

Interner Verteilerschlüssel:

- (A) Veröffentlichung im AB1.
(B) An Vorsitzende und Mitglieder
(C) An Vorsitzende
(D) Keine Verteilung

E N T S C H E I D U N G
vom 7. März 2002

Beschwerde-Aktenzeichen: T 1033/99 - 3.4.2

Anmeldenummer: 95923338.8

Veröffentlichungsnummer: 0765470

IPC: G01N 15/10

Verfahrenssprache: DE

Bezeichnung der Erfindung:

Verfahren und Vorrichtung zur gezielten Entnahme von
Komponenten aus komplexen Mischungen

Anmelder:

Evotec OAI AG

Einsprechender:

-

Stichwort:

-

Relevante Rechtsnormen:

EPÜ Art. 56

Schlagwort:

"Erfinderische Tätigkeit (nein)"

Zitierte Entscheidungen:

-

Orientierungssatz:

-



Aktenzeichen: T 1033/99 - 3.4.2

E N T S C H E I D U N G
der Technischen Beschwerdekammer 3.4.2
vom 7. März 2002

Beschwerdeführer: Evotec OAI AG
Schnackenburgallee 114
D-22525 Hamburg (DE)

Vertreter: Meyers, Hans-Wilhelm, Dr. Dipl.-Chem.
Patentanwälte
von Kreisler, Selting, Werner
Postfach 10 22 41
D-50462 Köln (DE)

Angefochtene Entscheidung: Entscheidung der Prüfungsabteilung des
Europäischen Patentamts, die am
28. Juni 1999 zur Post gegeben wurde und mit
der die europäische Patentanmeldung
Nr. 95 923 338.8 aufgrund des
Artikels 97 (1) EPÜ zurückgewiesen worden
ist.

Zusammensetzung der Kammer:

Vorsitzender: E. Turrini
Mitglieder: M. P. Stock
B. J. Schachenmann

Sachverhalt und Anträge

I. Die unter Beanspruchung der Prioritäten der deutschen Patentanmeldungen P 44 22 313.7 vom 17. Juni 1994 und P 44 22 290.4 vom 25. Juni 1994 am 16. Juni 1995 eingereichte europäische Patentanmeldung Nr. 95 923 338.8 (internationale Veröffentlichungsnummer WO 95/35492) wurde von der Prüfungsabteilung wegen mangelnder erfinderischer Tätigkeit zurückgewiesen. Gegen diese Entscheidung wurde Beschwerde eingelegt.

II. Die Prüfungsabteilung hat u. a. folgende Dokumente in das Verfahren eingeführt:

D2: US-A-4 887 721

D9: Laser Focus World 30 (1994) February, No. 2,
Tulsa, OK, US, Seiten 83 bis 86

D12: US-A-5 288 999

D14: Proceedings Reprint from 4th International
Conference on Laser Applications in Life
Sciences, 7-11 September 1992, SPIE, vol. 1921
"Laser Spectroscopy of Biomolecules";
R. Rigler et al., "Diffusion of Single Molecules
Through a Gaussian Laser Beam", Seiten 239 bis
247.

Die Prüfungsabteilung hat dargelegt, daß es für den Fachmann naheliegend war, ausgehend von bekannten Verfahren zur Entnahme von Partikeln (z. B. D2), die im allgemeinen auf der Verwendung konventioneller Mikroskope zur Detektion der Partikel beruhen, diese konventionellen Mikroskope durch Mikroskope höherer Auflösung zu ersetzen, um damit noch kleinere Strukturen nachzuweisen und auf dieser Basis eine Partikelselektion

durchzuführen. Solche Mikroskope höherer Auflösung liegen aber z. B. in Form von konfokalen Mikroskopen (D9) sowie Nahfeldmikroskopen (D12) vor. Insbesondere in D9 ist schon erwähnt, daß sich die konfokale Lasermikroskopie für die Lokalisierung von Molekülen oder Genen in Zellen eignet. Die in D9 angegebene Auflösung (bis $0.1 \mu\text{m}$) bzw. Tiefenschärfe (0.05 nm) entspricht Meßvolumenelementen, die in den beanspruchten Bereich von $< 10^{-14} \text{ l}$ fallen.

Für die beanspruchte Erfindung ist auch D14 relevant. D14 offenbart die Möglichkeit, sehr kleine Volumenelemente ($< 10^{-14} \text{ l}$) zu detektieren und einzelne Partikel (Moleküle) einem "handling" und "trapping" zu unterwerfen. Der Fachmann betrachtet "Entnahme" im Sinne von Anspruch 1 der vorliegenden Anmeldung als ein Beispiel für "handling" und weiß, daß für die Detektion von sehr kleinen Volumenelementen nur bestimmte Mikroskope, z. B. konfokale, in Frage kommen.

Das Verfahren gemäß Anspruch 1 ist auch naheliegend, wenn man von D9 ausgeht. In D9 ist angegeben, daß mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) Moleküle oder Gene innerhalb von Zellen lokalisiert werden können. Der Fachmann weiß somit, daß mit solchen Mikroskopen die im Anspruch 1 angegebenen kleinen Volumenelemente detektiert werden können. Es ist ihm auch ohne weiteres möglich, eine einmal gefundene, für ihn interessante Zelle mit Hilfe bekannter Techniken auszusortieren.

- III. Zur Vorbereitung der mündlichen Verhandlung, die vom Beschwerdeführer hilfsweise beantragt worden war, hatte die Kammer bezüglich der erfinderischen Tätigkeit folgende nicht bindende Stellungnahme abgegeben.

D2, siehe Figuren 1 und 2 mit zugehörigem Text, offenbart ein Verfahren zur Entnahme von einem oder wenigen Bestandteilen eines Systems ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Partikeln und Zellen (gefärbte Polystyren-Mikrokügelchen und CHO-Zellen, siehe Spalte 4, Zeilen 59 bis 63) aus einem die zu entnehmenden Bestandteile enthaltenden Probevolumen (68) durch Transfer des Bestandteils oder der Bestandteile in eine andere Umgebung (70). Dabei werden Ort und Zeit der Entnahme durch ein mit dem zu entnehmenden Bestandteil korrelierendes Signal ("event parameter", siehe Spalte 3, Zeilen 59 bis 61) festgelegt, welches über ein optisches Analysesystem (45) ermittelt wird, das spezifische Moleküleigenschaften ("particle characteristics", siehe Spalte 3, Zeilen 11 bis 16) in kleinen Volumenelementen analysiert. Die Signale aus diesen Volumenelementen werden unter Verwendung eines in der Bildebene angeordneten Lichtleiters (Optical fiber 46) oder eines in der Bildebene angeordneten Multiarraydetektors (Videokamera 42) registriert. Der kleine Durchmesser der Detektorelemente (im allgemeinen CCD-Elemente) der Videokamera und der geringe Kerndurchmesser der optischen Faser haben anscheinend die Wirkung einer konfokal in der Bildebene angeordneten Lochblende.

Von diesem Stand der Technik unterscheidet sich das Verfahren nach Anspruch 1 gemäß dem mit der Beschwerdebegründung vorgelegten Hauptantrag dadurch, daß die spezifischen Moleküleigenschaften in Volumenelementen $< 10^{-14}$ l analysiert werden. Ein expliziter Wert für ein solches Volumenelement ist nämlich D2 nicht entnehmbar. Allerdings ist in D2 angegeben, daß der Durchmesser des Ablenkungsstrahls im Fokus $26 \mu\text{m}$ beträgt (siehe Spalte 4, Zeilen 41 bis 50). Da der zur Detektion der Partikel verwendete Probelaser (14) mit derselben Linse (36) fokussiert wird, kann für ihn ein ähnlicher Fokusbereich angenommen werden.

Der Fokusbereich des Probelasers sowie die Durchmesser der zu Testzwecken verwendeten Polystyren-Mikrokügelchen und CHO-Zellen von $7,5 \mu\text{m}$ bzw. $10 \mu\text{m}$ (siehe Spalte 4, Zeilen 63 bis 66 bzw. Spalte 5, Zeilen 48 bis 50) lassen auf Volumenelemente schließen, die größer als 10^{-14} l sind.

Aus D9 geht hervor, daß sich konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) zur Detektion sehr kleiner Strukturen eignet, z. B. zur **Lokalisierung** von Molekülen oder Genen **innerhalb** von Zellen mit Hilfe fluoreszenter Marker, siehe Seite 84, rechte Spalte, Zeilen 20 bis 31. Dies zusammen mit der angegebenen Auflösung ($0,1 \mu\text{m}$) und Tiefenschärfe ($0,05 \text{ nm}$) deutet auf eine Analyse in Volumenelementen hin, die in den beanspruchten Bereich fallen ($< 10^{-14} \text{ l}$). Im übrigen findet sich in D9 schon ein Hinweis auf ein verfeinertes Handhaben von Proben unter Verwendung von CLSM, siehe Seite 83, rechte Spalte, Zeilen 38 bis 42.

Was die sich auf Nahfeldmikroskopie beziehende Alternative in Anspruch 1 anbelangt, so ist auf D12 zu verweisen. Dort ist angegeben (siehe Spalte 14, Zeilen 40 bis 64), daß sich dieses Analyseverfahren für die Untersuchung von biologischem Material, insbesondere von Chromosomen eignet.

- IV. Der Beschwerdeführer hat daraufhin seinen Antrag auf eine mündliche Verhandlung zurückgezogen und beantragt, ein Patent auf der Basis der mit Schreiben vom 7. Februar 2002 eingereichten Ansprüche 1 bis 21, der Beschreibungsseiten 1 bis 23 sowie der Zeichnungen, Blätter 1/5 bis 5/5 zu erteilen. Hilfsweise wurde beantragt, die Angelegenheit an die erste Instanz zur weiteren Entscheidung zurückzuverweisen. Der Anspruch 1 lautet:

"1. Verfahren zur Analyse und präparativen Gewinnung kernhaltiger foetaler Zellen aus mütterlichem Blut, zur Funktionsbestimmung von Genprodukten definierter Gensegmente, zur Suche nach unbekanntem Pathogenen, Immunogenen oder Wirkstoffen, oder zur Auffindung des pharmakologischen Zielmoleküls zu einem bekannten Wirkstoff, dadurch gekennzeichnet, dass eine Entnahme von einem oder wenigen Bestandteilen eines Systems ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Partikeln, Bakterien, Viren, Vesikeln, Micellen und Zellen aus einem die zu entnehmenden Bestandteile enthaltenden Probevolumen erfolgt durch Transfer des Bestandteils oder der Bestandteile in eine andere Umgebung, wobei Ort und Zeit der Entnahme durch ein mit dem zu entnehmenden Bestandteil korrelierendes Signal festgelegt werden, welches durch ein optisches Analysesystem ermittelt wird, das spezifische Moleküleigenschaften in kleinen Messvolumenelementen von $< 10^{-14}$ l durch konfokale Ausleuchtung oder auf der Basis der Nahfeldspektroskopie analysiert."

Die Argumente des Beschwerdeführeres zur erfinderischen Tätigkeit lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Der neue Anspruch 1 ist auf bestimmte Applikationen gerichtet, die ein schnelles und effizientes Screening nach bestimmten Eigenschaften von Einzelpartikeln erfordern (Hochdurchsatzscreening). Die bekannten Zellsortierer basieren jedoch auf Detektortechnologien, die für das Hochdurchsatzscreening nicht geeignet sind. Bei in bekannten Zellsortierern verwendeten Detektoren handelt es sich einerseits um solche (siehe z. B. D2), die ein Volumen erfassen, das vergleichsweise groß gegenüber den Dimensionen der zu sortierenden Zellen ist, so daß das Detektionsergebnis wegen des Vorhandenseins von mehreren Partikeln in dem Volumen nicht eindeutig ist. Außerdem wird das Ergebnis durch einen relativ großen Beitrag von Hintergrundstrahlung

beeinträchtigt. Andererseits werden konventionelle, bildgebende optische Mikroskope eingesetzt (siehe ebenfalls z. B. D2), deren Bilder visuell ausgewertet werden, was für Hochdurchsatzscreening ungeeignet ist, oder mit einer Kamera erfaßt werden, was eine zeitaufwendige Bildverarbeitung erfordert. Konfokale bildgebende Mikroskope, mit denen sich einige der genannten Probleme lösen ließen, sind lediglich zur Detektion bekannt (siehe z. B. D9). Die Aufnahme eines vollständigen Bildes erfordert jedoch eine sequentielle, punktweise Abrasterung des Bildes, die wiederum zeitaufwendig ist und den Fachmann davon abhält, einen Detektor auf der Basis eines konfokalen Mikroskops in einer Sortiervorrichtung mit Hochdurchsatzscreening einzusetzen. Die Erfinder haben erkannt, daß sich eine konfokale bzw. Nahfeldanordnung dennoch in vorteilhafter Weise für diese Anwendung eignet, indem sie auf eine Abrasterung des gesamten Bildes verzichten und im einfachsten Fall das Signal nur aus einem einzigen räumlich stationär gehaltenen Meßvolumen auswerten.

- V. Am Ende der mündlichen Verhandlung, bei welcher der Beschwerdeführer nicht anwesend war, wurde die Entscheidung verkündet.

Entscheidungsgründe

Zulässigkeit

1. Die Beschwerde entspricht den in Regel 65 (1) EPÜ genannten Erfordernissen und ist daher zulässig.

Erfinderische Tätigkeit

2.1 D2, siehe Figuren 1 und 2 mit zugehörigem Text, offenbart ein Verfahren, bei dem eine Entnahme von einem oder wenigen Bestandteilen eines Systems von Partikeln (gefärbte Polystyren-Mikrokügelchen) oder Zellen (biologische Zellen, nämlich CHO-Zellen, siehe Spalte 4, Zeilen 59 bis 63) aus einem die zu entnehmenden Bestandteile enthaltenden Probevolumen (68) erfolgt durch Transfer des Bestandteils oder der Bestandteile in eine andere Umgebung (70), wobei Ort und Zeit der Entnahme durch ein mit dem zu entnehmenden Bestandteil korrelierendes Signal ("event parameter", siehe Spalte 3, Zeilen 59 bis 61) festgelegt werden, welches durch ein optisches Analysesystem (45) ermittelt wird, das spezifische Moleküleigenschaften ("particle characteristics", siehe Spalte 3, Zeilen 11 bis 16) in kleinen Meßvolumenelementen analysiert.

2.2 Von diesem Stand der Technik unterscheidet sich das Verfahren gemäß Anspruch 1 dadurch, daß

a) es speziellen Anwendungen dient, nämlich

- 1) zur Analyse und präparativen Gewinnung kernhaltiger foetaler Zellen aus mütterlichem Blut,
- 2) zur Funktionsbestimmung von Genprodukten definierter Gensegmente,
- 3) zur Suche nach unbekanntem Pathogenen, Immunogenen oder Wirkstoffen, oder
- 4) zur Auffindung des pharmakologischen Zielmoleküls zu einem bekannten Wirkstoff,

- b) daß die spezifischen Moleküleigenschaften in Meßvolumenelementen von $< 10^{-14}$ l analysiert werden, wobei
- c) die Analyse durch konfokale Ausleuchtung oder auf der Basis der Nahfeldspektroskopie erfolgt.

2.3 Ausgehend von D2, worin schon als mögliche Anwendungen solche im Bereich der Zellbiologie und Immunologie sowie in anderen Gebieten der biomedizinischen Forschung genannt sind (siehe Spalte 1, Zeilen 12 bis 15), liegt der vorliegenden Erfindung bezüglich des Merkmals a) die Aufgabe zugrunde, spezielle Anwendungen anzugeben. Hierzu geht aus D9 hervor, daß sich konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) zur Detektion sehr kleiner Strukturen eignet, z. B. zur Lokalisierung von Molekülen oder **Genen** innerhalb von Zellen mit Hilfe fluoreszenter Marker, siehe Seite 84, rechte Spalte, Zeilen 20 bis 31. Da D9 somit in die Richtung der sich auf Genprodukte beziehenden Anwendung unter 2) weist, war es für einen Fachmann naheliegend, zur Erhöhung der Meßempfindlichkeit auch die in D9 beschriebene Detektionsmethode mit konfokaler Ausleuchtung der Meßvolumenelemente zu verwenden, wie es einer Alternative von Merkmal c) entspricht. Die in D9 angegebene Auflösung ($0,1 \mu\text{m}$) und Tiefenschärfe ($0,05 \text{ nm}$) lassen nämlich auf eine Analyse in Meßvolumenelementen schließen, die in dem gemäß Merkmal b) beanspruchten Bereich $< 10^{-14}$ l liegen.

2.4 Ein konfokales Detektionsverfahren gemäß D9 ist auch mit dem in D2 beschriebenen Verfahren kompatibel, da dort die Signale aus den Meßvolumenelementen unter Verwendung eines in der Bildebene angeordneten Lichtleiters (Optical fiber 46) oder eines in der Bildebene angeordneten Multiarraydetektors (Videokamera 42) registriert werden. Der kleine Durchmesser der Detektorelemente (im allgemeinen CCD-Elemente) der

Videokamera und der geringe Kerndurchmesser der optischen Faser haben bei entsprechender konfokaler Ausleuchtung, wie sie ebenfalls ohne Weiteres in D2 zu verwirklichen ist, die Wirkung einer konfokal in der Bildebene angeordneten Lochblende, die bei einer konfokalen Anordnung üblich und auch in D9 in Figur 1 gezeigt ist.

2.5 Der Anmelder hat argumentiert, daß die im Anspruch 1 genannten Applikationen ein Durchmustern von Proben mit hohem Durchsatz erfordern (Hochdurchsatzscreening), wofür weder D2 aufgrund der ungenügenden Auflösung und Empfindlichkeit noch D9 wegen des nötigen Abrasterns (Scannens) zur Bildaufnahme geeignet seien.

2.6 Dieses Argument ist jedoch nicht überzeugend. Abgesehen davon, daß das beanspruchte Verfahren nicht auf ein Hochdurchsatzscreening beschränkt ist, muß festgestellt werden, daß sich das in D2 beschriebene Verfahren durchaus für ein Hochdurchsatzscreening eignet, nachdem die Entnahme von Teilchen mit Hilfe der Detektion mittels Faser 46 und Photomultiplier 48, der nachfolgenden Auswertung 54 und der Ansteuerung 56 des Modulators 30 für den Ablenkklaserstrahl 12" automatisch gesteuert wird. Die Wahl einer geeigneten Größe des Meßvolumens ergibt sich dabei für den Fachmann durch einfache Überlegungen hinsichtlich Teilchengröße, Konzentration und Durchsatz. Der Fachmann wußte, daß sich mit konfokalen Anordnungen prinzipiell das Auflösungsvermögen und die Empfindlichkeit verbessern lassen. Es gab für ihn keinen Grund, die in D9 für biologische Anwendungen beschriebene konfokale Lasermikroskopie nur im Zusammenhang mit einem Scannen eines kompletten Bildes zu verwenden, da es bei der in D2 beschriebenen automatisierten Betriebsweise auch nicht auf die Aufnahme eines kompletten Bildes, sondern

nur von Einzelsignalen aus einem kleinen Meßvolumen ankam. Konfokale Anordnungen zum Nachweis einzelner Moleküle ohne Scannen sind im übrigen bekannt, siehe D14, Figur 1.

3. Damit erschließt sich dem Fachmann ein Verfahren gemäß einer der dem Anspruch 1 entnehmbaren Alternativen in naheliegender Weise. Auch unter Berücksichtigung der wesentlichen Argumente des Anmelders ergibt sich daher, daß das Verfahren gemäß Anspruch 1 nicht auf einer erfinderischen Tätigkeit im Sinne von Artikel 56 EPÜ beruht. Deshalb ist sein Hauptantrag zurückzuweisen. Bezüglich des Hilfsantrags (siehe Ziffer IV oben) übt die Kammer das ihr durch Artikel 111 EPÜ eingeräumte Ermessen dahingehend aus, daß sie den Fall nicht an die erste Instanz zurückverweist, da die im Beschwerdeverfahren zum Anspruch 1 vorgeschlagenen Änderungen keine weitere Sachprüfung erforderlich machen (T 63/86, ABl. EPA 1988, 224).

Entscheidungsformel

Aus diesen Gründen wird entschieden:

Die Beschwerde wird zurückgewiesen.

Der Geschäftsstellenbeamte:

Der Vorsitzende:

P. Martorana

E. Turrini