli* be-
kannten MScS-Kanal für den Glutamatausstoß in *Corynebacterium glutamicum*
wesentliche Bedeutung zukommt, allenfalls als eine von mehreren in Betracht
kommenden Varianten dar, die sich gegenüber möglichen Alternativen nicht in
besonderer Weise abhob.

51 (3) Vor diesem Hintergrund war die Aussicht, dass dieser Weg zum
angestrebten Ziel führen könnte und dass die Nachteile eines hypoosmotischen
Schocks durch gain-of-function-Mutanten oder vergleichbare Maßnahmen in
ausreichendem Maße kompensiert werden könnten, nicht ausreichend groß.

52 Aus Entgegenhaltungen wie NK15 und NK36 waren zwar Mutanten bekannt, die den Ausstoß über den MScS-Kanal in *Escherichia coli* verbessern. Dieser Ansatz ließ aber allenfalls dann wesentliche Verbesserungen beim Ausstoß in Glutamat durch *Corynebacterium* erwarten, wenn die Mutation nicht nur zu einer Verringerung der Ausstoßschwelle führen würde, sondern auch zu einer Vermeidung oder Abmilderung der mit einem Ausstoß bei hypoosmotischem Schock verbundenen Auswirkungen auf die Vitalität der Zellen. Auch insoweit bestanden allenfalls geringe Erfolgsaussichten, zumal NK36 (S. 436 re. Sp. Abs. 3 letzter Satz) ausdrücklich darauf hinweist, dass es bei gain-of-function-Mutanten ebenfalls zu einer nachteiligen Verringerung des Zellwachstums kommen kann.

53 Die Nutzung eines Kanals versprach zudem auch deshalb allenfalls geringen Erfolg, weil ein Ausstoß auf diesem Wege nur möglich ist, wenn die Glutamat-Konzentration im Zellinneren geringer ist als in der Umgebung, während ein Carrier auch gegen einen solchen Konzentrationsgradienten arbeiten kann. Auch dies sprach nicht von vornherein gegen diesen Ansatz, trug aber ebenfalls dazu bei, dass die Aussichten, auf diesem Weg zu dem angestrebten Ziel zu gelangen, nicht allzu groß waren.

54 (4) Entgegen der Auffassung der Klägerin sind die Anforderungen an die Erfolgserwartung nicht deshalb zu reduzieren, weil Patentanspruch 1 weder den Einsatz des beanspruchten Gens für die Herstellung von Glutamat noch bestimmte Mindestwerte für die Ausbeute vorsieht.

55 Das Fehlen solcher Vorgaben könnte allenfalls dazu führen, dass sich eine Entgegenhaltung schon dann als neuheitsschädlich erweist, wenn sie das modifizierte Gen für andere Einsatzzwecke offenbart. Für die Beurteilung der erfindnerischen Tätigkeit ist demgegenüber von Bedeutung, welche Faktoren Veranlassung geben konnten, sich mit einer Verbesserung des Glutamat-Exports zu befassen. Hierfür ist nach der oben aufgezeigten Rechtsprechung auch von Bedeutung, wie groß die Vorteile sind, die die Beschreitung eines bestimmten Wegs im

Erfolgsfalle versprach. Diese Vorteile sind deutlich größer, wenn eine erhebliche und für die industrielle Produktion gewinnversprechende Steigerung der Effizienz in Aussicht stand.

56 3. Alle übrigen im ersten Rechtszug eingeführten Entgegenhaltungen enthalten keine weitergehenden Anregungen und können dem Rechtsmittel deshalb ebenfalls nicht zum Erfolg verhelfen.

57 4. Nichts Anderes gilt für die erstmals in zweiter Instanz eingereichten Entgegenhaltungen NK55 bis NK58. Ob diese im Berufungsverfahren berücksichtigt werden dürfen, kann deshalb offenbleiben.

58 a) Auf NK55 bis NK57 (Morbach/Krämer, in: Eggeling/Bott, Handbook of Corynebacterium glutamicum, 2005, S. 417 bis 435; Skjerdal et al., Changes in intracellular composition in response to hyperosmotic stress of NaCl, sucrose or glutamic acid in Brevibacterium lactofermentum and Corynebacterium glutamicum, Appl. Microbiol. Biotechnol. 44 (1996), S. 635 bis 642; Wolf/Krämer/Morbach, Three pathways for trehalose metabolism in Corynebacterium glutamicum ATCC13032 and their significance in response to osmotic stress, Molecular Microbiology [2003] 49[4], 1119 bis 1134) stützt sich die Klägerin zum Beleg ihrer These, dass Corynebacterium glutamicum eine ansteigende Osmolalität durch Aufnahme von Soluten ausgleiche.

59 Auf die (Wieder-)Aufnahme von Soluten kommt es nach den vorstehenden Erwägungen indes nicht an.

60 b) NK58 (Luntz et al., Transport and Excretion of L-Lysine in Corynebacterium glutamicum, Journal of General Microbiology (1986), 132, 2137-2146) zieht die Klägerin im Zusammenhang mit ihrem Vortrag heran, Corynebacterium glutamicum könne Lysin auch über einen Kanal ausscheiden.

61 Auch dies ist mit Rücksicht auf die oben angestellten Erwägungen nicht von Bedeutung, weil NK14 die Spezifität der Ausstromraten verdeutlicht.

62 IV. Die Kostenentscheidung beruht auf § 121 Abs. 2 PatG in Verbindung mit § 97 Abs. 1 ZPO.

Bacher

Grabinski

Kober-Dehm

Richterin am Bundesgerichtshof
Dr. Marx kann wegen Erkrankung nicht unterschreiben.

Bacher

Rensen

Vorinstanz:

Bundespatentgericht, Entscheidung vom 25.06.2019 - 3 Ni 21/17 (EP) -