

**JOSE LLOREDA CAMACHO & CO.**

**ABOGADOS**

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



**No. 05-090928- -00009-0000**

Fecha: 2010-12-23 16:56:08 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII  
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 9

Señor

SUPERINTENDENTE DE INDUSTRI.

E. \_\_\_\_\_ S. \_\_\_\_\_ D. \_\_\_\_\_

Re: P1.-GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.-Solicitud de Patente de Invención en Fase Nacional PCT para "PROCESO DE PURIFICACIÓN PARA CITOLISINA BACTERIANA".-Clase C07K 14/315.-Expediente número 05-090.928.-

1. Me refiero al auto dictado por ese Despacho notificado por fijación en lista de 1 de Octubre de 2010.

2. Con el fin de responder las objeciones expuestas por el Señor Examinador en su Concepto Técnico No. **3129** en relación con los requisitos de Claridad y Nivel inventivo, me permito presentar las siguientes modificaciones y argumentos técnicos por medio de los cuales se superan completamente dichas objeciones.

**3. MODIFICACIONES A LA SOLICITUD**

Inicialmente me permito manifestar que el solicitante ha decidido modificar de la siguiente manera el capítulo reivindicatorio:

- En la reivindicación 1:
  - se ha reemplazado la frase 'citolisina bacteriana' por la nueva frase 'neumolisina neumocócica', de conformidad con lo establecido, por ejemplo, en la reivindicación 3 presentada originalmente;
  - se ha definido que el detergente es lauroil sarcosinato de sodio y está presente en una concentración entre 0,1% y 5% (p/v), de conformidad con lo establecido, por ejemplo, en las reivindicaciones 8 y 13 presentadas originalmente;
  - se ha definido que el material cromatográfico es fenil-sefarosa, lo anterior de acuerdo con lo mencionado en la reivindicación 11 presentada originalmente;

- se ha establecido que la sal es seleccionada del grupo conformado por: cloruro de sodio, cloruro de magnesio, cloruro de amonio, sulfato de sodio, sulfato de magnesio, sulfato de amonio, fosfato de sodio, fosfato de magnesio y fosfato de amonio, lo anterior de conformidad con la reivindicación 15 presentada originalmente;
  - se incluyeron los nuevos pasos e), f), g) y h) para el proceso de purificación reivindicado, los cuales son opcionales y encuentran pleno sustento en, por ejemplo, las reivindicaciones 19, 21 a 23, 28 y 31 a 32 actualmente presentadas, respectivamente.
- Las nuevas reivindicaciones 2 a 9 corresponden a las reivindicaciones 4, 5, 9 y 16 a 20 actuales, respectivamente;
  - La nueva reivindicación 10 corresponde básicamente a la reivindicación 21 actualmente presentada, en la cual sin embargo se ha adicionado la frase 'el cual comprende los pasos f) y g)', y en la cual se ha reemplazado la frase 'citolisina bacteriana' por la nueva frase 'neumolisina neumocócica';
  - La nueva reivindicación 11 corresponde básicamente a la reivindicación 22 actualmente presentada, en la cual únicamente se ha definido la concentración de clorhidrato de guanidina (5-8 M), de conformidad con lo mencionado en la reivindicación 23 originalmente presentada;
  - Las nuevas reivindicaciones 12 y 13 corresponden básicamente a las reivindicaciones 24 y 25 actuales, en las cuales sin embargo se ha reemplazado la frase 'citolisina bacteriana' por la nueva frase 'neumolisina neumocócica'; y,
  - Las nuevas reivindicaciones 14 a 20 corresponden a las reivindicaciones 26 a 31 y 33 actuales, respectivamente.

Adicionalmente, el solicitante ha decidido **eliminar las reivindicaciones 2, 3, 6 a 8, 10 a 15, 23, 32 y 34 a 41** presentadas originalmente, razón por la cual el nuevo capítulo reivindicatorio de la solicitud está compuesto por 20 reivindicaciones.

Finalmente, y de conformidad con lo mencionado previamente me permito manifestar que el nuevo capítulo reivindicatorio no amplía de manera alguna el alcance de protección de la solicitud de patente presentada originalmente, y por

lo tanto cumple a cabalidad con los requisitos establecidos en el artículo 34 de la Decisión 486 de 2000.

4. **Claridad de las Reivindicaciones**

Ahora bien, el señor Examinador ha objetado la claridad del capítulo reivindicatorio aduciendo lo siguiente:

- *"La reivindicación principal hace referencia a un proceso de purificación de una citolisina bacteriana. Para definir claramente este proceso en la reivindicación independiente debe:*
  - a. *Indicarse todas las etapas que lo conforman en la reivindicación principal o indicarse si estas etapas son opcionales con reivindicaciones dependientes. Esto debe aclararse respecto a las reivindicaciones 2 y 30;*
  - b. *Especificar todos los elementos que lo componen:*
    - i. *tipo de soporte estacionario (reivindicación 11),*
    - ii. *tipo de detergente empleado (reivindicación 13) y concentración del mismo (reivindicación 8),*
    - iii. *tipo de citolisina bacteriana purificada (reivindicación 3),*
    - iv. *tipo de sales empleadas (reivindicación 15) y,*
    - v. *demás especificaciones necesarias para las etapas complementarias (reivindicaciones 21-29, 31, 32)"*

Atendiendo a lo anterior y de conformidad con lo mencionado en el numeral 3 del presente memorial, me permito manifestar que la reivindicación 1 ha sido modificada con el objetivo de definir la proteína específica a purificar, así como el detergente, el material cromatográfico y la sal que pueden ser empleados como parte del proceso reivindicado.

Así mismo, en dicha reivindicación 1 se han incluido cuatro (4) nuevos pasos como parte del proceso de purificación, los cuales permiten especificar aún más las características técnicas de dicho proceso. Sin embargo, en este punto resulta de gran importancia aclarar que tales nuevos pasos son opcionales, toda vez que, por ejemplo, si el detergente es retenido la proteína se mantiene ventajosamente en forma de agregados solubles. Por su parte, la conjugación de la neumolisina purificada únicamente es necesaria para la producción de formulaciones de vacuna, sumado a que es bien sabido que la neumolisina es un buen inmunógeno y

no requiere conjugación para generar respuestas inmunes celulares y humorales.

- *"Hay reivindicaciones que pretenden proteger un producto a través de su proceso de obtención, éstas son las reivindicaciones 34 a 41 cuyo preámbulo se refiere al proceso de purificación de una citolisina pero que en la parte caracterizante tratan sobre una formulación que contiene una citolisina bacteriana"*

En respuesta a lo anterior me permito señalar que el solicitante ha decidido eliminar las reivindicaciones 34 a 41 presentadas originalmente, con lo cual se supera completamente la objeción realizada por el señor Examinador a éste respecto.

- *"Las reivindicaciones relacionadas con la formulación que contiene conjugado neumolisina-polisacárido carecen de claridad, puesto que las pruebas inmunológicas y de formulación fueron realizadas únicamente en ratones y por tanto no se puede hacer una generalización respecto a su uso. Además, si se pretende proteger esta formulación debe indicarse los elementos y proporciones que la componen y reivindicarse como un producto (reivindicaciones 34-41)"*

Como se manifestó previamente, el solicitante ha decidido **eliminar las reivindicaciones 34 a 41** de la solicitud, con lo cual se supera completamente la objeción realizada por el señor Examinador a éste respecto.

- *"Dado que el aporte de la invención está en el proceso de purificación de la pneumolisina bacteriana y específicamente en el efecto del detergente en la purificación por HIC, la concentración de este elemento (reivindicada en la cláusula dependiente 8) debe ser detallada en la reivindicación principal, tal como se hace con las condiciones de sal. Lo anterior teniendo en cuenta que la reivindicación principal debe contener todas las etapas y condiciones usadas para realizar el proceso."*

En respuesta a lo anterior, me permito destacar una vez más ante ese Despacho que en la nueva reivindicación 1 se ha definido que el detergente empleado durante el proceso de purificación es lauroil sarcosinato de sodio en una concentración que varía entre 0,1% y 5% p/v.

Finalmente, en vista de lo anteriormente mencionado me permito manifestar que el nuevo capítulo reivindicatorio de la solicitud cumple a cabalidad con las disposiciones de patentabilidad establecidas en el artículo 30 de la Decisión 486 de 2000, toda vez que es claro, conciso y presenta pleno sustento en la descripción de la solicitud.

**5. Análisis del nivel inventivo de la solicitud**

De otro lado, el señor Examinador ha objetado el nivel inventivo de la solicitud en cuestión basándose en las enseñanzas de los siguientes documentos:

(D1) → **Gilbert R., et al., J. Mol. Biol. (1998) 284: 1223-1237**

(D3) → **Queiroz, J. et al., *Journal of Biotechnology* 87 (2001): 143-159**

(D4) → **WO 96/05859**

En este sentido, el señor Examinador argumenta básicamente que en el documento D1 se enseñan métodos de purificación para citolisina bacteriana, y que la única diferencia entre dicha anterioridad y la solicitud en estudio es el proceso simplificado de elucidación de la proteína que se revela en la solicitud mediante el uso del detergente. Sin embargo, de acuerdo con el señor Examinador, la optimización de la técnica de cromatografía por interacción hidrofóbica por medio de la utilización de detergente para incrementar la pureza de proteínas ya había sido sugerida por D3. Por lo tanto, el señor Examinador asevera que el experto en la materia habría podido realizar la extracción de pneumolisina a partir de una técnica como la divulgada en D1 y optimizarla a partir de la información divulgada en D3, sin requerir de una actividad inventiva.

Por otra parte, de acuerdo con el señor Examinador el uso de la pneumolisina para la preparación de compuestos inmunógenos, incluso en moléculas conjugadas, ya había sido divulgado en el documento D4, a tal punto que la única diferencia entre dicha anterioridad y la solicitud es que D4 utiliza un método de purificación diferente para obtener la pneumolisina, lo cual, sin embargo, no le confiere actividad inventiva.

Visto lo anterior y con el ánimo de demostrar ante ese Despacho el inequívoco carácter inventivo de la invención en cuestión frente a las enseñanzas de los documentos D1, D3 y D4, a continuación me permito señalar los siguientes aspectos técnicos:

**Frente a las enseñanzas del documento D1:**

(a) D1 básicamente se encuentra dirigido a demostrar la capacidad que presenta la proteína neumolisina neumocócica para auto-asociarse en solución y formar estructuras oligoméricas. En este sentido, y como parte de las pruebas experimentales realizadas por los autores de dicha anterioridad también se divulga un método de purificación de neumolisina utilizando una columna cromatográfica de fenil-sefarosa. Sin embargo, el método de purificación allí enseñado se diferencia de aquel revelado en la solicitud de patente en cuestión por las siguientes razones:

- i. De acuerdo con las enseñanzas de D1, la neumolisina se enlaza a la columna de fenil-sefarosa empleando una concentración de sal de 250 mM, es decir, empleando una concentración mucho menor a aquella definida en la reivindicación 1 de la presente invención, toda vez que la concentración de sal definida por el solicitante de la invención en cuestión es 0,6 - 2 M y se selecciona del grupo conformado por cloruro de sodio, cloruro de magnesio, cloruro de amonio, sulfato de sodio, sulfato de magnesio, sulfato de amonio, fosfato de sodio, fosfato de magnesio y fosfato de amonio;
- ii. En el método de purificación de neumolisina enseñado en el documento D1 no se emplea detergente, mientras que el proceso revelado en la presente invención emplea lauroil sarcosinato de sodio en una concentración entre 0,1% y 5% p/v; y,
- iii. Como consecuencia de lo anterior, durante el proceso de purificación divulgado en D1 la neumolisina neumocócica no está presente en la forma de un agregado soluble.

(b) Tales diferencias en el proceso de purificación permiten que la neumolisina tenga una mejor capacidad de enlace con la columna cromatográfica, hecho que implica que los procesos de carga y de elución sean más eficientes.

Lo anterior se demuestra al tener en cuenta que mediante el proceso divulgado en D1 tan sólo se logra una purificación parcial de la neumolisina luego de la interacción cromatográfica hidrofóbica, razón por la cual resulta necesaria la utilización de una segunda columna de intercambio aniónico para llevar a cabo una purificación adicional de la proteína. Contrario a esto, el novedoso proceso de purificación revelado por el solicitante de la invención en cuestión permite lograr entre un 98% y un 100% de pureza de

la neumolisina mediante un único paso cromatográfico, hecho que es demostrado, por ejemplo, mediante los resultados experimentales revelados en la figura 1 de la solicitud de patente en cuestión, donde en el Panel A se muestra el grado de purificación de la neumolisina empleando azul de Coomassie, mientras que en el Panel B se muestra la ausencia de proteína contaminante utilizando un procedimiento de manchado Western que emplea anticuerpos anti E.Coli.

(c) De acuerdo con lo anterior, es claro que el solicitante de la presente invención logró desarrollar un proceso de purificación que permite optimizar el enlace de la citolisina a una columna cromatográfica de fenil-sefarina mediante el uso de altas concentraciones de sal y adicionando lauroil sarcosinato de sodio al buffer de carga. Específicamente, es claro que dichas modificaciones permitieron mejorar el enlace de la neumolisina a la columna cromatográfica debido a que bajo esas condiciones se forma un agregado soluble en el que las unidades de proteína adquieren una estructura de poro que les permite enlazarse a la fenil-sefarosa bajo condiciones en las que muy pocas proteínas lo hacen.

Por lo tanto, es claro que el proceso de purificación de neumolisina revelado en la solicitud de patente en cuestión presenta un inequívoco carácter inventivo frente a las enseñanzas del documento D1.

**Frente a las enseñanzas del documento D3:**

(a) Ahora bien, el documento Queiroz, J. et al., *Journal of Biotechnology* 87 (2001): 143-159 divulga básicamente una revisión general del proceso de interacción cromatográfica hidrofóbica de proteínas. Sin embargo, es claro que en dicha anterioridad no se enseña y tampoco se sugiere un proceso de purificación de neumolisina citocócica que implique el empleo de lauroil sarcosinato de sodio en una concentración entre 0,1% y 5% p/v, así como el empleo de sal a una concentración entre 0,6 - 2M seleccionada entre cloruro de sodio, cloruro de magnesio, cloruro de amonio, sulfato de sodio, sulfato de magnesio, sulfato de amonio, fosfato de sodio, fosfato de magnesio y fosfato de amonio. Así mismo, en D3 tampoco se menciona la capacidad de la neumolisina para formar agregados solubles en la presencia de detergente y a altas concentraciones de sal.

(b) De conformidad con lo anterior y a partir de la atenta lectura de D3 es claro que dicho documento simplemente enseña de manera general algunas opciones para alterar los procesos cromatográficos que implican la

interacción cromatográfica hidrofóbica de proteínas, más de ninguna forma divulga los requerimientos específicos para llevar a cabo la purificación de proteínas particulares, por ejemplo, de citolisinas bacterianas.

(c) Aparte de lo anterior, considero de gran importancia mencionar que mientras en el proceso específico de purificación de neumolisina revelado en la solicitud de patente en cuestión la adición de detergente permite la formación de agregados solubles de proteína (y por ende la formación de unidades que adquieren una estructura de poro que les permite enlazarse de manera óptima a fenil-sefarosa), en el documento D3 se menciona la posible adición de detergente tan sólo como un mecanismo que permite mejorar la solubilidad de la proteína, modificar la conformación de la proteína ó promover la elución de las proteínas enlazadas.

Como consecuencia de lo anterior, es claro que la persona medianamente versada en la materia no encuentra en el documento D3 alguna indicación técnica que el sugiera las características técnicas específicas que permiten lograr la purificación completa de neumolisina citotóxica mediante un proceso cromatográfico de un solo paso.

**Frente a la combinación de los documentos D1 y D3:**

De acuerdo con el examinador, habría sido obvio para la persona medianamente combinar las enseñanzas de D1 con aquellas del documento D3 para lograr el proceso de purificación revelado en la solicitud de patente en cuestión. Lo anterior no es cierto por las siguientes razones:

(a) D1 difiere de lo revelado en la presente invención porque no enseña o sugiere la adición de detergente y tampoco la concentración de sal requerida para permitir la formación de agregados solubles de citolisina y su posterior purificación mediante un único paso cromatográfico.

(b) Por su parte, las enseñanzas del documento D3 de ninguna manera complementan la información técnica divulgada en D1, toda vez que dicha anterioridad tampoco enseña o sugiere el aumento en la concentración de sal, así como tampoco enseña que la adición de lauroil sarcosinato de sodio a una concentración de entre 0,1% y 5% p/v permite la formación de agregados solubles de neumolisina de manera que las unidades de dicha proteína adquieren una estructura de poro que les permite enlazarse de manera óptima a la fenil-sefarosa.

En este punto resulta de gran importancia destacar una vez más ante ese Despacho que en la columna derecha de la página 150 del documento D3 claramente se menciona que la eventual adición de detergente promueve la elución de las proteínas unidas a la columna cromatográfica, de manera que para la persona medianamente versada en la materia la adición de detergente tan sólo representa un mecanismo para limpiar la columna luego de su uso, eluyendo todo el material que permanece enlazado incluso luego de llevar a cabo eluciones a bajas concentraciones de sal.

En consecuencia, es claro que la persona medianamente versada en la materia que hubiera pretendido mejorar las condiciones de enlace entre la neumolisina neumocócica y fenil-sefarosa dentro de una columna cromatográfica no habría encontrado en el documento D3 indicación técnica alguna sugiriéndole el aumento en la concentración de sal y la adición de lauroil sarcocinato de sodio (detergente) al buffer de carga.

(c) Adicionalmente, considero de gran importancia resaltar que el método de purificación de neumolisina divulgado en el documento D1 es una versión ligeramente modificada del proceso desarrollado por T. J. Mitchell en 1989, el cual, sin embargo, ha sido utilizado durante los últimos años como método estándar para la purificación de dicha proteína. Visto lo anterior, la pregunta que surge es la siguiente:

Si resulta obvio obtener los resultados experimentales descritos en la solicitud de patente en cuestión a partir de las enseñanzas del estado de la técnica anterior, ¿por qué desde el año 1989 nadie había realizado las modificaciones necesarias en el proceso descrito por J. T. Mitchell para optimizar la purificación de neumolisina?

La respuesta a dicha pregunta es que el novedoso proceso revelado en la presente invención, el cual permite de manera sorprendente llevar a cabo la purificación de neumolisina citocócica mediante un proceso cromatográfico de un sólo paso y haciendo uso de altas concentraciones de sal y lauroil sarcosinato de sodio como detergente, no habría podido ser desarrollado por una persona medianamente versada en la materia sin poner en práctica su habilidad inventiva.

Como consecuencia de lo anteriormente expuesto, me permito manifestar que el nuevo capítulo reivindicatorio de la solicitud en cuestión es inventivo

frente a las enseñanzas de los documentos D1 y D3 señalados por el señor Examinador en su Concepto Técnico N° **3129**, cumpliendo por lo tanto a cabalidad con las disposiciones de patentabilidad establecidas en el Artículo 18 de la Decisión 486 de 2000.

Por último, con respecto a las objeciones de nivel inventivo en contra de las reivindicaciones 34 a 41, las cuales fueron formuladas por el señor Examinador con base en la información técnica divulgada en el documento D4, atentamente me permito señalar que el solicitante ha decidido **eliminar dichas reivindicaciones 34 a 41**, con lo cual se supera completamente cualquier objeción realizada a éste respecto.

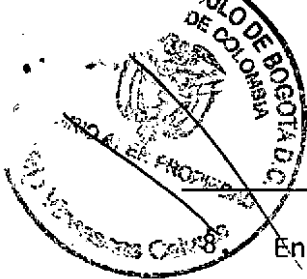
## 6. CONCLUSIÓN

De conformidad con lo mencionado en el presente memorial, me permito manifestar que el capítulo reivindicatorio de la invención en cuestión, tal como ha sido modificado, es claro, conciso y presenta pleno sustento en la descripción de la solicitud.

Así mismo, es claro que dicho nuevo capítulo reivindicatorio presenta un inequívoco carácter inventivo frente a las enseñanzas de los documentos Gilbert R., et al., J. Mol. Biol. (1998) 284: 1223-1237 (D1), Queiroz, J. et al., *Journal of Biotechnology* 87 (2001): 143-159 (D3) y WO 96/05859 (D4), toda vez que ninguna de dichas anterioridades le indica a la persona medianamente versada en la materia técnica en cuestión que el empleo de altas concentraciones de sal y la adición de lauroil sarcosinato de sodio como detergente al buffer de carga permiten optimizar el proceso de purificación de la proteína neumolisina citocócica, lográndose entre el 98% y el 100% de pureza luego de un único paso cromatográfico.

Por lo tanto, teniendo en cuenta los argumentos técnicos expuestos en el presente memorial, resulta completamente claro que se han superado las objeciones presentadas por el señor Examinador en su Concepto Técnico, y por lo tanto, dicha invención es merecedora del privilegio de patente solicitado.

7. Anexo al presente memorial me permito presentar una copia del nuevo capítulo reivindicatorio de la presente solicitud (compuesto por 20 reivindicaciones), el cual reemplaza al actualmente presentado y en el que se han realizado las modificaciones mencionadas previamente en el presente escrito.



## JOSE LLOREDA CAMACHO & CO.

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

En vista de lo anterior, ruego a usted proceder a estudiar nuevamente la solicitud a la luz las modificaciones y los argumentos presentados y conceder el privilegio de patente solicitado.

Señor Superintendente,

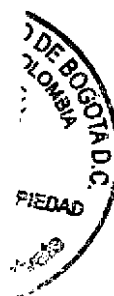
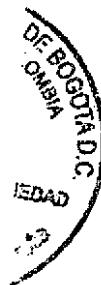
  
ALICIA LLOREDA RICAURTE

T. P. 53.215

NOTARIA 41 DEL CÍRCULO DE BOGOTÁ D.C.  
DEPARTAMENTO DE CUNDINAMARCA  
REPÚBLICA DE COLOMBIA

El Notario 41 del círculo de Bogotá, da fe de que compareció personalmente: Alicia Lloreda Ricaurte  
identificada (o) con: 39.690.713 y tarjeta  
profesional de abogado No. 53.215 del Consejo  
Superior de la Judicatura, quien autentica la firma puesta por ella  
(el) mismo en este escrito.  
(Art. 84 C. P. C. Decreto. 2282/99 mod. 36)

Bogotá D.C. 09 de Dic. 2010  
  
ALICIA LLOREDA RICAURTE  
C.C. No. 39.690.713 de Usaquén: E



Maximiliano  
C.C. No. 39.393.013  
Yor

## REIVINDICACIONES

1. Un proceso para la purificación de una neumolisina neumocócica, que comprende los pasos de:
  - a) cultivar un cultivo de células que expresan neumolisina neumocócica;
  - b) preparar un extracto a partir del cultivo que contiene neumolisina neumocócica;
  - c) enlazar la neumolisina neumocócica de agregado soluble contenida en el extracto, en presencia de 0,1-5% (p/v) de detergente que es lauroil sarcosinato de sodio, a un material de cromatografía de fenil-sefarosa, bajo condiciones de sal alta (preferiblemente sal 0,6-2 M), donde la sal es seleccionada del grupo consistente de cloruro de sodio, cloruro de magnesio, cloruro de amonio, sulfato de sodio, sulfato de magnesio, sulfato de amonio, fosfato de sodio, fosfato de magnesio, fosfato de amonio;
  - d) eluir la neumolisina neumocócica en presencia de 0,1-5% (p/v) de detergente que es lauroil sarcosinato de sodio bajo condiciones de sal baja (preferiblemente sal 0-0,2M), donde la sal es seleccionada del grupo consistente de cloruro de sodio, cloruro de magnesio, cloruro de amonio, sulfato de sodio, sulfato de magnesio, sulfato de amonio, fosfato de sodio, fosfato de magnesio, fosfato de amonio;
  - e) opcionalmente remover el detergente de la neumolisina neumocócica;
  - f) opcionalmente solubilizar la neumolisina neumocócica mediante la adición de un desnaturalizante que contiene 5-8 M de clorhidrato de guanidina ó 5-9 M de úrea;
  - g) opcionalmente remover el desnaturalizante de la neumolisina neumocócica mediante diafiltración o diálisis; y,
  - h) opcionalmente destoxificar la neumolisina neumocócica mediante tratamiento químico con un reactivo de reticulación, en donde el reactivo de reticulación contiene uno o más químicos seleccionados del grupo consistente de:

formaldehído, glutaraldehído, N-hidroxisuccinimido ésteres y GMBS.

2. El proceso de la reivindicación 1, en donde el paso b) involucra el rompimiento mecánico de las células.
3. El proceso de las reivindicaciones 1-2, en donde el paso b) involucra el tratamiento con detergente.
4. El proceso de cualquier reivindicación anterior, en donde el paso b) involucra la centrifugación de material de célula deteriorado y recolección de un sobrenadante como el extracto del paso c).
5. El proceso de cualquier reivindicación anterior, en donde las condiciones usadas en el paso c) y/o paso d) están entre pH 6-8, preferiblemente alrededor de pH 7.
6. El proceso de cualquier reivindicación anterior, en donde las condiciones usadas en el paso d) contienen sal 0-0,1 M.
7. El proceso de la reivindicación 6, en donde las condiciones usadas en el paso d) contienen sal 0-40 mM.
8. El proceso de cualquier reivindicación anterior, en donde el paso e) involucra la remoción de detergente mediante diafiltración o diálisis.
9. El proceso de la reivindicación 8, en donde la diafiltración/diálisis es contra un amortiguador bajo en sal de pH 8-10, preferiblemente alrededor de pH 9.
10. El proceso de las reivindicaciones 1-9, el cual comprende los pasos f) y g), en donde el paso f) involucra la desnaturalización de la neumolisina neumocócica mediante la adición de un desnaturalizante, y el paso g) involucra el repliegue de la citolisina bacteriana mediante la remoción gradual del desnaturalizante.

11. El proceso de las reivindicaciones 1-10, en donde el desnaturalizante usado en el paso f) es clorhidrato de guanidina 5-8 M.
12. El proceso de la reivindicación 11, en donde la neumolisina neumocócica es contactada con úrea 5-9 M durante el paso f).
13. El proceso de la reivindicación 12, en donde el paso f) involucra contactar la neumolisina neumocócica con clorhidrato de guanidina 5-8 M, seguido del intercambio del clorhidrato de guanidina por úrea 5-9 M.
14. El proceso de las reivindicaciones 10-13, en donde un agente reductor está presente durante al menos parte de los pasos f) y g).
15. El proceso de la reivindicación 14, en donde el agente reductor es DTT 0,1-10 mM.
16. El proceso de las reivindicaciones 1-15, en donde el paso g) involucra la remoción del desnaturalizante mediante diafiltración o diálisis.
17. El proceso de la reivindicación 16, en donde la diafiltración o diálisis es contra una solución de pH 7-9.
18. El proceso de cualquier reivindicación anterior, que comprende el paso adicional h) de destoxificación de la citolisina bacteriana mediante tratamiento químico con un reactivo de reticulación.
19. El proceso de la reivindicación 18, en donde el tratamiento químico involucra el uso de un agente de reticulación que es reactivo con grupos amina y sulfhidrilo.
20. El proceso de cualquier reivindicación anterior, que comprende un paso adicional de conjugar la citolisina bacteriana a un polisacárido capsular bacteriano.