



Organización CSA Ltda

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DVN
NOB

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

D

SOLICITUD

PCT

PATENTE DE INVENCION

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

07-117690

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO "SEPARACION DE CONTAMINANTES DE
POLIDACARIDOS DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE
MEDIANTE MANIPULACION DE PH"

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE WETH

DOMICILIO NUEVA JERSEY, ESTADOS UNIDOS

74. APODERADO ALVARO CORREA OROOÑEZ
T.P. 20.281

22. BOGOTÁ, D. C., NOVIEMBRE 7, 2007

Weth

PETITORIO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-117690- -00000-0000

Fecha: 2007-11-07 16:24:15 Dep. 2020 NUECREACIONE...
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 99

ción

FORMULARIO ÚNICO DE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

08 Nov- 2007

1

SOLICITUD DE :

☒

Patente de Invención

☐

Patente de Modelo de Utilidad

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: WYETH

Dirección: Five Giralda Farms, Madison, New Jersey 07940, Estados Unidos de América

Nacionalidad o Domicilio: Nueva Jersey, Estados Unidos de América

Lugar de Constitución: Delaware, Estados Unidos de América

Teléfono:

Fax:

E-Mail

IDENTIFICACION

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

Dirección: Avenida 82 No.10-62 Piso 6

Teléfono: 634 1500

Fax: 376 2211

E-Mail: office.bogota@bakernet.com

IDENTIFICACION

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

79.143.366 de
Usaquén

TP 20.281

4

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: BAHLER, Brian; LEE, Tsu-shun; LOTVIN, Jason Arnold; RUPPEN, Mark Edward y CHARBONNEAU, Pamela Sue Fink

Dirección: 308 Kellyridge Drive, Apex, NC 27502, Estados Unidos de América, 101 Millers Creek Drive, Cary, NC 27519, Estados Unidos de América, 171 Country Club Drive #7, Union, NJ 07083, Estados Unidos de América, 6 Lea Avenue, Garnerville, NY 10923, Estados Unidos de América, 8 Eldor Avenue, New City, NY 10956, Estados Unidos de América, respectivamente

Nacionalidad o Domicilio: Estadounidense, Chino, Estadounidense, Estadounidense y Estadounidense, respectivamente

5

PCT (85)

Solicitud Internacional No. PCT/US2006/012134

Fecha 31-MAR-06

Publicación Internacional No. WO/2006/110352

Fecha 19-OCT-06

6

Título (54)

SEPARACIÓN DE CONTAMINANTES DE POLISACÁRIDOS DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE
MEDIANTE MANIPULACIÓN DE PH

7

Clasificación Internacional (51)

C08B 37/00, A61K 39/09

8

Prioridad

SI ☒

NO ☐

(33) Pais de Origen

US

(32) Fecha

08-ABR-05

(31) Número de Solicitud

60/669,546

9

Comprobante de pago No. 07-76787

Fecha 21-SEP-07

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página

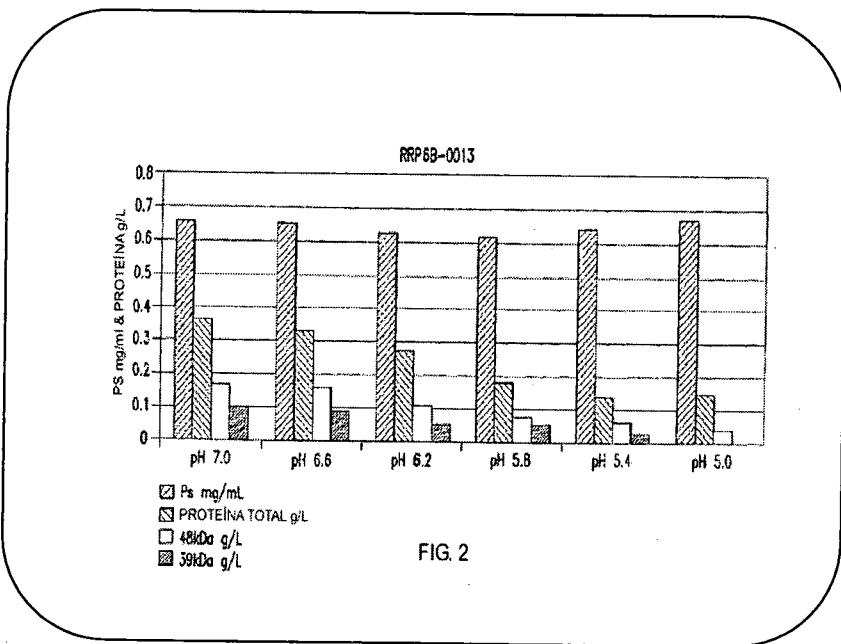
10

ANEXOS

00002

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Poderes, si fuere el caso
- ☒ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA)
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 x 12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Extractos, Formulario de modificación y recibo, Reporte preliminar Internacional Cap. I y notificación de presentación de documento de prioridad.

11 FIGURA CARACTERISTICA



12 Solicito la concesión de la patente.

NOMBRE: ALVARO CORREA ORDÓÑEZ

FIRMA:

C.C. 79.143.366 de Usaquén

T.P. 20/281

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página

00000019

000003

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 76,787
FECHA : SEPTIEMBRE 21 DE 2007

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-117690- -00000-0000

Fecha: 2007-11-07 16:24:15 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 99

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
RAISBECK LARA RODRIGUEZ	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	69421918	21/09/2007	46,018,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	482,000.00
		TOTAL :	\$ 482,000.00

SUN: CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

000004

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 431/07 de un documento escrito en inglés, el cual para su identificación se sella con el sello del Traductor. Esta es una Traducción Oficial efectuada el día 8 de octubre de 2007 por la Sra. María Teresa Lara, c.c. 41.568.055 de Bogotá, Traductora Oficial según Resolución No. 01016 del 2 de octubre de 1998, expedida por el Ministerio de Justicia.

=====

Cesión a WYETH del invento "Separación de contaminantes del polisacárido del Streptococcus Pneumoniae mediante manipulación del pH". Certificación notarial suscrita por Barbara A. Kiely, Notario Público del estado de Nueva Jersey, y legalizaciones subsiguientes.

AM101821

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 01016
DE MINISTERIO DE JUSTICIA

DECLARACIÓN JURAMENTADA

Yo, Michelle L. McGowan, Asociada para Legalizaciones, Wyeth, certifico por la presente que la copia adjunta ha sido comparada con la Cesión original (para la U.S.S.N. 60/669,546, y cualquier equivalente legal de la misma en un país extranjero, para el invento titulado: "SEPARACIÓN DE CONTAMINANTES DEL POLISACÁRIDO DEL STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE MEDIANTE MANIPULACIÓN DEL pH") fechada el 16 de marzo de 2006 de Jarson Arnold Lotvin; y fechada el 21 de marzo de 2006 de Mark Edward Ruppen y Pamela Sue Fink Charbonneau; y fechada el 23 de marzo de 2006 de Brian Bahler y Tsu-shun Lee a Wyeth y que la citada copia es fiel copia del original.

Dado a los 30 días del mes de agosto de 2007, en Madison, Nueva Jersey, Estados Unidos de América.

Wyeth

(Fdo.) Michelle L. McGowan
Michelle L. McGowan

PARA USO EN COLOMBIA

00005

RECONOCIMIENTO

Estado de Nueva Jersey)
)
 Condado de Morris)

A los 30 días del mes de agosto de 2007, ante mi personalmente compareció Michelle L. McGowan, Asociada para Legalizaciones de Wyeth, a quien conozco y de quien me consta que es la persona descrita en el instrumento anterior y quien lo suscribió, y reconoció ante mi haber suscrito el mismo.

(Fdo.) Barbara A. Kiely
Notario Público

(Sello notarial
en relieve)

[Sello] Barbara A. Kiely ID. 33893
Notario Público de Nueva Jersey
Mi comisión expira el 20 de junio de 2009

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 0749
DE MINISTERIA

Expediente No: AM101821
Patente

Cesión de Inventario

En virtud del pago por la CESIONARIA al CEDENTE de contraprestación válida, el recibo de la cual se reconoce por la presente, el CEDENTE:

- (1) Nombre Completo del Inventor: Brian Bahler
Residencia: 308 Kellyridge Drive, Apex, NC 27502
Ciudadanía: Estados Unidos de América
-
- (2) Nombre Completo del Inventor: Tsu-shun Lee
Residencia: 101 Millers Creek Drive, Cary, NC 27519
Ciudadanía: Taiwan

(3) Nombre Completo del Inventor: Jason Arnold Lotvin
Residencia: 171 Country Club Drive #7, Union, NJ 07083
Ciudadanía: Estados Unidos de América

(4) Nombre Completo del Inventor: Mark Edward Ruppen
Residencia: 6 Lea Avenue, Garnerville, NY 10923
Ciudadanía: Estados Unidos de América

(5) Nombre Completo del Inventor: Pamela Sue Fink Charbonneau
Residencia: 8 Eldor Avenue, New City, NY 10956
Ciudadanía: Estados Unidos de América

por la presente vende, cede y traspasa a la CESIONARIA:

Wyeth
Five Giralda Farms
Madison, Nueva Jersey 07940

y a los sucesores, cesionarios y representantes legales de la CESIONARIA, todo derecho, título e interés para los Estados Unidos y sus posesiones territoriales y en todos los países extranjeros, incluyendo todo los derechos a reclamar prioridad, en y sobre el invento titulado:

SEPARACIÓN DE CONTAMINANTES DEL POLISACÁRIDO DEL STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE MEDIANTE MANIPULACIÓN DEL pH

e inventado por el CEDENTE y los siguientes inventores adicionales, en caso de haberlos:

y el cual se encuentra en la Solicitud de los E.U. No. 60/669,546 presentada el: 8 de abril de 2005

[] Yo, nosotros, el suscrito CEDENTE, por la presente autorizo y solicito la inserción anterior del número de solicitud y la fecha de presentación, una vez se conozcan,

TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 01818
DE MANIPULACION

[marcar también si se están cediendo solicitud(es) extranjera(s)]

[X] y cualquier equivalente legal de las mismas en un país extranjero, incluyendo el derecho a reclamar prioridad, incluidas todas y cada una de las mejoras allí divulgadas, y en y sobre todas las Patentes que hayan de obtenerse para dicho invento en virtud de la solicitud anterior o cualquier solicitud provisional, no provisional, de continuación, divisional, de renovación o sustituta de la misma posteriormente presentada, y respecto de Patentes, cualquier reemisión o reexamen de las mismas.

El CEDENTE pacta por el presente que no se ha hecho ni se hará ni se realizará ninguna cesión, venta, acuerdo o gravamen que pudiese entrar en conflicto con esta cesión.

El CEDENTE autoriza a la CESIONARIA a presentar solicitudes y recibir Patentes para dicho invento en cualquiera de dichos países en su propio nombre, o en nombre de el CEDENTE, a su elección.

El CEDENTE pacta y acuerda suscribir u obtener cualquier garantía adicional necesaria del título sobre dicho invento y cualquier Patente que pueda emitirse para el mismo, en cualquier momento, y a solicitud y por cuenta de la CESIONARIA entregar cualquier testimonio en cualquier interferencia, litigio o proceso relacionado con el mismo y otorgar todos los documentos que puedan ser necesarios o convenientes para perfeccionar el título sobre dicho invento o cualquier Patente que pueda otorgarse para el mismo en la CESIONARIA, sus sucesores, cesionarios u otros representantes legales y, en cualquier momento, a solicitud y por cuenta de la CESIONARIA suscribir cualquier continuación, continuación en parte, solicitud divisional, de renovación o sustituta de la misma, y en cuanto a Patentes y reemisión o

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 0181
DE MINISTERIO

nnnn3

reexamen de las mismas, o cualquier otra solicitud adicional de Patente para dicho invento o cualquier parte del mismo, todas las cuales solicitudes y cualesquiera Patentes que se expidan sobre las mismas son por la presente cedidas a la CESIONARIA, y hará todos los juramentos o declaraciones lícitos, y realizará todo los actos lícitos requeridos para adquirir las mismas, sin otra compensación, pero por cuenta de la CESIONARIA, sus sucesores, cesionarios u otros representantes legales.

El CEDENTE autoriza y solicita al Comisionado de Patentes expedir todas y cada una de las Patentes de los Estados Unidos para dicho invento, resultantes de cualquiera de las anteriores solicitudes a su CESIONARIA.

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 0101
DE MINUTERIA

(Fdo.) Brian Bahler
Brian Bahler

23 Marzo 2006
Fecha

RECONOCIMIENTO

Estado de Carolina del Norte }
ss:
Condado de Lee }

A los 23 días del mes de marzo de 2006, compareció personalmente ante mí Brian Bahler, a quien conozco como la misma persona descrita en el instrumento anterior y quien lo otorgó, y reconoció haber otorgado el mismo, por su propia voluntad y para los propósitos allí señalados.

(Fdo.) Julie J. Conder
Notario Público

Mi comisión expira: Junio 20, 2010

23 Marzo 2006

Fecha

•

SS:

(Fdo.) Julie J. Conder
Notario Público

16 Marzo 2006

Fecha

1

SS:

A los 16 días del mes de marzo de 2006, compareció personalmente ante mí Jason Arnold Lotvin, a quien conozco como la misma persona descrita en el instrumento anterior y quien lo otorgó, y reconoció haber otorgado el mismo, por su propia voluntad y para los propósitos allí señalados.

(Fdo.) Janice A. White
Notario Público

[Sello] JANICE A. WHITE
NOTARIO PÚBLICO-ESTADO DE NUEVA YORK
NO. 01-WH6052604
HABILITADA EN EL CONDADO DE ROCKLAND
MI COMISIÓN EXPIRA 12-26-2006

(Fdo.) Mark Edward Ruppen 21 Marzo 2006
Mark Edward Ruppen Fecha

RECONOCIMIENTO

Estado de Nueva York }
ss:
Condado de Rockland }

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION NO. 01/04
DE MINISTROS

A los 21 días del mes de marzo de 2006, compareció personalmente ante mí Mark Edward Ruppen, a quien conozco como la misma persona descrita en el instrumento anterior y quien lo otorgó, y reconoció haber otorgado el mismo, por su propia voluntad y para los propósitos allí señalados.

(Fdo.) RoseAnn D. Jastrow
Notario Público

[Sello] ROSEANN D. JASTROW
No. 01JA6085816
HABILITADA EN EL CONDADO DE ROCKLAND
MI COMISIÓN EXPIRA 01-06-2007

(Fdo.) Pamela Sue Fink Charbonneau 21 Marzo 2006
Pamela Sue Fink Charbonneau Fecha

Estado de Nueva York }
ss:
Condado de Rockland }

000011

A los 21 días del mes de marzo de 2006, compareció personalmente ante mí Pamela Sue Fink Charbonneau, a quien conozco como la misma persona descrita en el instrumento anterior y quien lo otorgó, y reconoció haber otorgado el mismo, por su propia voluntad y para los propósitos allí señalados.

(Fdo.) RoseAnn D. Jastrow
Notario Público

[Sello] ROSEANN D. JASTROW
No. 01JA6085816
HABILITADA EN EL CONDADO DE ROCKLAND
MI COMISIÓN EXPIRA 01-06-2007

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

ARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 0787
DE MINISTROS

- 1. País: Estados Unidos de América
- 2. Este documento público ha sido firmado por: Barbara A. Kiely
- 3. actuando en calidad de: Notario Público de Nueva Jersey
- 4. lleva el sello/timbre de: Barbara A. Kiely, Notario

CERTIFICADO

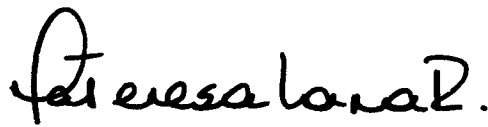
- 5. en Trenton, Nueva Jersey
- 6. el día 4 de septiembre de 2007
- 7. por Bradley Abelow, TESORERO DE NUEVA JERSEY
- 8. No. A301928
- 9. Sello/Timbre:
- 10. Firma

(Sello del Estado
de Nueva Jersey)

(Fdo.) Bradley Abelow

= = = = =

La anterior es traducción fiel y completa del documento en referencia, de la cual se deja copia en este archivo para su confrontación.



María Teresa Lara R.
c.c. 41.568.055 de Bogotá
Traductora Oficial según
Resolución No. 01016 del
2 de octubre de 1998, del
Ministerio de Justicia



MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 01016
DE OCTUBRE DE 1998
DE MINISTERIO DE JUSTICIA

APOSTILLE

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

1. COUNTRY: UNITED STATES OF AMERICA
2. THIS PUBLIC DOCUMENT HAS BEEN SIGNED BY:
BARBARA A KIELY
3. ACTING IN THE CAPACITY OF:
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
4. BEARS THE SEAL/STAMP OF:
BARBARA A KIELY, NOTARY

CERTIFIED

5. AT TRENTON, NEW JERSEY
6. THE 4TH DAY OF SEPTEMBER 2007
7. BY: Bradley Abelow, NEW JERSEY TREASURER
8. NO. A301928
9. SEAL/STAMP:
10. SIGNATURE

Bradley Abelow

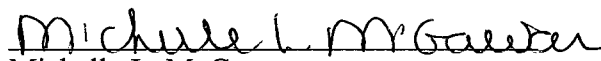
AM101821

AFFIDAVIT

I, Michelle L. McGowan, Legalization Associate, Wyeth, do hereby certify that the attached copy has been compared with the original Assignment (for U.S.S.N. 60/669,546, and any legal equivalent thereof in a foreign country, for the invention entitled: "SEPARATION OF CONTAMINANTS FROM STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE POLYSACCHARIDE BY pH MANIPULATION") dated March 16, 2006 from Jarson Arnold Lotvin; and dated March 21, 2006 from Mark Edward Ruppen and Pamela Sue Fink Charbonneau; and dated March 23, 2006 from Brian Bahler and Tsu-shun Lee to Wyeth and that the said copy is a true copy of the original.

Dated this 30th day of August 2007, at Madison, New Jersey, United States of America.

Wyeth


Michelle L. McGowan

TO BE USED IN COLOMBIA

ACKNOWLEDGMENT

State of New Jersey)
)
County of Morris)

On this 30th day of August 2007, before me personally appeared Michelle L. McGowan, Legalization Associate of Wyeth, to me known and known to me to be the individual described in and who executed the foregoing instrument, and he acknowledged to me that he executed the same.

Barbara A. Kiely ID. 33893
Notary Public of New Jersey
My Commission Expires June 20, 2009


Notary Public

Assignment of Invention

In consideration of the payment by ASSIGNEE to ASSIGNOR of good and valuable consideration, the receipt of which is hereby acknowledged,
ASSIGNOR:

- (1) Full Name of Inventor: Brian Bahler
Residence: 308 Kellyridge Drive, Apex, NC 27502
Citizenship: United States of America

- (2) Full Name of Inventor: Tsu-shun Lee
Residence: 101 Millers Creek Drive, Cary, NC 27519
Citizenship: Taiwan

- (3) Full Name of Inventor: Jason Arnold Lotvin
Residence: 171 Country Club Drive #7, Union, NJ 07083
Citizenship: United States of America

- (4) Full Name of Inventor: Mark Edward Ruppen
Residence: 6 Lea Avenue, Garnerville, NY 10923
Citizenship: United States of America

- (5) Full Name of Inventor: Pamela Sue Fink Charbonneau
Residence: 8 Eldor Avenue, New City, NY 10956
Citizenship: United States of America

hereby sells, assigns and transfers to ASSIGNEE:

Wyeth
Five Giralda Farms
Madison, New Jersey 07940

and the successors, assigns and legal representatives of the ASSIGNEE the entire right, title and interest for the United States and its territorial possessions and in all foreign countries, including all rights to claim priority, in and to the invention entitled:
**SEPARATION OF CONTAMINANTS FROM STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE
POLYSACCHARIDE BY pH MANIPULATION**

and invented by ASSIGNOR and the following additional inventors, if any:

and which is found in U.S. Application No. 60/669,546 filed on: April 8, 2005

☐ I/we the ASSIGNOR signing below, hereby authorize and request insertion above of the application number and filing date, when they become known,

[also check if foreign application(s) is(are) also being assigned]

☒ and any legal equivalent thereof in a foreign country,

including the right to claim priority, including any and all improvements disclosed therein, and in and to all Letters Patent to be obtained for said invention by the above application or any subsequently filed provisional, nonprovisional, continuation, divisional, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patent any reissue or re-examination thereof.

ASSIGNOR hereby covenants that no assignment, sale, agreement or encumbrance has been or will be made or entered into which would conflict with this assignment.

ASSIGNOR authorizes ASSIGNEE to make applications for and to receive Letters patent for said invention in any of said countries in its own name, or in ASSIGNOR's name, at its election.

ASSIGNOR covenants and agrees to execute or procure any further necessary assurance of the title to said invention and any Letters Patent which may issue therefore and to, at any time, upon the request and at the expense of ASSIGNEE deliver any testimony in any interference, litigation or proceeding related thereto and execute all papers that may be necessary or desirable to perfect the title to said invention or any Letters Patent which may be granted therefore in ASSIGNEE, its successors, assigns or other legal representatives, and that to, at any time, upon the request and at the expense of ASSIGNEE execute any continuation, continuation-in-part, divisional, renewal or substitute thereof, and as to Letters Patent and reissue or re-examination thereof, or any other additional applications of Letters Patent for said invention or any part thereof, all of which applications and any Letters Patent issuing thereon are hereby assigned to ASSIGNEE, and will make all rightful oaths or declarations, and do all lawful acts requisite for procuring the same therein, without further compensation, but at the expense of ASSIGNEE, its successors, assigns or other legal representatives.

ASSIGNOR authorizes and requests the Commissioner of Patents to issue any and all Letters Patent of the United States for said invention, resulting from any of the aforesaid applications to its ASSIGNEE.



Brian Bahler

23-March-2006

Date

ACKNOWLEDGMENT

State of North Carolina
County of Lee ss:

On the 23rd day of March 2006, Brian Bahler personally appeared before me, known by me to be the same person described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged that he/she executed the same, of his/her own free will and for the purposes set forth.


Notary Public

My Commission Expires: June 20, 2010

Tsu-shun Lee 23-March-2006
Tsu-shun Lee Date

ACKNOWLEDGMENT

State of North Carolina
County of Lee ss:

On the 23rd day of March 2006, Tsu-shun Lee personally appeared before me, known by me to be the same person described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged that he/she executed the same, of his/her own free will and for the purposes set forth.

Julie J. Conder
Notary Public

My Commission Expires June 20, 2010

Jason Arnold Lotvin
Jason Arnold Lotvin

16 Mar 2006
Date

ACKNOWLEDGMENT

State of New York }
County of Rockland } ss:

On the 16 day of March 2006, Jason Arnold Lotvin personally appeared before me, known by me to be the same person described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged that he/she executed the same, of his/her own free will and for the purposes set forth.

JANICE A. WHITE
NOTARY PUBLIC - STATE OF NEW YORK
NO. 01-WH6052604
QUALIFIED IN ROCKLAND COUNTY
MY COMMISSION EXPIRES 12-26-2006

Janice A. White
Notary Public


Mark Edward Ruppen

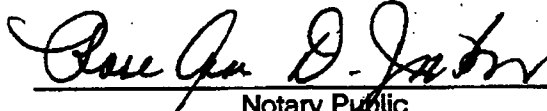
21 Mar 06.
Date

ACKNOWLEDGMENT

State of New York }
County of Rockland } ss:

On the 21st day of March 2006, Mark Edward Ruppen personally appeared before me, known by me to be the same person described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged that he/she executed the same, of his/her own free will and for the purposes set forth.

ROSEANN D. JASTROW
NO. 01JA6086816
QUALIFIED IN ROCKLAND COUNTY
MY COMMISSION EXPIRES 01-06-2007


Notary Public

Pamela Sue Fink Charbonneau
Pamela Sue Fink Charbonneau

21 Mar 2006
Date

nnn21

ACKNOWLEDGMENT

State of New York }
County of Rockland } ss:

On the 21st day of March 2006, Pamela Sue Fink Charbonneau personally appeared before me, known by me to be the same person described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged that he/she executed the same, of his/her own free will and for the purposes set forth.

ROSEANN D. JASTROW
NO. 01JA6085816
QUALIFIED IN ROCKLAND COUNTY
MY COMMISSION EXPIRES 01-06-20 07

Rose Ann D. Jastrow
Notary Public

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
19 October 2006 (19.10.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/110352 A3

(51) International Patent Classification:

C08B 37/00 (2006.01) A61K 39/09 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2006/012134

(22) International Filing Date: 31 March 2006 (31.03.2006)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

60/669,546 8 April 2005 (08.04.2005) US

(71) Applicant (for all designated States except US): WYETH
[US/US]; Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): BAHLER, Brian
[US/US]; 308 Kellyridge Drive, Apex, NC 27502 (US).
LEE, Tsu-shun [CN/US]; 101 Millers Creek Drive, Cary,
NC 27519 (US). LOTVIN, Jason, Arnold [US/US]; 171
Country Club Drive #7, Union, NJ 07083 (US). RUPPEN,
Mark, Edward [US/US]; 6 Lea Avenue, Garnerville,
NY 10923 (US). CHARBONNEAU, Pamela, Sue, Fink
[US/US]; 8 Eldor Avenue, New City, NY 10956 (US).(74) Agent: ROZEK, Carol, E.; Wyeth, Patent Law Depart-
ment, Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940, (US).(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV,
LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,
SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT,
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))
- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

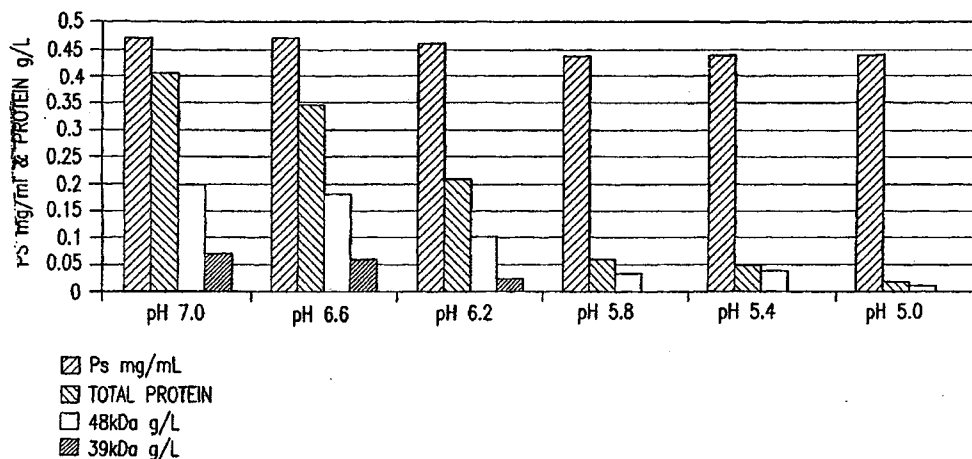
(88) Date of publication of the international search report:

29 March 2007

[Continued on next page]

(54) Title: SEPARATION OF CONTAMINANTS FROM STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE POLYSACCHARIDE BY PH
MANIPULATION

RRP1-0001 pH ADJUSTMENT STUDY #1



(57) Abstract: A process for reducing the protein content and preserving the capsular polysaccharide content in a complex cellular *Streptococcus pneumoniae* lysate broth prior to purification is described. Utilizing pH reduction after cellular lysis has resulted in a purified polysaccharide that consistently meets the protein specification, and higher recovery yields of polysaccharide during the purification process.

WO 2006/110352 A3

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
19 October 2006 (19.10.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/110352 A2(51) International Patent Classification:
C08B 37/00 (2006.01)(21) International Application Number:
PCT/US2006/012134

(22) International Filing Date: 31 March 2006 (31.03.2006)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/669,546 8 April 2005 (08.04.2005) US(71) Applicant (for all designated States except US): WYETH
[US/US]; Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **BAHLER**, Brian
[US/US]; 308 Kellyridge Drive, Apex, NC 27502 (US). **LEE**, Tsu-shun [CN/US]; 101 Millers Creek Drive, Cary, NC 27519 (US). **LOTVIN**, Jason, Arnold [US/US]; 171 Country Club Drive #7, Union, NJ 07083 (US). **RUPPEN**, Mark, Edward [US/US]; 6 Lea Avenue, Garnerville, NY 10923 (US). **CHARBONNEAU**, Pamela, Sue, Fink [US/US]; 8 Eldor Avenue, New City, NY 10956 (US).(74) Agent: **ROZEK**, Carol, E.; Wyeth, Patent Law Department, Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940, (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,

AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))
- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))

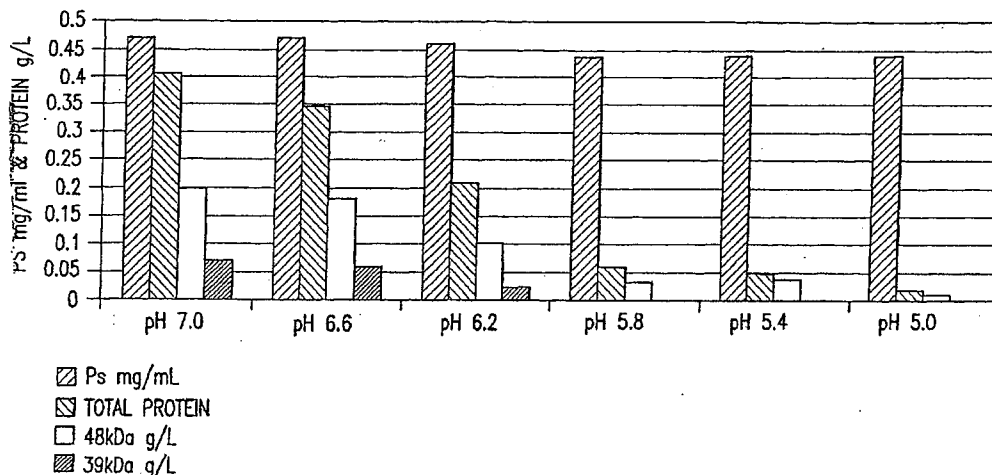
Published:

- without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: SEPARATION OF CONTAMINANTS FROM STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE POLYSACCHARIDE BY PH MANIPULATION

RRP1-0001 pH ADJUSTMENT STUDY #1



(57) Abstract: A process for reducing the protein content and preserving the capsular polysaccharide content in a complex cellular *Streptococcus pneumoniae* lysate broth prior to purification is described. Utilizing pH reduction after cellular lysis has resulted in a purified polysaccharide that consistently meets the protein specification, and higher recovery yields of polysaccharide during the purification process.

SEPARATION OF CONTAMINANTS FROM *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* POLYSACCHARIDE BY pH MANIPULATION

5

BACKGROUND OF THE INVENTION

This invention relates to methods for removing excess soluble protein from cellular lysates of *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) serotypes used in the production of pneumococcal polysaccharides.

10 The capsular polysaccharide for each *S. pneumoniae* serotype utilized for vaccine products is produced by growing the organism in a complex liquid medium. The population of the organism is often scaled up from a seed vial to seed bottles and passaged through one or more seed fermentors of increasing volume until production scale fermentation volumes are reached. The end of the growth cycle can
15 be determined by one of several means, at which point the cells are lysed through the addition of a detergent which aids in the cell wall breakdown and release of autolysin which causes cellular lysis when the cells reach stationary phase. The lysate broth is then harvested for downstream (purification) processing. This purification includes several column chromatography and diafiltration steps to recover
20 the capsular polysaccharide that surrounds the bacterial cells. The polysaccharide, when conjugated with a high molecular weight protein, such as CRM₁₉₇, and formulated into a vaccine containing conjugates of multiple serotypes, helps confer immunity (to *S. pneumoniae*) when injected into the target population, such as, for example, infants and young children.

25

Specifications have been set for the protein content in the purified polysaccharide of each serotype to reduce the risk of adverse events from the vaccine. For instance, in the currently marketed 7-valent pneumococcal conjugate (7vPnC) vaccine (Prevnar®), the specification for protein content in the purified
30 serotype 4 polysaccharide is not more than 3%, and for the purified serotype 6B polysaccharide it is not more than 2% on a dry weight basis.

In some instances, it has proven difficult to remove the residual protein that is still present after the entire purification process. Efforts made to address this issue

through changes in the purification processing of the cell lysate met with only moderate success.

5 It was therefore decided to attack this issue at the upstream side of the process. The key contaminant proteins were determined to be critical for cellular growth and integrity. Therefore, the remaining options available to reduce the total protein consisted of altering growth and/or harvest conditions.

10 The fermentation process is fairly straightforward. The cells (seed) are expanded in bottles of soy-based media, then passed through one or two seed fermentors, and finally passaged to a production scale fermentor. At each step the temperature and pH are closely monitored with pH being controlled by the addition of a base material (20% sodium carbonate). When the growth reaches a certain point, the run is ended by the introduction of a detergent, such as deoxycholate (DOC)
15 sodium, which initiates a cell lysis process. After a hold period, the pH of the lysate broth is adjusted to 6.6 to precipitate the deoxycholate and cell membrane complexes. This material is held until processing by centrifugation and filtration can be carried out to remove the solids.

20 Much of the protein, however, remains solubilized in the clarified lysate, causing the residual protein content in the purified polysaccharide to exceed specification. Thus, there is a need to reduce the soluble protein levels in several pneumococcal serotypes during either the fermentation or purification process.

25

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention fulfills this need by providing a process for reducing the protein content and preserving the capsular polysaccharide content in a complex cellular *Streptococcus pneumoniae* lysate broth prior to purification. This process comprises the steps of:

- 30 (a) growing a selected *S. pneumoniae* serotype in a soy-based medium, which includes:

000027

- (i) inoculating a first container containing the soy-based medium with seed stock of the selected serotype, and incubating the first container until growth requirements are met, and
- (ii) inoculating a second container containing the soy-based medium with the culture from step (i) while maintaining a stable pH and temperature in the second container, and
- (b) lysing with a detergent the bacterial cells produced in step (a), thereby producing a lysate containing soluble proteins, cell debris, nucleic acids and polysaccharide;
- (c) agitating the cellular lysate for a time sufficient to assure complete lysis and polysaccharide release;
- (d) lowering the pH of the cellular lysate to less than 5.5 to precipitate out the detergent and most of the soluble proteins;
- (e) holding the solution and precipitate formed in step (d) without agitation for a time sufficient to allow settling of the precipitate; and
- (f) processing the solution and precipitate by centrifugation and/or filtration, whereby the capsular polysaccharide in solution is preserved and the soluble protein is effectively reduced.

Exemplary, non-limiting *S. pneumoniae* serotypes selected for this embodiment of the invention are 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F and 19A. In a particular embodiment of the invention, and depending on the serotype being grown in step (a), the fermentation pH in step (a) is maintained by a base feed of sodium hydroxide, sodium carbonate, or a combination thereof. In another embodiment, the pH in step (d) is lowered to between 4.5 and less than 5.5. In yet another embodiment, the detergent is deoxycholate sodium.

This invention also relates to a process for reducing the protein content and preserving the capsular polysaccharide content in a complex cellular *Streptococcus pneumoniae* lysate broth prior to purification. The process comprises the steps of:

(a) expanding in increasing volumes from a starting container to a production scale container in a soy-based medium a selected *S. pneumoniae* serotype and maintaining a stable pH and temperature during cellular growth;

nnn28

- (b) lysing with a detergent the bacterial cells produced in step (a), thereby producing a lysate containing soluble proteins, cell debris, nucleic acids and polysaccharide;
- (c) agitating the cellular lysate for a time sufficient to assure complete lysis and polysaccharide release;
- (d) lowering the pH of the cellular lysate to less than 5.5 to precipitate out the detergent and most of the soluble proteins;
- (e) holding the solution and precipitate formed in step (d) without agitation for a time sufficient to allow settling of the precipitate; and
- (f) processing the solution and precipitate by centrifugation and/or filtration, whereby the capsular polysaccharide in solution is preserved and the soluble protein is effectively reduced.

Exemplary, non-limiting *S. pneumoniae* serotypes selected for this embodiment of the invention are 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F and 19A. In a particular embodiment of the invention, and depending on the serotype being grown in step (a), the fermentation pH in step (a) is maintained by a base feed of sodium hydroxide, sodium carbonate, or a combination thereof. In another embodiment, the pH in step (d) is lowered to between 4.5 and less than 5.5. In still another embodiment, the detergent is deoxycholate sodium.

In yet another embodiment, where the serotype is serotype 5 or 19A, the soy-based medium is supplemented with sodium bicarbonate.

This invention allows for removal of large quantities of excess protein contamination from the cellular lysate, thereby leaving a cleaner product (Cell Free Broth or CFB) for purification which will generally obtain higher polysaccharide recoveries and total polysaccharide yields than were possible using prior fermentation and recovery method.



BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

FIG. 1 is an SDS-PAGE gel showing the significant decrease in soluble
5 protein in grams per liter of lysate as the pH is decreased with acetic acid for *S. pneumoniae* Type 4. The 39 kDa and 48 kDa components are cell wall surface proteins. The polysaccharide yield is also shown.

FIG. 2 is a chart of results for *S. pneumoniae* Type 6B of pH adjustment down
10 to pH 5 showing protein reduction as determined by SDS-PAGE and polysaccharide (Ps) yield as determined by HPLC-SEC with refractive index (RI) detector.

FIG. 3 is a chart of results for *S. pneumoniae* Type 1 of pH adjustment down
15 to pH 5 showing protein reduction as determined by SDS-PAGE and polysaccharide yield as determined by HPLC-SEC with RI detector.

FIG 4 is a chart of results for *S. pneumoniae* Type 5 of pH adjustment down
to pH 4.1 showing protein reduction as determined by SDS-PAGE and
polysaccharide yield as determined by HPLC-SEC with RI detector.
20

FIG. 5 is a chart of results for *S. pneumoniae* Type 6A of pH adjustment down
to pH 4.5 of two different fermentation runs showing protein reduction as determined
by SDS-PAGE and polysaccharide yield as determined by HPLC-SEC with RI
detector.
25

FIG. 6 is a chart of results for *S. pneumoniae* Type 7F of pH adjustment down
to pH 4.8 showing protein reduction as determined by SDS-PAGE and
polysaccharide yield as determined by HPLC-SEC with RI detector.

30

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Streptococcus pneumoniae are Gram-positive, lancet shaped cocci that are usually seen in pairs (diplococci), but also in short chains or as single cells. They grow readily on blood agar plates with glistening colonies and display alpha

nnn30

hemolysis unless grown anaerobically where they show beta hemolysis. They are sensitive to bile salts that can break down the cell wall with the presence of the cells' own enzyme, autolysin. The organism is an aerotolerant anaerobe and is fastidious in that it has complex nutritional requirements.

5

The cells of most pneumococcal serotypes have a capsule which is a polysaccharide coating surrounding each cell. This capsule is a determinant of virulence in humans because it interferes with phagocytosis by preventing antibodies from attaching to the bacterial cells. There are currently 90 capsular serotypes identified, with 23 serotypes responsible for about 90% of invasive disease. The polysaccharide coat as a vaccine can confer a reasonable degree of immunity (to *S. pneumoniae*) in individuals with developed or unimpaired immune systems, but a conjugated protein with polysaccharide allows for an immune response in infants and elderly who are also most at risk for pneumococcal infections. It is important to be able to separate this capsular polysaccharide from the lysed (killed) bacteria and remove as much cellular debris as possible. As described herein, this removal was accomplished in a series of fermentation process changes.

Three major changes that have greatly improved the downstream processing are as follows: (1) changing the fermentation base feed from sodium carbonate to sodium hydroxide where possible; (2) maintaining agitation in the fermentor during the deoxycholate hold interval; and (3) lowering the pH after the deoxycholate lysate hold to less than 5.5.

The initial discovery was that by lowering the pH to less than 5.5, from 50-90% of the undesirable soluble protein could be removed from the cell lysate prior to downstream processing (purification). While this was a very important process enhancement, the use of large volumes of sodium carbonate to maintain the set-point pH during the fermentation runs caused a serious foaming problem when the pH was adjusted to 5.0 with acetic acid. It was also discovered that a stable pH was difficult to maintain after adjustment because of the multiple forms of carbonate that exist in solution. This led to looking at alternate base feeds that would not create a carbonate buildup in the fermentation broth. Sodium hydroxide was selected

because it was already being used to adjust the pH of the medium and seed bottles prior to inoculation. Studies up to 100L fermentations indicated that this was a viable alternative with only a minor reduction in growth, based on optical density (OD). This base also resolved the foaming problem. Other bases besides sodium hydroxide can be used, and sodium bicarbonate can be used as a supplement where it is determined that the organism requires some form of carbonate to maintain growth, such as, for example, with serotypes 5 and 19A. If sodium carbonate is used as the primary base feed, such as for serotype 19A, then the post-lysate pH adjustment (to a pH of less than 5.5) requires a slow multi-hour controlled acid addition to avoid foaming.

Finally, based on laboratory observation, it was determined that if the deoxycholate hold proceeded without agitation (as in a previous protocol), a gel-like precipitate would settle on the fermentor walls and pH probe. This created unreliable *in-situ* pH readings when the pH was adjusted. The agitation step prevented this precipitate from forming and allowed the pH probe integrity to be maintained.

Thus, in the presently claimed invention, the selected *Streptococcus pneumoniae* serotypes are expanded in increasing volumes from starting seed vials in a sterile medium composed of, for example, an enzyme digested soy-based product, sodium chloride, potassium phosphate monobasic, calcium chloride, and a selected amino acid. Dextrose with magnesium sulfate is used as the carbon source to sustain growth in the liquid medium. The medium may also be supplemented with other additives as required by the specific serotype or process. The culture starts in a first container, such as seed bottles, which, after a growth interval in a convection-based incubator, is used to inoculate a second container, such as a seed fermentor, which in turn can be used to inoculate, if desired, at least one progressively larger container, such as a production fermentor, until production scale is reached. In one embodiment, a selected *S. pneumoniae* serotype is expanded in increasing volumes from starting seed vials to seed bottles to a 20L fermentor to a 200L fermentor to a 2000L production fermentor. The growth parameters are closely monitored for optical density, temperature and pH in order to determine when to transfer the culture to the next fermentation scale and also when to terminate the batch run.

00032

When the bacteria enter stationary phase, the cells in the production fermentor are forced into lysis by the addition of a detergent, such as an anionic or cationic detergent. Representative examples of such detergents include deoxycholate sodium, N-lauryl sarcosine, chenodeoxycholic acid sodium, and saponins. After agitating the cellular lysate for a time sufficient to assure complete cellular death, e.g., for a time between 8 and 24 hours and a temperature between 7°C and 13°C, the second phase of the process is to reduce the pH of the cellular lysate to less than pH 5.5 with an acid solution, such as 50% acetic acid. The actual pH reduction varies by serotype with the purpose of being able to be below the final purified protein specification on a consistent basis required for a robust production process. In a particular embodiment of the invention, the pH is lowered to between 4.5 and less than 5.5.

The pH reduction step causes a "salting out" (precipitation) of formerly soluble proteins. This is a well-known chemical effect on proteins as they reach their isoelectric points. What makes this step unique in the present invention is that it is being used as a purification step in a highly complex cellular lysate broth. The broth is defined as "complex" because it contains medium components, DNA, proteins, polysaccharides, RNA, and other cellular debris.

In addition to acetic acid, the claimed process has also been shown to work with sulfuric and phosphoric acids, and should work with varying efficiencies following the Hofmeister series of which these acids are a part. The Hofmeister series is the ranking of various anions and cations and their ability to precipitate out mixtures of proteins. The final concentration of these compounds (in the Hofmeister series) in solution determines the ultimate solubility of the various proteins.

After a hold time, without agitation, that is sufficient to allow settling of the precipitate and thereby aid the continuous centrifugation process, such as, for example, between 12 and 24 hours at a temperature between 15°C and 25°C, a significant portion of the previously soluble proteins (and likely some of the other previously soluble contaminant components) drop out of solution as a solid

precipitate with little loss or degradation of the polysaccharide product which remains in solution.

This solution with the precipitate is then processed through a continuous
5 centrifuge or alternately by standard bottle centrifugation. The supernatant that contains the polysaccharide is collected and run through particulate and micron filtration prior to being transferred for downstream concentration and purification.

Results of using the process of this invention are depicted in the Figures.
10 Figure 1 shows a representative SDS-PAGE gel of the observed protein reduction using acetic acid to reduce the pH from 6.8 to 5.0 on the cellular lysate broth for *S. pneumoniae* serotype 4. The far left lane is a molecular weight marker used as a reference for protein weight. Sample Lane 1 ("C") is a control that was not pH adjusted. The numbers show the approximate value (g/L in lysed broth) of the two
15 major protein contaminant bands (48kDa and 39kDa) and also the total protein in the whole lane. Also shown is the total polysaccharide yield contained in a sample aliquot submitted for HPLC-SEC analysis. Lanes 2-8 show the same information from the pH adjusted samples. Lanes 9-11 are BSA standards used to determine the protein yields by basic linear regression analysis. The Ps analysis was not done on
20 the pH 6.8 sample. In this particular serotype, there was some moderate loss of polysaccharide (Ps) but at a much lower rate than the loss of protein through reduction of pH.

Figure 2 is a plotted graph illustrating the protein reduction in the cellular
25 lysate of *S. pneumoniae* serotype 6B along with the polysaccharide yield stability when the pH of the cellular lysate was lowered to 5.0. No loss of polysaccharide was seen with this serotype. In contrast, total protein was reduced by more than one-half.

Figure 3 is a plotted graph illustrating the protein reduction in the cellular
30 lysate of *S. pneumoniae* serotype 1 along with the polysaccharide yield stability when the pH of the cellular lysate was lowered to 5.0. Almost no change in polysaccharide concentration was observed. In contrast, total protein was reduced by more than 90%.

Figure 4 is a plotted graph illustrating the protein reduction in the cellular lysate of *S. pneumoniae* serotype 5 along with the polysaccharide yield stability when the pH of the cellular lysate was lowered to 4.1. Almost no change in polysaccharide concentration was observed until very low pH, which was attributed to a dilution effect due to the amount of acid added. In contrast, total protein was reduced by more than 75% at pH 4.5.

Figure 5 is a plotted graph of two different fermentation runs illustrating the protein reduction in the cellular lysate of *S. pneumoniae* serotype 6A along with the polysaccharide yield stability when the pH of the cellular lysate was lowered to 4.5. Almost no change in polysaccharide concentration was observed. This graph also shows that polysaccharide concentrations were maintained while protein concentrations were reduced when NaOH was used instead of Na₂CO₃.

Figure 6 is a plotted graph illustrating the protein reduction in the cellular lysate of *S. pneumoniae* serotype 7F along with the polysaccharide yield stability when the pH of the cellular lysate was lowered to 4.8. Almost no change in polysaccharide concentration was observed. In contrast, total protein was reduced by more than 80% at pH 4.8.

Table 1 below is representative of some of the protein reduction and polysaccharide gains from final purified polysaccharides after the process of this invention was utilized.

Table 1. Protein Concentration and Polysaccharide Yield for Several *S. pneumoniae* Serotypes

Serotype	Protein Specification	Original Process		Process of the Invention	
		Protein Conc.	Ps Yield	Protein Conc.	Ps Yield
1	$\leq 2.0\%$	11.7%	11.2g	$< 0.8\%$	15~20g
5	$\leq 7.5\%$	10.2%	6.0g	$< 6.5\%^*$	8~13g
7F	$\leq 5.0\%$	0.2%	19.2g	0.2%	53g
6A	$\leq 2.0\%$	NA	NA	0.3%	21.6g

5 *Fermentation process showed an 80% protein reduction of DOC lysate material but additional protein removal was not as efficient during purification process.

10 The fermentation process changes outlined above served to greatly reduce the protein content of the lysate broth prior to purification processing. This has allowed the purified product to meet the protein specification without significant modification of the current purification process for polysaccharide recovery. An unexpected benefit of these changes was a total purification polysaccharide yield improvement of 25-100% despite slightly lower growth as determined by OD. This is a robust improvement of the fermentation/recovery process that can greatly enhance
15 the production of pneumococcal polysaccharides.

20 The above disclosure generally describes the present invention. A more complete understanding can be obtained by reference to the following specific examples. These examples are described solely for the purpose of illustration and are not intended to limit the scope of the invention.

EXAMPLES

Example 1

5

Protein Reduction in the Cellular Lysate of *S. pneumoniae* Serotypes 1, 6A and 7F

Preparation of Master and Working Cell Banks

S. pneumoniae serotype 1 was obtained from the American Type Culture
10 Collection, ATCC, strain 6301. *S. pneumoniae* serotypes 6A and 7F were obtained
from Dr. Gerald Shiffman of the State University of New York. Several generations of
seed stocks were created in order to expand the strain and remove components of
animal origin (generations F1, F2, and F3). Two additional generations of seed
stocks were produced. The first additional generation was made from an F3 vial; and
15 the subsequent generation was made from a vial of the first additional generation.
Seed vials were stored frozen ($<-70^{\circ}\text{C}$) with synthetic glycerol as a cryopreservative.
In addition to frozen vials, lyophilized vials were prepared for the F4 generation. For
cell bank preparation, all cultures were grown in a soy-based medium. Prior to
freezing, cells were concentrated by centrifugation, spent medium was removed, and
20 cell pellets were re-suspended in fresh medium containing a cryopreservative, such
as synthetic glycerol.

Fermentation and Recovery

Cultures from the working cell bank were used to inoculate seed bottles
25 containing a soy-based medium (Table 2). The bottles were incubated at $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$
without agitation until growth requirements were met. A seed bottle was used to
inoculate a seed fermentor containing the soy-based medium. A pH of about 7 was
maintained with 3N NaOH. After the target optical density was reached, the seed
fermentor was used to inoculate the production fermentor containing the soy-based
30 medium. The pH was maintained with 3N NaOH. The fermentation was terminated
after cessation of growth or when the working volume of the fermentor was reached.
An appropriate amount of sterile 12% deoxycholate sodium was added to the culture
to obtain a 0.12% - 0.13% concentration in the broth, to lyse the bacterial cells and

release cell-associated polysaccharide. After lysing, the fermentor contents were agitated for a time interval between 8 and 24 hours at a temperature between 7°C and 13°C, to assure that complete cellular lysis and polysaccharide release had occurred. Agitation during this hold period prevented lysate sediment from settling on the fermentor walls and pH probe, thereby allowing the pH probe integrity to be maintained. Next, the pH of the lysed culture broth was adjusted to approximately pH 5.0 with 50% acetic acid. After a hold time without agitation, for a time interval between 12 and 24 hours at a temperature between 15°C and 25°C, a significant portion of the previously soluble proteins dropped out of solution as a solid precipitate with little loss or degradation of the polysaccharide, which remained in solution. The solution with the precipitate was then clarified by continuous flow centrifugation followed by depth filtration and 0.45 μ m microfiltration.

On a smaller scale, the process described above also resulted in significant reduction of total protein for serotypes 4 and 6B (FIGS. 1 and 2), which indicates that the process will work for these two serotypes on a larger scale. (*S. pneumoniae* serotypes 4 and 6B were also obtained from Dr. Gerald Schiffman of the State University of New York.)

Table 2. Composition of Soy-Based Medium

Component	Baseline Concentration	Low Concentration	High Concentration
HySoy	28g/L	18g/L	38g/L
NaCl	3.5g/L	3.5g/L	3.5g/L
KH ₂ PO ₄	0.7g/L	0.7g/L	0.7g/L
CaCl ₂ ·H ₂ O	0.018g/L	0.018g/L	0.018g/L
L-Cysteine, HCl	0.21g/L	0.21g/L	0.21g/L

Example 2

Protein Reduction in the Cellular Lysate of *S. pneumoniae* Serotype 5

S. pneumoniae serotype 5 was obtained from Dr. Gerald Schiffman of the State University of New York, Brooklyn, New York. For preparation of the cell bank system, see Example 1.



000008

Fermentation and Recovery

Cultures from the working cell bank were used to inoculate seed bottles containing the soy-based medium described above (Table 2), which medium was supplemented with a sterile NaHCO_3 solution at a 10mM concentration. The bottles were incubated at $36^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ without agitation until growth requirements were met. A seed bottle was used to inoculate a seed fermentor containing the soy-based medium with a 10mM NaHCO_3 concentration in the medium. A pH of about 7.0 was maintained with 3N NaOH. After the target optical density was reached, the seed fermentor was used to inoculate the production fermentor containing the soy-based medium with a 10mM NaHCO_3 concentration in the medium. The pH was maintained with 3N NaOH. The fermentation was terminated after cessation of growth or when the working volume of the fermentor was reached. An appropriate amount of sterile 12% deoxycholate sodium was added to the culture to obtain a 0.12% - 0.13% concentration in the broth, to lyse the bacterial cells and release cell-associated polysaccharide. After lysing, the fermentor contents were agitated for a time interval between 8 and 24 hours at a temperature between 7°C and 13°C to assure that complete cellular lysis and polysaccharide release had occurred. Agitation during this hold period prevented lysate sediment from settling on the fermentor walls and pH probe, thereby allowing the pH probe integrity to be maintained. Next, the pH of the lysed culture broth was adjusted to approximately pH 4.8 with 50% acetic acid. After a hold time without agitation, for a time interval between 12 and 24 hours at a temperature between 15°C and 25°C , a significant portion of the previously soluble proteins dropped out of solution as a solid precipitate with little loss or degradation of the polysaccharide, which remained in solution. The solution with the precipitate was then clarified by continuous flow centrifugation followed by depth filtration and $0.45\ \mu\text{m}$ microfiltration.

It should be understood that the foregoing discussion and examples merely present a detailed description of certain embodiments. It therefore should be apparent to those of ordinary skill in the art that various modifications and equivalents can be made without departing from the spirit and scope of the invention.

000029

What is claimed is:

1. A process for reducing the protein content and preserving the capsular polysaccharide content in a complex cellular *Streptococcus pneumoniae* lysate broth
5 prior to purification, the process comprising the steps of:
 - (a) growing a selected *S. pneumoniae* serotype in a soy-based medium, which includes:
 - (i) inoculating a first container containing the soy-based medium with seed stock of the selected serotype, and incubating the first container
10 until growth requirements are met,
 - (ii) inoculating a second container containing the soy-based medium with the culture from step (i) while maintaining a stable pH and temperature in the second container, and
 - (b) lysing with a detergent the bacterial cells produced in step (a), thereby
15 producing a lysate containing soluble proteins, cell debris, nucleic acids and polysaccharide;
 - (c) agitating the cellular lysate for a time sufficient to assure complete lysis and polysaccharide release;
 - (d) lowering the pH of the cellular lysate to less than 5.5 to precipitate out the
20 detergent and most of the soluble proteins;
 - (e) holding the solution and precipitate formed in step (d) without agitation for a time sufficient to allow settling of the precipitate; and
 - (f) processing the solution and precipitate by centrifugation and/or filtration, whereby the capsular polysaccharide in solution is preserved and the soluble protein
25 is effectively reduced.
2. The process of claim 1, wherein the selected *S. pneumoniae* serotype is 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F or 19A.
- 30 3. The process of claim 1, wherein the detergent is deoxycholate sodium.
4. The process of claim 1, wherein the pH in step (d) is lowered to between 4.5 and less than 5.5.



00040

5. The process of claim 1, wherein the pH in step (a) is maintained by a base feed of sodium hydroxide, sodium carbonate, or a combination thereof.
- 5 6. A process for reducing the protein content and preserving the capsular polysaccharide content in a complex cellular *Streptococcus pneumoniae* lysate broth prior to purification, the process comprising the steps of:
- 10 (a) expanding in increasing volumes from a starting container to a production scale container in a soy-based medium a selected *S. pneumoniae* serotype and maintaining a stable pH and temperature during cellular growth;
- (b) lysing with a detergent the bacterial cells produced in step (a), thereby producing a lysate containing soluble proteins, cell debris, nucleic acids and polysaccharide;
- (c) agitating the cellular lysate for a time sufficient to assure complete lysis and polysaccharide release;
- 15 (d) lowering the pH of the cellular lysate to less than 5.5 to precipitate out the detergent and most of the soluble proteins;
- (e) holding the solution and precipitate formed in step (d) without agitation for a time sufficient to allow settling of the precipitate; and
- 20 (f) processing the solution and precipitate by centrifugation and/or filtration, whereby the capsular polysaccharide in solution is preserved and the soluble protein is effectively reduced.
7. The process of claim 6, wherein the selected *S. pneumoniae* serotype is 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F or 19A.
- 25 8. The process of claim 6, wherein the detergent is deoxycholate sodium.
9. The process of claim 6, wherein the pH in step (d) is lowered to between 4.5 and less than 5.5.
- 30 10. The process of claim 6, wherein the pH in step (a) is maintained by a base feed of sodium hydroxide, sodium carbonate, or a combination thereof.

11. A process for reducing the protein content and preserving the capsular polysaccharide content in a complex cellular *Streptococcus pneumoniae* lysate broth prior to purification, the process comprising the steps of:

- 5 (a) expanding in increasing volumes from a starting container to a production scale container in a soy-based medium a *S. pneumoniae* serotype selected from the group consisting of serotypes 1, 4, 6A, 6B and 7F, and maintaining a stable pH and temperature during cellular growth, the pH being maintained with sodium hydroxide;
- 10 (b) lysing with a detergent the bacterial cells produced in step (a), thereby producing a lysate containing soluble proteins, cell debris, nucleic acids and polysaccharide;
- (c) agitating the cellular lysate for a time sufficient to assure complete lysis and polysaccharide release;
- 15 (d) lowering the pH of the cellular lysate to less than 5.5 to precipitate out the detergent and most of the soluble proteins;
- (e) holding the solution and precipitate formed in step (d) without agitation for a time sufficient to allow settling of the precipitate; and
- (f) processing the solution and precipitate by centrifugation and/or filtration,
- 20 whereby the capsular polysaccharide in solution is preserved and the soluble protein is effectively reduced.

12. The process of claim 11, wherein the detergent is deoxycholate sodium.

25 13. The process of claim 11, wherein the pH in step (d) is lowered to between 4.5 and less than 5.5.

14. A process for reducing the protein content and preserving the capsular polysaccharide content in a complex cellular *Streptococcus pneumoniae* lysate broth prior to purification, the process comprising the steps of:

- 30 (a) expanding in increasing volumes *S. pneumoniae* serotype 5, from a starting container to a production scale container in a soy-based medium supplemented with sodium bicarbonate, and maintaining a stable pH and

temperature during cellular growth, the pH being maintained with sodium hydroxide;

- (b) lysing with a detergent the bacterial cells produced in step (a), thereby producing a lysate containing soluble proteins, cell debris, nucleic acids and polysaccharide;
- (c) agitating the cellular lysate for a time sufficient to assure complete lysis and polysaccharide release;
- (d) lowering the pH of the cellular lysate to less than 5.5 to precipitate out the detergent and most of the soluble proteins;
- (e) holding the solution and precipitate formed in step (d) without agitation for a time sufficient to allow settling of the precipitate; and
- (f) processing the solution and precipitate by centrifugation and/or filtration, whereby the capsular polysaccharide in solution is preserved and the soluble protein is effectively reduced.

15

15. The process of claim 14, wherein the detergent is deoxycholate sodium.

16. The process of claim 14, wherein the pH in step (d) is lowered to between 4.5 and less than 5.5.

20

17. A process for reducing the protein content and preserving the capsular polysaccharide content in a complex cellular *Streptococcus pneumoniae* lysate broth prior to purification, the process comprising the steps of:

- (a) expanding in increasing volumes *S. pneumoniae* serotype 19A, from a starting container to a production scale container in a soy-based medium supplemented with sodium bicarbonate, and maintaining a stable pH and temperature during cellular growth, the pH being maintained with sodium carbonate;
- (b) lysing with a detergent the bacterial cells produced in step (a), thereby producing a lysate containing soluble proteins, cell debris, nucleic acids and polysaccharide;
- (c) agitating the cellular lysate for a time sufficient to assure complete lysis and polysaccharide release;



00043

- (d) lowering the pH of the cellular lysate to less than 5.5 to precipitate out the detergent and most of the soluble proteins;
- (e) holding the solution and precipitate formed in step (d) without agitation for a time sufficient to allow settling of the precipitate; and
- 5 (f) processing the solution and precipitate by centrifugation and/or filtration, whereby the capsular polysaccharide in solution is preserved and the soluble protein is effectively reduced.

10 18. The process of claim 17, wherein the detergent is deoxycholate sodium.

19. The process of claim 17, wherein the pH in step (d) is lowered to between 4.5 and less than 5.5.

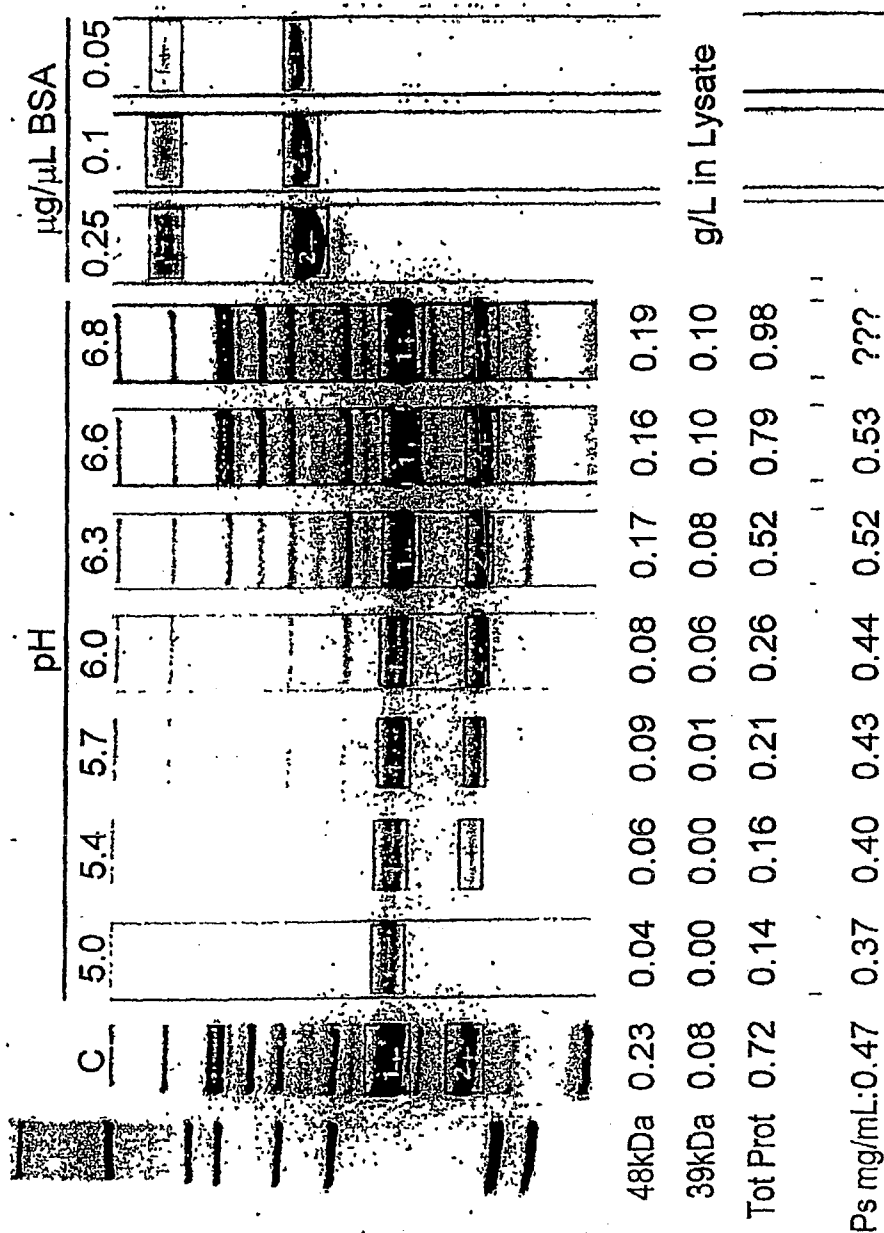


FIG.1

2/6

000045

RRP6B-0013

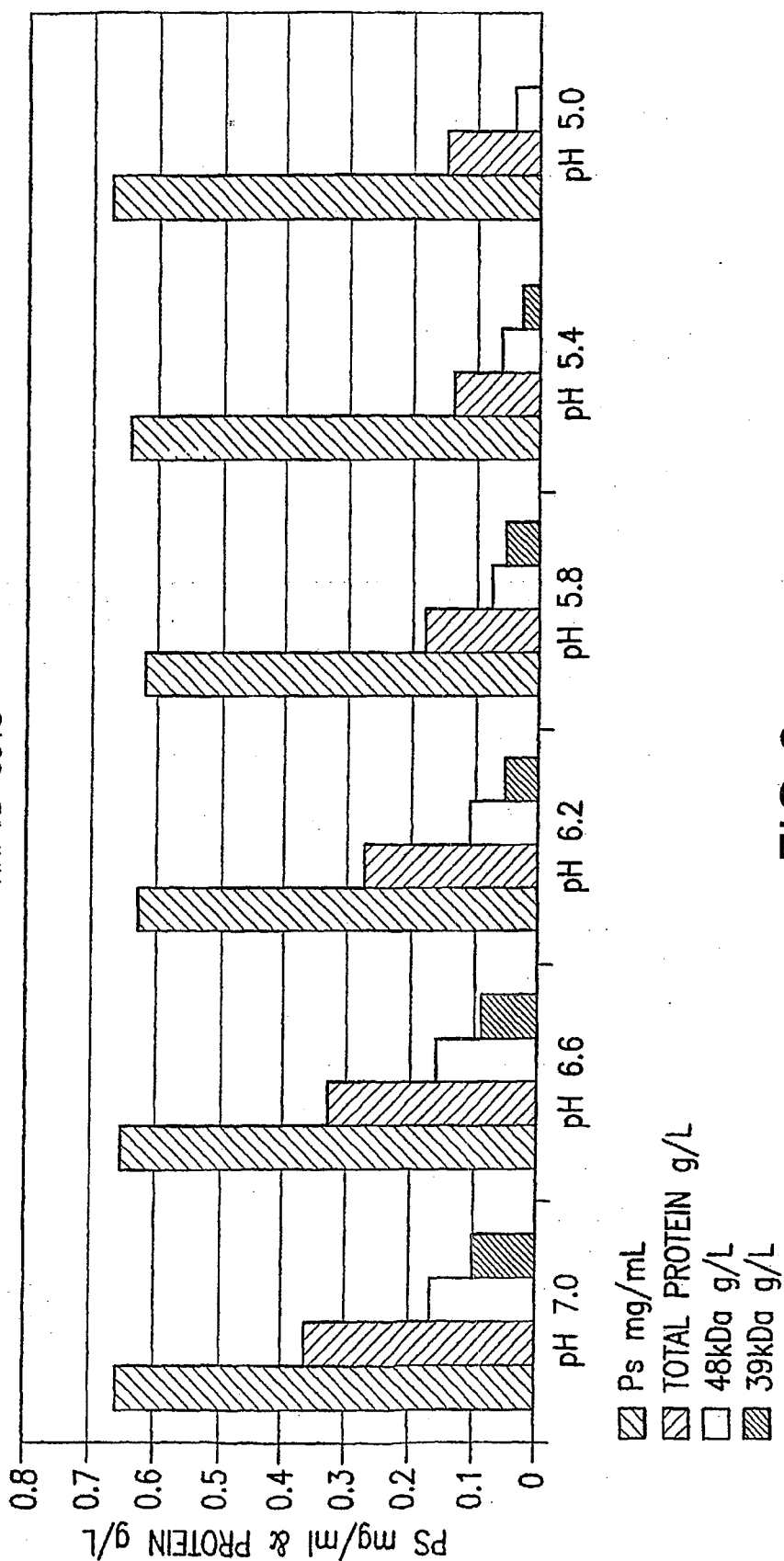


FIG.2

3/6

000046

RRP1-0001 pH ADJUSTMENT STUDY #1

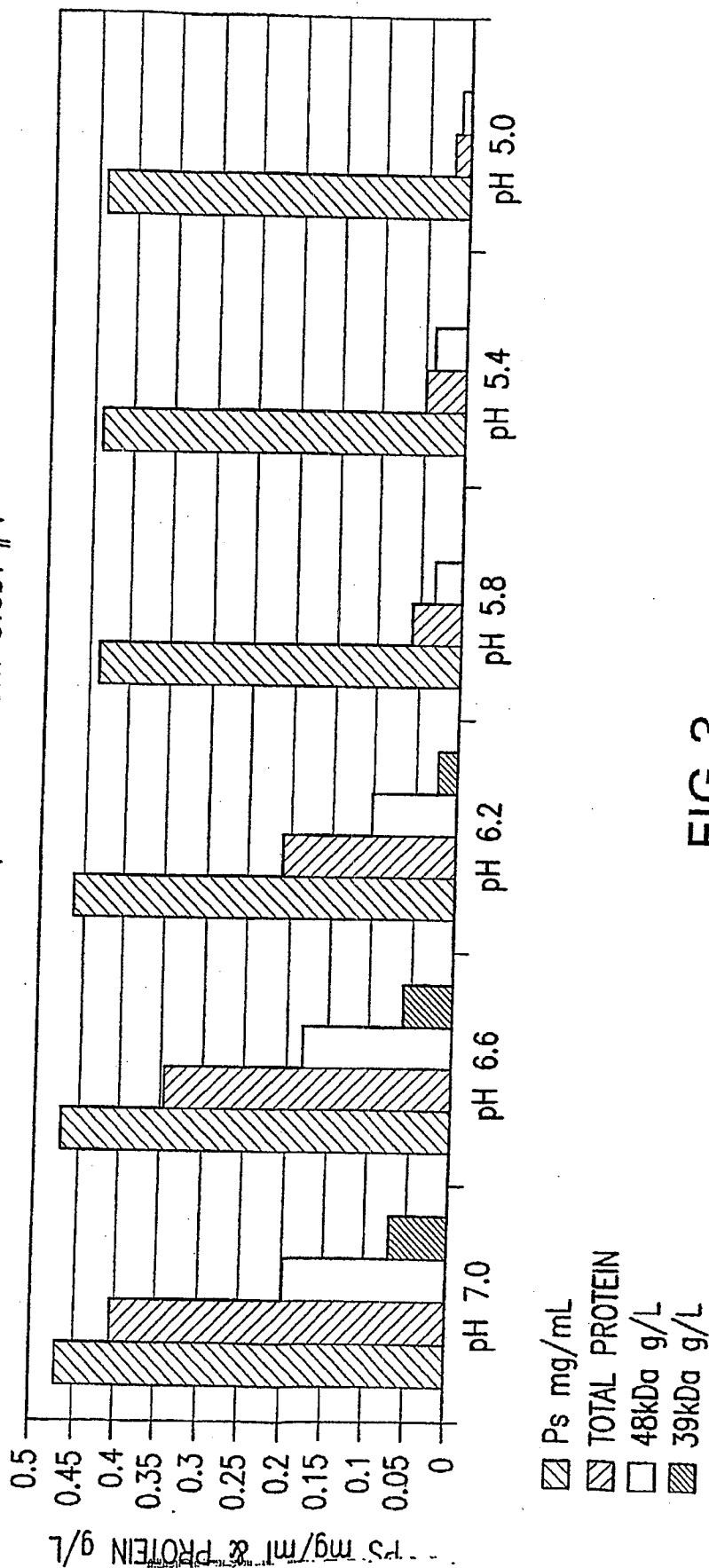


FIG.3

4/6

000027

RRP5-0005 pH STUDY

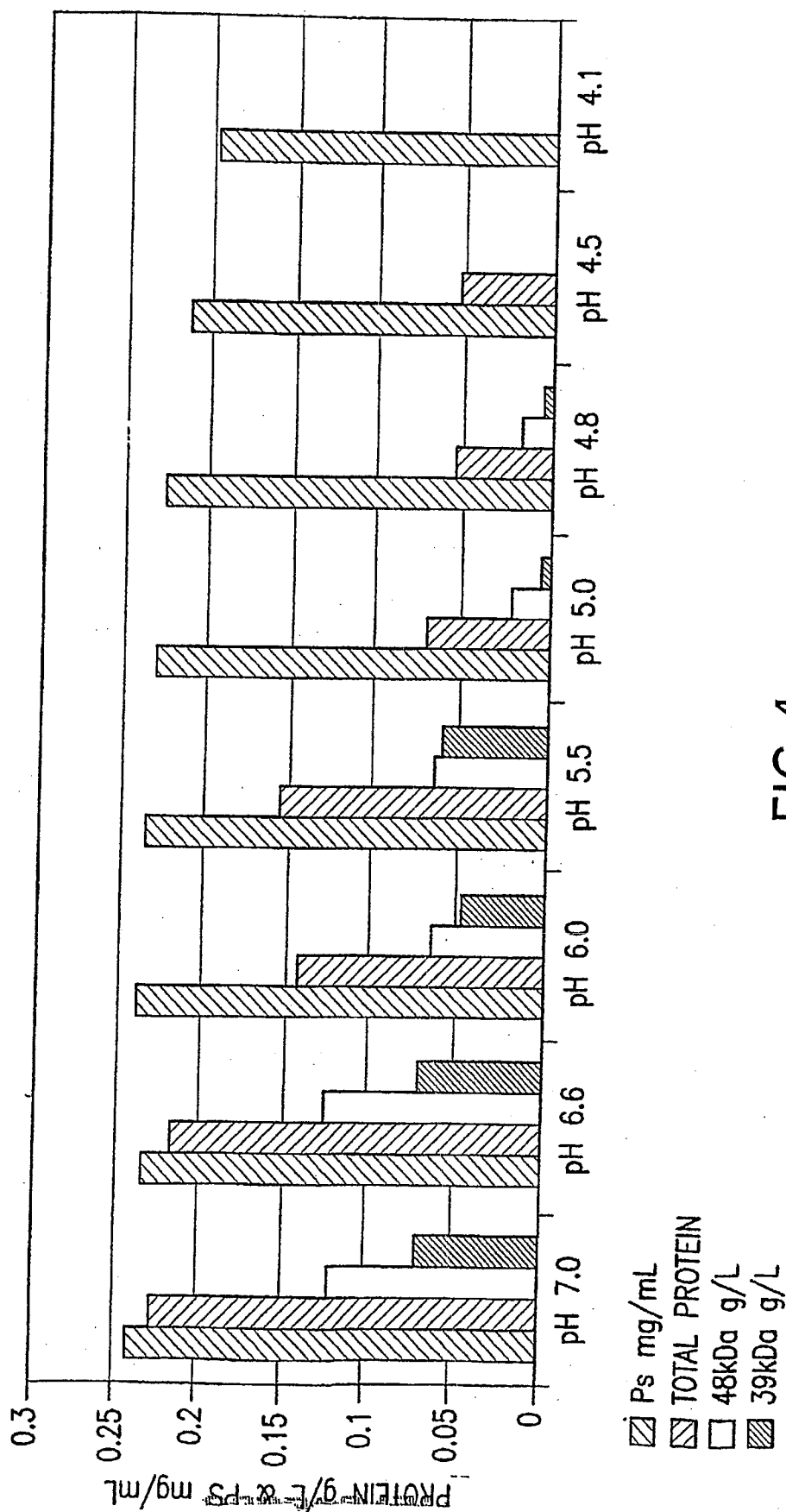


FIG.4

5/6

87000

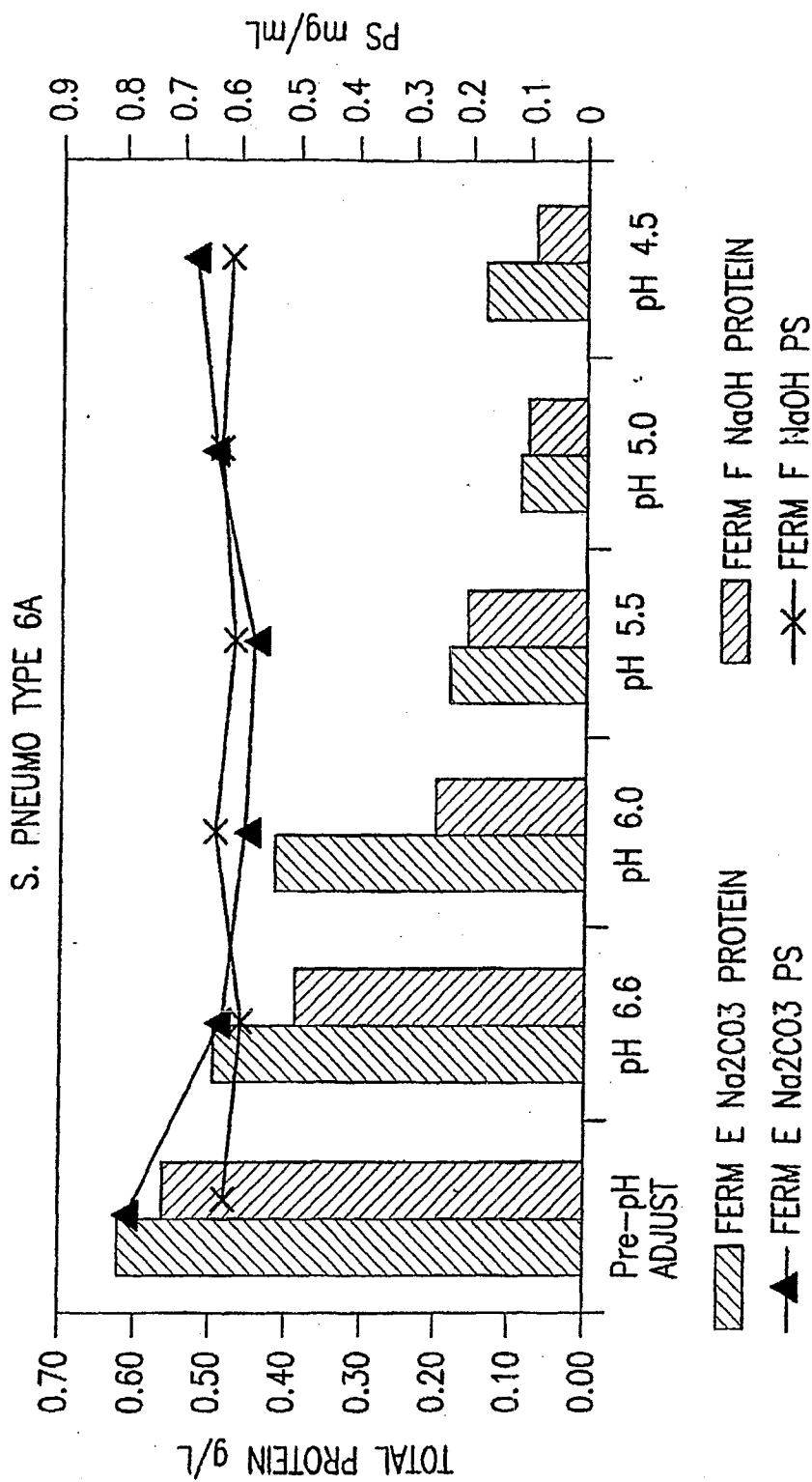


FIG.5

6/6

RRP7F-0007 PS & PROTEIN

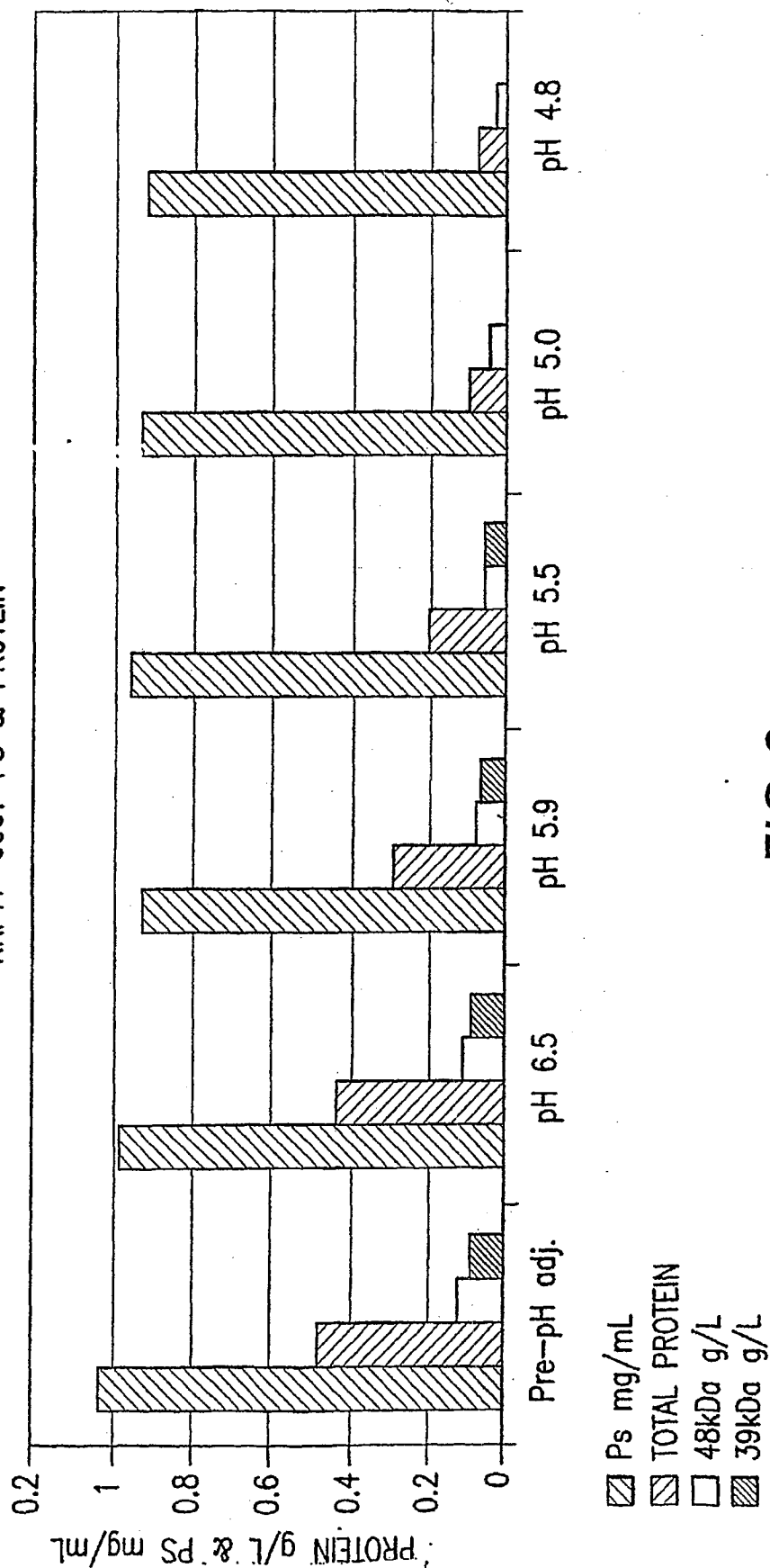


FIG.6

00050

SEPARACIÓN DE CONTAMINANTES DE POLISACÁRIDOS DE *STREPTOCOCCUS*
***PNEUMONIAE* MEDIANTE MANIPULACIÓN DE PH**

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

5

Esta invención se relaciona con métodos para remover el exceso de proteína soluble de lisados celulares de serotipos de *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) utilizados en la producción de polisacáridos neumocócicos.

10

Los polisacáridos capsulares para cada serotipo de *S. pneumoniae* utilizado para productos de vacuna se producen al hacer crecer el organismo en un medio líquido complejo. La población del organismo se aumenta frecuentemente desde un frasco de semilla a botellas de semillas y se pasa a través de uno o más fermentadores de semillas para incrementar el volumen hasta que se alcanzan volúmenes de fermentación de producción a escala. El final del ciclo de crecimiento se puede determinar por uno de

15

varios medios, en los cuales en cuyo punto las células se lisan a través de la adición de un detergente que ayuda en la degradación de la pared celular y liberación de auto lisina que origina la lisis celular cuando las células alcanzan la fase estacionaria. El caldo de cultivo del lisado se cosecha luego para procesamiento corriente abajo (purificación).

20

Esta purificación incluye varias etapas de diafiltración y cromatografía de columna para recuperar los polisacáridos capsulares que rodean las células bacterianas. El polisacárido, cuando se conjuga con una proteína de alto peso molecular, tal como CRM197, y se formula en una vacuna que contiene conjugados de múltiples serotipos, ayuda a conferir inmunidad (para *S. Neumoniae*) cuando se inyecta en la población

25

objetivo, tal como, por ejemplo, infantes y niños.

30

Se han establecido especificaciones para el contenido de proteína en el polisacárido purificado de cada serotipo para reducir el riesgo de eventos adversos de la vacuna. Por ejemplo, en la vacuna (Prevnar®) del conjugado neumocócico (7vPnC) de 7 valencias actualmente comercializado, la especificación para el contenido de proteína en el polisacárido de serotipo 4 purificado no es mayor del 3%, y para el polisacárido de serotipo 6B purificado no es mayor del 2% sobre una base de peso seco.

. 00051

En algunos casos, se ha probado difícil remover la proteína residual que esta aún presente después del proceso de purificación completo. Se hacen esfuerzos para superar este asunto a través de cambios en el procesamiento de purificación del lisado celular cumple solo con éxito moderado.

5

Por lo tanto se decide atacar este asunto en el lado corriente arriba del proceso. Las proteínas contaminantes clave se determinan por ser críticas para la integridad y crecimiento celular. Por lo tanto, las opciones restantes disponibles para reducir la proteína total consisten de alterar el crecimiento y/o condiciones de cosechamiento.

10

El proceso de fermentación bastante directo. Las células (semillas) se expanden en botellas del medio basado en soya, luego pasan a través de uno o dos fermentadores de semillas, y finalmente pasan a un fermentador de producción a escala. En cada etapa la temperatura y el pH se monitorean de cerca con pH que se controla por la adición de un material base (20% de carbonato de sodio). Cuando el crecimiento alcanza un cierto punto, la serie se finaliza por la introducción de un detergente, tal como desoxicolato de sodio (DOC), que inicia un proceso de lisis celular. Después de un periodo de duración, el pH del caldo de cultivo del lisado se ajusta a 6.6 para precipitar los complejos de membrana celular y desoxicolato. Este material se mantiene hasta que se pueda llevar a cabo el proceso por centrifugación y filtración para remover los sólidos.

15

Mucha de la proteína, sin embargo, permanece solubilizada en el lisado unificado, originando el contenido de proteína residual en el polisacárido purificado para exceder la especificación. Así, subsiste la necesidad de reducir los niveles de proteínas solubles en varios serotipos neumocócicos durante los procesos de purificación o fermentación.

20

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención satisface esta necesidad al proporcionar un proceso para reducir el contenido de proteína y preservar el contenido de polisacárido capsular en un caldo de cultivo de lisado de complejo celular de *Streptococcus pneumoniae* antes de purificación. Este proceso comprende las etapas de:

25

30

00052

- (a) Hacer crecer un serotipo de *S. pneumoniae* seleccionado en un medio basado en soya, que incluye:
- 5 (i) Inocular un primer contenedor que contiene el medio basado en soya con materia prima de semillas del serotipo seleccionado, e incubar el primer contenedor hasta que se cumplan los requerimientos de crecimiento, y
- 10 (ii) Inocular un segundo contenedor que contiene el medio basado en soya con el cultivo de la etapa (i) mientras que mantiene un pH en temperatura estable en el segundo contenedor , y
- (b) Lisar con un detergente las células bacterianas producidas en la etapa(a), produciendo por lo tanto un lisado que contiene proteína solubles, residuos celulares, ácidos nucleicos y polisacáridos;
- 15 (c) Agitar el lisado celular durante un tiempo suficiente para asegurar la lisis completa y la liberación de polisacáridos;
- (d) reducir el pH del lisado celular a menos de 5.5 para precipitar el detergente y la mayoría de proteínas solubles;
- 20 (e) Mantener la solución y el precipitado formado en la etapa (b) sin agitación durante un tiempo suficiente para permitir la sedimentación del precipitado; y
- 25 (f) Procesar la solución y precipitar por centrifugación y/o filtración, por lo cual los polisacáridos capsulares en la solución se preserva y la proteína soluble se reduce efectivamente.

30 Ejemplos no limitantes de serotipos de *S. pneumoniae* seleccionados para esta modalidad de la invención son 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F y 19A. En una modalidad particular de la invención, y dependiendo del serotipo que crece en la etapa (a), el pH de la fermentación en la etapa (a) se mantiene mediante una admisión de base de hidróxido de sodio, carbonato de sodio, o una combinación de estos. En otra modalidad, el pH en

00053

la etapa (d) se reduce entre 4.5 y menos de 5.5. En aún otra modalidad, el detergente es desoxicolato de sodio.

Esta invención también se relaciona con un proceso para reducir el contenido de proteína y preservar el contenido de polisacárido capsular en un caldo de cultivo de lisado celular complejo de *Streptococcus pneumoniae* antes de purificación. El proceso comprende las etapas de:

- a) Expandir en un volumen incrementado de un contenedor de partida a un contenedor de producción a escala en un medio basado en soya un serotipo de *S. pneumoniae* seleccionado y mantener una temperatura y pH estable durante el crecimiento celular;
- (b) Lisar con un detergente las células bacterianas producidas en la etapa (a), produciendo por lo tanto un lisado que contiene proteína solubles, restos celulares, ácidos nucleicos y polisacáridos;
- (c) Agitar el lisado celular durante un tiempo suficiente para asegurar la lisis completa y la liberación de polisacáridos;
- (d) Reducir el pH del lisado celular a menos de 5.5 para precipitar el detergente y la mayoría de las proteínas solubles;
- (e) Mantener la solución y el precipitado formado de la etapa (b) sin agitación durante un tiempo suficiente para permitir la sedimentación del precipitado; y
- (f) procesar la solución y el precipitado por centrifugación y/o filtración, por lo cual el polisacárido capsular en la solución se preserva y la proteína soluble se reduce efectivamente.

Ejemplos no limitantes de serotipos de *S. pneumoniae* seleccionados para esta modalidad de la invención son 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F y 19A. En una modalidad particular de la invención, y dependiendo del serotipo que crece en la etapa (a), el pH de la fermentación en la etapa (a) se mantiene mediante una admisión de base de hidróxido

00054

de sodio, carbonato de sodio, o una combinación de estos. En otra modalidad, el pH en la etapa (d) se reduce entre 4.5 y menos de 5.5. En todavía otra modalidad, el detergente es desoxicolato de sodio.

- 5 En aún otra modalidad, cuando el serotipo es el serotipo 5 o 19A, el medio basado en soya se complementa con bicarbonato de sodio.

Esta invención permite la remoción de grandes cantidades de contaminación de excesos de proteínas del lisado celular, dejando por lo tanto un producto más limpio
10 (caldo de cultivo libre de células o CFB) para purificación que obtendrá generalmente mayores recuperaciones de polisacáridos y rendimientos actuales de polisacáridos de lo que son posibles utilizando el método de recuperación y fermentación de la técnica anterior.

15 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 es un gel SDS-PAGE que muestra la reducción significativa en proteína soluble en gramos por litro de lisado mientras el pH se reduce con ácido acético para *S. pneumoniae* Tipo 4. Los componentes 39 kDa y 48 kDa son proteínas de
20 superficie de pared celular. También se muestra el rendimiento de polisacáridos.

La figura 2 es un diagrama de resultados para *S. pneumoniae* Tipo 6B de ajuste de pH a pH 5 que muestra la reducción de proteína como se determina mediante rendimiento de polisacárido (Ps) y SDS-PAGE como se determina con HPLC-SEC con
25 detector de índice de refracción (RI).

La figura 3 es un diagrama de resultados para *S. pneumoniae* Tipo 1 de de ajuste de pH a pH 5 que muestra la reducción de proteína como se determina por Rendimiento de polisacárido y SDS-PAGE como se determina por HPLC-SEC con Detector RI.

30 La Figura 4 es un diagrama de resultados para *S. pneumoniae* Tipo 5 de de ajuste de pH a pH 4.1 que muestra la reducción de proteína como se determina por Rendimiento de polisacárido y SDS-PAGE como se determina por HPLC-SEC con Detector RI.

La Figura 5 es un diagrama de resultados para *S. pneumoniae* Tipo 6A de de ajuste de pH a pH 4.5 de dos series de fermentación diferentes que muestran la reducción de proteína como se determina por Rendimiento de polisacárido y SDS-PAGE como se determina por HPLC-SEC con Detector RI.

La Figura es un diagrama de resultados para *S. pneumoniae* Tipo 7F de de ajuste de pH a pH 4.8 que muestra la reducción de proteína como se determina por Rendimiento de polisacárido y SDS-PAGE como se determina por HPLC-SEC con Detector RI.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Los *Streptococcus pneumoniae* son cocos con forma de lanceta, Gram-positivos, que se ven usualmente en pares (diplococos), pero también en cadenas cortas o como células sencillas, ellas crecen fácilmente en placas agar con sangre con colonias y exhiben emolisis alfa a menos que crezcan anaeróbicamente cuando ellos muestran emolisis beta. Ellos son sensibles a sales de bilis que pueden degradar la pared celular con la presencia de las enzimas propias de la célula, auto lisina. El organismo es un anaerobio aero alertante y es exigente en que este tiene requerimientos nutricionales complejos.

Las células de serotipos más neumocócicos tienen una cápsula que es un recubrimiento de polisacárido que rodea cada célula. Esta cápsula es un determinante de la virulencia en humanos en razón a que esta interfiere con la fagocitosis al evitar que los anticuerpos ataquen a las células bacterianas. Actualmente existen 90 serotipos capsulares identificados, con 23 serotipos responsables de aproximadamente 90% de las enfermedades invasivas. El recubrimiento de polisacárido como una vacuna puede conferir un grado razonable de inmunidad (para *S. pneumoniae*) en individuos con sistemas inmunes desarrollados o no alterados, pero una proteína conjugada con un polisacárido permite una respuesta inmune en infantes y ancianos que también están en su mayoría en riesgo de infecciones neumocócicas. Es importante ser capaz de separar este polisacárido capsular de la bacteria lisada (muerta) y remover tal residuo celular

00056

tanto como sea posible. Como se describe aquí, esta remoción se logra en una serie de cambios de procesos de fermentación.

5 Los tres cambios mayores que han mejorado grandemente el procesamiento corriente abajo son como sigue: (1) cambiar el alimento de base de fermentación de carbonato de sodio a hidróxido de sodio cuando sea posible; (2) mantener la agitación en el fermentador durante el intervalo de duración del deoxicolato; y (3) reducir el pH después de la duración del lisado de desoxicolato a menos de 5.5.

10 El descubrimiento inicial es que al reducir el pH a menos de 5.5, de 50-90% de la proteína soluble indeseable se puede remover del lisado celular antes de procesamiento corriente abajo (purificación). Mientras estos es una mejora del proceso muy importante, el uso de grandes volúmenes de carbonato de sodio para mantener el punto de ajuste de pH durante las series de fermentación origina un serio problema de espumación cuando
15 el pH se ajusta a 5.0 con ácido acético. También se descubrió que un pH estable es difícil de mantener después del ajuste en razón a las múltiples formas que existen de carbonato en la solución. Esto conduce a buscar en alimentos base alternos que no crearían una concentración de carbonato en el caldo de cultivo de fermentación. El hidróxido de sodio se selecciona en razón a que este ya se está utilizando para ajustar el
20 pH del medio y las botellas de semilla antes inoculación. Estudios hasta de 100L de fermentaciones indican que esta es una alternativa viable solo con una menor reducción en crecimiento, basado en la densidad óptica (OD). Esto también resolver el problema de la espumación. A pesar que se pueden utilizar otras bases de hidróxido de sodio, y de bicarbonato de sodio se pueden utilizar como un complemento cuando se determina que
25 el organismo requiere alguna forma de carbonato para mantener el crecimiento, por ejemplo, tal como con los serotipos 5 y 19A. Si se utiliza carbonato de sodio como el alimento de base primario, tal como para el serotipo 19A, entonces el ajuste del pH del post lisado (para un pH de menos de 5.5) requiere una adición de ácido controlada multi hora para evitar la espumación.

30

Finalmente, basado en observaciones de laboratorio, se determina que si el desoxicolato permanece sin agitación (como en un protocolo anterior), un gel similar al precipitado podría sedimentarse en las paredes del fermentador y en la sonda del pH. Esto crea lecturas de pH in situ no confiables cuando se ajusta el pH. La etapa de

00057

agitación evita que este precipitado se forme y permite que se mantenga la integridad de la sonda del pH.

Así, en la invención reivindicada actualmente, los serotipos de *Streptococcus*
5 *pneumoniae* seleccionados se expanden en volúmenes incrementados a partir de
frascos de semillas en un medio estéril compuesto de, por ejemplo, un producto basado
en soya digerido por enzimas, cloruro de sodio, fosfato de potasio mono básico, cloruro
de calcio y un aminoácido seleccionado. La dextrosa con sulfato de magnesio se utiliza
10 como la fuente de carbón para sostener el crecimiento en el medio líquido. El medio
también se puede complementar con otros aditivos según se requiera por el proceso o
serotipo específico. El cultivo inicia en un primer contenedor, tal como botellas de
semilla, que, después de un intervalo de crecimiento en una incubadora convencional, se
utiliza para inocular un segundo contenedor, tal como un fermentador de semilla, que se
a su vez se puede utilizar para inocular, si se desea, al menos un contenedor
15 progresivamente mayor, tal como un fermentador de reproducción, hasta que se alcanza la
producción a escala. En una modalidad, un serotipo de *S. pneumoniae* seleccionado se
expande en volúmenes incrementados a partir de frascos de semilla a botellas de semilla
a un fermentador de 20 L a un fermentador de 200 L a un fermentador de producción de
2000 L. Los parámetros de crecimiento se monitorean de cerca para densidad óptica,
20 temperatura y pH con el fin de determinar cuando transferir el cultivo a la siguiente
escala de fermentación y también cuando terminar la serie de tanda.

Cuando la bacteria entra a la fase estacionaria, las células en el fermentador de
producción se fuerzan a entrar en lisis por la adición de un detergente, tal como un
25 detergente aniónico o catiónico. Ejemplos representativos de tales detergentes incluyen
desoxicolato de sodio, N-lauril sarcosina, ácido quenodeoxicólico de sodio, y saponinas.
Después de agitar el lisado celular durante un tiempo suficiente para asegurar la
completa muerte celular, por ejemplo, durante un tiempo entre 8 y 24 horas y una
temperatura entre 7 °C y 13 °C, la segunda fase del proceso es reducir el pH del lisado
30 celular a menos de pH 5.5 con una solución ácida, tal como 50% de ácido acético. La
presente reducción de pH varía con el propósito de ser capaz de estar por debajo de la
especificación de proteína purificada final en una base consistente requerida para un
proceso de producción robusto. En una modalidad particular de la invención, el pH se
reduce entre 4.5 y menos 5.5.

0058

La etapa de reducción del pH origina un "salazón" (precipitación) de proteínas solubles. Este es un efecto químico bien conocido en proteínas ya que ellas pueden alcanzar sus puntos isoelectricos. Lo que hace que esta etapa única en la actual invención es que esta se utiliza como una etapa de purificación en un caldo de cultivo de lisado extra celular altamente complejo. El caldo de cultivo se define como "complejo" ya que este contiene componentes de medio, ADN, proteínas, polisacáridos, ARN, y otros residuos celulares.

En adición al ácido acético, los procesos reivindicados también se han mostrado que trabajan con ácidos fosfóricos y sulfúricos, y deben trabajar con eficiencia variante luego de la serie Hofmeister de la cual estos ácidos hacen parte. Las series Hofmeister es la clasificación de varios aniones y cationes su capacidad para precipitar mezclas de proteínas. La concentración final de estos compuestos (en las series Hofmeister) en la solución determina la solubilidad final de las varias proteínas.

Después de un tiempo de duración, sin agitación, que es suficiente para permitir la sedimentación de precipitado y por lo tanto ayudar en el proceso continuo de centrifugación, tal como, por ejemplo, entre 12 y 24 horas en una temperatura entre 15 °C y 25° C, una porción significativa de sus proteínas previamente solubles (y probablemente algunos de los otros componentes contaminantes solubles previos) cae de la solución como un precipitado sólido con poca pérdida o degradación del producto de polisacárido que permanece en la solución.

Esta solución con el precipitado se procesa luego a través de una centrifuga continua o alternadamente mediante centrifugación con botellas estándar. El súper nadante que contiene el polisacárido se recolecta y corre a través de un particulado y filtración de nitrotes antes de ser transferido para concentración y purificación corriente abajo.

Los resultados de utilizar el proceso de esta invención se describen en las Figuras. La Figura 1 muestra un gel SDS-PAGE representativo de la reducción de proteína observada utilizando ácido acético para reducir el pH de 6.8 a 5.0 en el cultivo de caldo de lisado celular para el serotipo 4 de *S. pneumoniae*. La línea distante a la

00059

izquierda es un marcador de peso molecular utilizado como una referencia para peso de proteína. La línea de muestra 1 ("C") es un control que no se ajusta al pH. Los números muestran el valor aproximado (g/L en cambio de cultivo lisado) de las dos bandas contaminantes mayores de proteína (48kDa y 39kDa) y también la proteína total en la línea completa. También se muestra el rendimiento total del polisacárido contenido en una alícuota de muestra presentada para análisis HPLC-SEC Las líneas 2-8 muestran la misma información de las muestras de pH ajustado. Las líneas 9-11 son estándares BSA utilizados para determinar los rendimientos de proteína mediante análisis de regresión lineal básico. El análisis Ps no se hace en la muestra de pH 6.8. En este serotipo particular, hubo alguna pérdida moderada de polisacáridos (Ps) pero en mucho menor nivel que la pérdida de proteína a través de la reducción de pH.

La Figura 2 es una gráfica que ilustra la reducción de proteína en el lisado celular del serotipo 6B de *S. pneumoniae* junto con la estabilidad del rendimiento del polisacárido cuando el pH del lisado celular se reduce a 5.0. No se observa pérdida de polisacárido con este serotipo. Por el contrario, la proteína total se reduce a más de la mitad.

La Figura 3 es una gráfica que ilustra la reducción de proteína en el lisado celular del serotipo 1 de *S. pneumoniae* junto con la estabilidad de rendimiento de polisacárido cuando el pH del lisado celular se reduce a 5.0. Casi no se observa cambio en la concentración de polisacárido. Por el contrario, se reduce la proteína total a más del 90%.

La Figura 4 es una gráfica que ilustra la reducción de proteína en el lisado celular del serotipo 1 de *S. pneumoniae* junto con la estabilidad de rendimiento de polisacárido cuando el pH del lisado celular se reduce a 4.1. Casi no se observa cambio en la concentración de polisacárido hasta muy bajo pH, que se atribuye a un efecto de dilución debido a la cantidad de ácido agregado. Por el contrario, se reduce la proteína total a más del 75% en pH 4.5.

La Figura 5 es una gráfica de dos series de fermentación diferentes que ilustran la reducción de proteína en el lisado celular del serotipo 6A de *S. pneumoniae* 5 junto con la estabilidad de rendimiento de polisacárido cuando el pH del lisado celular se

00000

reduce a 4.5. Casi no se observa cambio en la concentración de polisacárido. Esta gráfica también muestra que las concentraciones de polisacárido se mantienen mientras que las concentraciones de proteína se reducen cuando se utiliza NaOH en cambio de Na_2CO_3 .

5

La Figura 6 es una gráfica que ilustra la reducción de proteína en el lisado celular del serotipo 7F *S. pneumoniae* junto con la estabilidad de rendimiento de polisacárido cuando el pH del lisado celular se reduce a 4.8. Casi no se observa cambio en la concentración de polisacárido. Por el contrario, se reduce la proteína total a más del 80% en pH 4.8.

10

La tabla 1 adelante es representativa de alguna ganancia de polisacárido y reducción de proteína de polisacáridos purificados finales después que se utiliza el proceso de esta invención.

15

Tabla 1. Concentración de proteína y rendimiento de polisacárido para varios Serotipos de *S. pneumoniae*

Serotipo	Especificación de proteína	Proceso original		Proceso de la invención	
		Conc. proteína	Rendimiento Ps	Conc. proteína	Rendimiento Ps
1	$\leq 2.0\%$	11.7%	11.2g	$< 0.8\%$	15~20g
5	$\leq 7.5\%$	10.2%	6.0g	$< 6.5\%$ *	8~13g
7F	$\leq 5.0\%$	0.2%	19.2g	0.2%	53g
6A	$\leq 2.0\%$	NA	NA	0.3%	21.6g

20

*El proceso de fermentación muestra una reducción de proteína del 80% de material de lisado DOC pero la remoción de proteína adicional no es tan eficiente durante el proceso de purificación.

25

Los cambios en los procesos de fermentación destacados anteriormente sirven para reducir grandemente el contenido de proteína del caldo de cultivo del lisado antes

000001

del procesamiento de purificación. Esto ha permitido al producto purificado cumplir la especificación de proteínas sin modificación significativa de los procesos de purificación actuales para recuperación de polisacáridos. Un beneficio inesperado de estos cambios es una mejora del rendimiento de purificación del polisacárido rendimiento total de 25-100% a pesar del crecimiento ligeramente menor como se determina por OD. Esta es una mejora robusta del proceso de fermentación/recuperación que puede mejorar grandemente la producción de polisacáridos neumocócicos.

La anterior descripción describe de manera general la presente invención. Un entendimiento más completo se puede obtener por referencia a los siguientes ejemplos específicos. Estos ejemplos se describen únicamente para propósito de ilustración y no están destinados a limitar el alcance de la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Reducción de proteína en el lisado celular de Serotipos 1, 6A y 7F de *S. pneumoniae*

Preparación de bancos celulares de trabajo y maestros

Se obtiene el serotipo 1 de *S. pneumoniae* del American Type Culture Collection, ATCC, cepa 6301. Los serotipos 6A y 7F de *S. pneumoniae* se obtiene del Doctor. Gerald Shiftman de la Universidad Estatal de New York. Se crean varias generaciones de semillas con el fin de expandir la cepa y remover componentes de origen animal (generaciones F1, F2, y F3). Se producen dos generaciones adicionales de semilla. La primera generación adicional se hace a partir de un frasco F3, y la posterior generación se hace a partir de un frasco de la primera generación adicional. Los frascos de semilla se almacenan congelados (<-70°C) con glicerol sintético como un criopreservante. Adicionalmente a los frascos congelados, los frascos liofilizados se preparan para la generación F4. Para la preparación de bancos celulares, los cultivos se hacen crecer en medio basado en soya. Antes de congelamiento, las células se concentran por centrifugación, se remueve el medio gastado, y los glóbulos celulares se resuspenden en medio fresco que contiene un criopreservante, tal como glicerol sintético.

00002

Fermentación y recuperación

Se utilizan cultivos del banco celular de trabajo para inocular botellas de semillas que contienen un medio basado en soya (Tabla 2). Las botellas se incuban a 36 °C ± 2°C sin agitación hasta que se cumplan los requerimientos de crecimiento. Se utiliza una botella de semilla para inocular un fermentador de semillas que contiene el medio basado en soya. Un pH de aproximadamente 7 se mantiene con 3N NaOH. Después que se alcanza la densidad óptica objetivo, se utiliza el fermentador de semillas para inocular el fermentador de producción que contiene el medio basado en semilla. El pH se mantiene con 3N NaOH. La fermentación se termina después que cesa el crecimiento o cuando se alcanza el volumen de trabajo del fermentador. Una cantidad apropiada de 12% de desoxicolato de sodio estéril se agrega al cultivo para obtener una concentración 0.12% - 0.13% en el caldo de cultivo, para lisar las células bacterianas y la liberación de polisacárido asociado a la célula. Después de lisar, los contenidos del fermentador se agita durante un intervalo de tiempo entre 8 a 24 horas a una temperatura entre 7 °C y 13 °C, para asegurar que la lisis celular completa y la liberación del polisacárido hubieran ocurrido. La agitación durante este periodo de mantenimiento impidió el sedimento del lisado se asentara en las paredes del fermentador y la probeta de pH, permitiendo así que se mantuviera la integridad de la probeta de pH. Luego, el pH del caldo de cultivo lisado se ajustó a aproximadamente un pH de 5.0 con 50% de ácido acético. Después de un tiempo de mantenimiento sin agitación, durante un intervalo de tiempo entre 12 a 24 horas a una temperatura entre 15 °C y 25 °C una porción significativa de las proteínas solubles previas se sacó de la solución como un precipitado sólida con poca pérdida o degradación del polisacárido, el cual permaneció en la solución. La solución con el precipitado se clarificó entonces mediante centrifugación del flujo continuo seguido por una filtración de profundidad y una micro filtración de 0.45 µm.

A una escala más pequeña, el proceso descrito anteriormente también resultó en una reducción significativa de la proteína total para los serotipos 4 y 6B (Figuras 1 y 2), lo que indica que el proceso trabaja para estos dos serotipos a una escala más grande. (Serotipos de *S. pneumoniae* 4 y 6B también se obtuvieron del Doctor. Gerald Shiffman de la Universidad Estatal de New York.)

Tabla 2. Composición del medio con base en soya

Componente	Concentración de la línea base	Baja concentración	Alta concentración
HySoy	28g/L	18g/L	38g/L
NaCl	3.5g/L	3.5g/L	3.5g/L
KH ₂ PO ₄	0.7g/L	0.7g/L	0.7g/L
CaCl ₂ ·H ₂ O	0.018g/L	0.018g/L	0.018g/L
L-Cisteína, HCl	0.21g/L	0.21g/L	0.21g/L

Ejemplo 2

5

Reducción de la proteína en el lisado celular del serotipo 5 del *S. pneumoniae*

El serotipo 5 del *S. pneumoniae* se obtuvo del de Doctor Gerald Schiffman de la Universidad Estatal de New York, Brooklyn, New York. Para la preparación del sistema de banco celular, ver el Ejemplo 1.

10

Fermentación y recuperación

Se utilizan cultivos del banco celular de trabajo para inocular botellas de semillas que contienen un medio basado en soya descrito anteriormente (Tabla 2). Dicho medio se suplementó con una solución de NaHCO₃ estéril a una concentración de 10 mM. Las botellas se incuban a 36 °C ± 2°C sin agitación hasta que se cumplan los requerimientos de crecimiento. Se utiliza una botella de semilla para inocular un fermentador de semillas que contiene el medio basado en soya con una concentración de NaHCO₃ de 10 mM en el medio. Un pH de aproximadamente 7 se mantiene con 3N NaOH. Después que se alcanza la densidad óptica objetivo, se utiliza el fermentador de semillas para inocular el fermentador de producción que contiene el medio basado en soya con una concentración de 10 mM de NaHCO₃ en el medio. El pH se mantiene con 3N NaOH. La fermentación se termina después que cesa el crecimiento o cuando se alcanza el volumen de trabajo del fermentador. Una cantidad apropiada de 12% de desoxicolato de sodio estéril se agrega al cultivo para obtener una concentración entre 0.12% - 0.13% en el caldo, para lisar las células bacterianas y la liberación de polisacárido asociado a la célula. Después de lisar, los contenidos del fermentador se agitan durante un intervalo

15

20

25

00004

de tiempo entre 8 a 24 horas a una temperatura entre 7 °C y 13 °C, para asegurar que la lisis celular completa y la liberación del polisacárido hubieran ocurrido. La agitación durante este periodo de mantenimiento impidió que el sedimento del lisado se asentara en las paredes del fermentador y la probeta de pH, permitiendo así que se mantuviera la integridad de la probeta de pH. Luego, el pH del caldo de cultivo lisado se ajustó a aproximadamente un pH de 4.8 con 50% de ácido acético. Después de un tiempo de mantenimiento sin agitación, durante un intervalo de tiempo entre 12 a 24 horas a una temperatura entre 15 °C y 25 °C una porción significativa de las proteínas solubles previas se sacó de la solución como un precipitado sólido con poca pérdida o degradación del polisacárido, el cual permaneció en la solución. La solución con el precipitado se clarificó entonces mediante centrifugación del flujo continuo seguido por una filtración de profundidad y una micro filtración de 0.45 µm.

Debería entenderse que la discusión anterior y los ejemplos presentan meramente una descripción detallada de ciertas modalidades. Por lo tanto debería ser evidente usualmente para aquellos versados en la técnica que diversas modificaciones y equivalentes pueden hacerse sin salirse del espíritu y alcance de la invención.

REIVINDICACIONES

Lo que se reivindica es:

- 5 1. Un proceso para reducir el contenido de proteína y preservar el contenido de polisacárido capsular en un caldo de lisado celular complejo de *Streptococcus pneumoniae* antes de la purificación, el proceso comprende las etapas de:
 - 10 (a) hacer crecer un serotipo de *S. pneumoniae* seleccionado en un medio basado en soya, que incluye:
 - 15 (i) inocular un primer contenedor que contiene el medio basado en soya con material de semilla del serotipo seleccionado, e incubar el primer contenedor hasta que se cumplan los requerimientos de crecimiento,
 - (ii) inocular un segundo contenedor que contiene el medio basado en soya con el cultivo de la etapa (i) mientras se mantiene un pH y una temperatura estables en el segundo contenedor, y
 - 20 (b) lisar con un detergente las células bacterianas producidas en la etapa (a), produciendo así un lisado que contiene proteínas solubles, desechos de células, ácidos nucleicos y polisacárido;
 - (c) agitar el lisado celular durante un tiempo suficiente para asegurar la lisis completa y la liberación de polisacárido completa;
 - 25 (d) disminuir el pH del lisado celular a menos de 5.5 para precipitar el detergente y la mayor parte de las proteínas solubles;
 - 30 (e) mantener la solución y el precipitado formado en la etapa (d) sin agitación durante un tiempo suficiente para permitir el asentamiento del precipitado; y

annex

- (f) procesar la solución y el precipitado mediante centrifugación y/o filtración, mientras que se preserva el polisacárido capsular en la solución y la proteína soluble se reduce de manera efectiva.
- 5 2. El proceso de la reivindicación 1, en donde el serotipo seleccionado de *S. pneumoniae* es 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F o 19A.
3. El proceso de la reivindicación 1, en donde el detergente es desoxicolato de sodio.
- 10 4. El proceso de la reivindicación 1, en donde el pH en la etapa (d) se disminuye hasta entre 4.5 y menos de 5.5.
- 15 5. El proceso de la reivindicación 1, en donde el pH en la etapa (a) se mantiene mediante una alimentación base de hidróxido de sodio, carbonato de sodio, o una combinación de estos.
- 20 6. Un proceso para reducir el contenido de proteína y preservar el contenido de polisacárido capsular en un caldo de lisado celular complejo de *Streptococcus pneumoniae* antes de la purificación, el proceso comprende las etapas de:
- 25 (a) expandir en volúmenes incrementales desde un contenedor de partida hasta un contenedor a escala de producción en un medio basado en soya un serotipo de *S. pneumoniae* seleccionado y mantener un pH estable y una temperatura durante el crecimiento celular;
- 30 (b) lisar con un detergente las células bacterianas producidas en la etapa (a), produciendo así un lisado que contiene proteínas solubles, desechos de células, ácidos nucleicos y polisacárido;
- (c) agitar el lisado celular durante un tiempo suficiente para asegurar la lisis completa y la liberación de polisacárido;

00007

- (d) disminuir el pH del lisado celular a menos de 5.5 para precipitar el detergente y la mayor parte de las proteínas solubles;
- (e) mantener la solución y el precipitado formados en la etapa (d) sin agitación durante un tiempo suficiente para permitir el asentamiento del precipitado; y
- (f) procesar la solución y el precipitado mediante centrifugación y/o filtración, mientras que se preserva el polisacárido capsular en la solución y la proteína soluble se reduce de manera efectiva.
7. El proceso de la reivindicación 6, en donde el serotipo seleccionado de *S. pneumoniae* es 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F o 19A.
8. El proceso de la reivindicación 6, en donde el detergente es desoxicolato de sodio.
9. El proceso de la reivindicación 6, en donde el pH en la etapa (d) se disminuye entre 4.5 y menos de 5.5.
10. El proceso de la reivindicación 6, en donde el pH en la etapa (a) se mantiene mediante una alimentación base de hidróxido de sodio, carbonato de sodio, o una combinación de estos.
11. Un proceso para reducir el contenido de proteína y preservar el contenido de polisacárido capsular en un caldo de lisado celular complejo de *Streptococcus pneumoniae* antes de la purificación, el proceso comprende las etapas de:
- (a) expandir en volúmenes incrementales desde un contenedor de partida hasta un contenedor a escala de producción en un medio basado en soya un serotipo de *S. pneumoniae* seleccionado del grupo que consiste de los serotipos 1, 4, 6A, 6B y 7F, y mantener un pH estable y una temperatura estable durante el crecimiento celular, el pH es mantenido con hidróxido de sodio;

انواع

- (b) lisar con un detergente las células bacterianas producidas en la etapa (a), produciendo así un lisado que contiene proteínas solubles, desechos de células, ácidos nucleicos y polisacárido;
- 5 (c) agitar el lisado celular durante un tiempo suficiente para asegurar la lisis completa y la liberación de polisacárido;
- (d) disminuir el pH del lisado celular a menos de 5.5 para precipitar el detergente y la mayor parte de las proteínas solubles;
- 10 (e) mantener la solución y el precipitado formado en la etapa (d) sin agitación durante un tiempo suficiente para permitir el asentamiento del precipitado; y
- (f) procesar la solución y el precipitado mediante centrifugación y/o filtración, mientras que se preserva el polisacárido capsular en la solución y la proteína soluble se reduce de manera efectiva.
- 15
12. El proceso de la reivindicación 11, en donde el detergente es desoxicolato de sodio.
- 20
13. El proceso de la reivindicación 11, en donde el pH en la etapa (d) se disminuye entre 4.5 y menos de 5.5.
14. Un proceso para reducir el contenido de proteína y preservar el contenido de polisacárido capsular en un caldo de lisado celular complejo de *Streptococcus pneumoniae* antes de la purificación, el proceso comprende las etapas de:
- 25
- (a) expandir en volúmenes incrementales el serotipo 5 de *S. pneumoniae*, desde un contenedor de partida hasta un contenedor a escala de producción en un medio basado en soya suplementado con bicarbonato de sodio, y mantener un pH estable y una temperatura durante el crecimiento celular, el pH es mantenido con hidróxido de sodio;
- 30

nnnsg

- (b) lisar con un detergente las células bacterianas producidas en la etapa (a), produciendo así un lisado que contiene proteína solubles, desechos de células, ácidos nucleicos y polisacárido;
- 5 (c) agitar el lisado celular durante un tiempo suficiente para asegurar la lisis completa y la liberación de polisacárido;
- (d) disminuir el pH del lisado celular a menos de 5.5 para precipitar el detergente y la mayor parte de las proteínas solubles;
- 10 (e) mantener la solución y el precipitado formados en la etapa (d) sin agitación durante un tiempo suficiente para permitir el asentamiento del precipitado; y
- (f) procesar la solución y el precipitado mediante centrifugación y/o filtración, mientras que se preserva el polisacárido capsular en la solución y la proteína soluble se reduce de manera efectiva.
- 15
15. El proceso de la reivindicación 14, en donde el detergente es desoxicolato de sodio.
- 20
16. El proceso de la reivindicación 14, en donde el pH en la etapa (d) se disminuye entre 4.5 y menos de 5.5.
17. Un proceso para reducir el contenido de proteína y preservar el contenido de polisacárido capsular en un caldo de lisado celular complejo de *Streptococcus pneumoniae* antes de la purificación, el proceso comprende las etapas de:
- 25
- (a) expandir en volúmenes incrementales el serotipo 19A de *S. pneumoniae*, desde un contenedor de partida hasta un contenedor a escala de producción en un medio basado en soya suplementado con bicarbonato de sodio, y mantener un pH estable y una temperatura durante el crecimiento celular, el pH es mantenido con carbonato de sodio;
- 30

000070

- (b) lisar con un detergente las células bacterianas producidas en la etapa (a), produciendo así un lisado que contiene proteína solubles, desechos de células, ácidos nucleicos y polisacárido;
- 5 (c) agitar el lisado celular durante un tiempo suficiente para asegurar la lisis completa y la liberación de polisacárido;
- (d) disminuir el pH del lisado celular a menos de 5.5 para precipitar el detergente y la mayor parte de las proteínas solubles;
- 10 (e) mantener la solución y el precipitado formados en la etapa (d) sin agitación durante un tiempo suficiente para permitir el asentamiento del precipitado; y
- (f) procesar la solución y el precipitado mediante centrifugación y/o filtración, mientras que se preserva el polisacárido capsular en la solución y la proteína soluble se reduce de manera efectiva.
- 15
18. El proceso de la reivindicación 17, en donde el detergente es desoxicolato de sodio.
- 20
19. El proceso de la reivindicación 17, en donde el pH en la etapa (d) se disminuye entre 4.5 y menos de 5.5.

00071

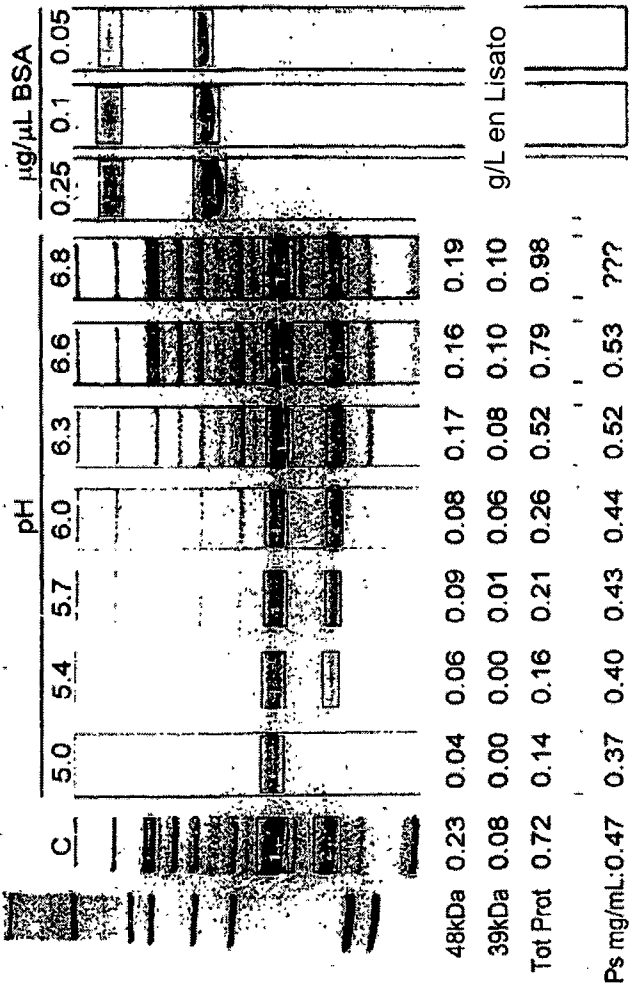
**SEPARACIÓN DE CONTAMINANTES DE POLISACÁRIDOS DE STREPTOCOCCUS
PNEUMONIAE MEDIANTE MANIPULACIÓN DE PH**

RESUMEN

5

10

Un proceso para reducir el contenido de proteína y preservar el contenido de polisacárido capsular en un caldo de lisado celular complejo de *Streptococcus pneumoniae* antes de la purificación se describe. Utilizando la reducción de pH después de la lisis celular ha resultado en un polisacárido purificado que cumple consistentemente la especificación de proteína, y productos de recuperación mayores del polisacárido durante el proceso de purificación.



000073

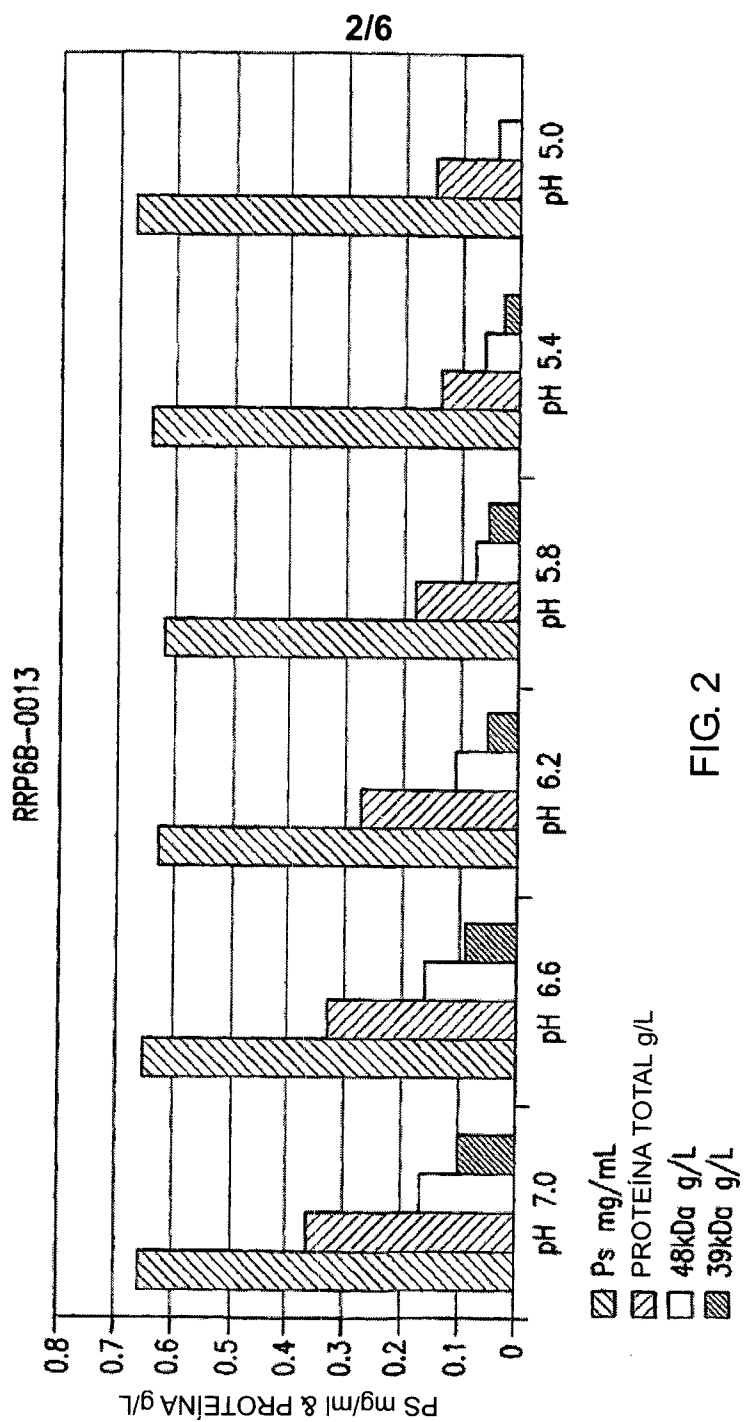


FIG. 2

000074

3/6

ESTUDIO DE AJUSTE DE PH #1 RRP1-0001

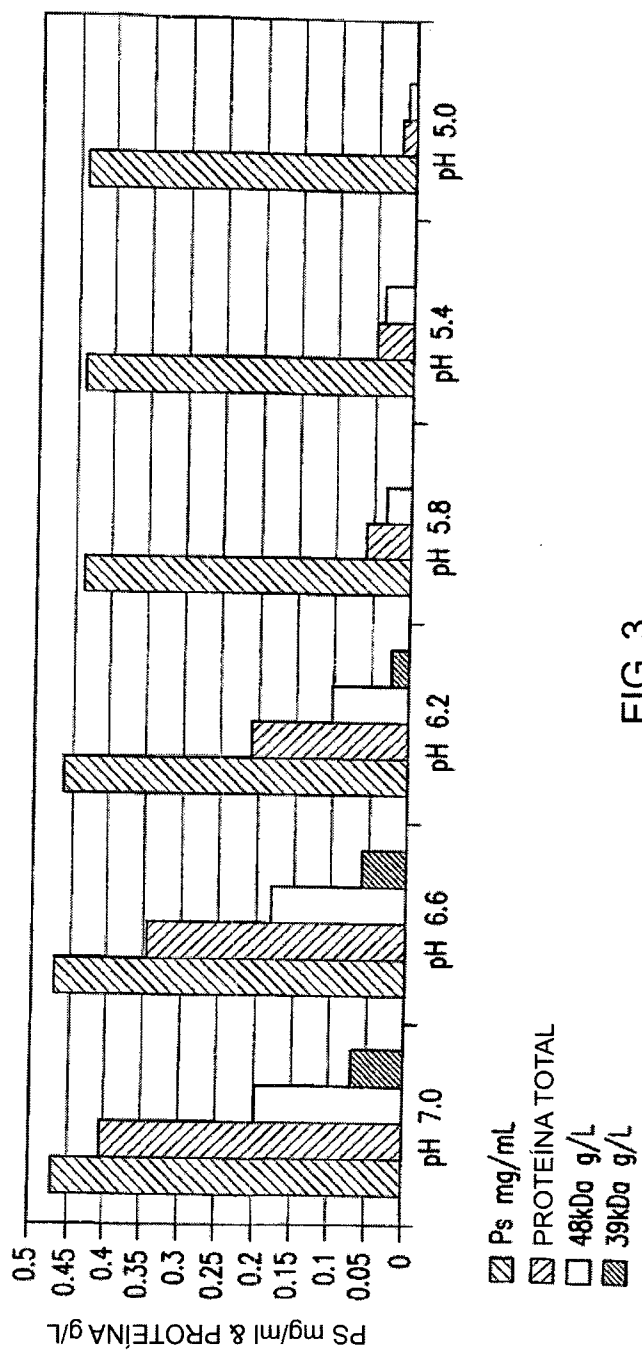


FIG. 3

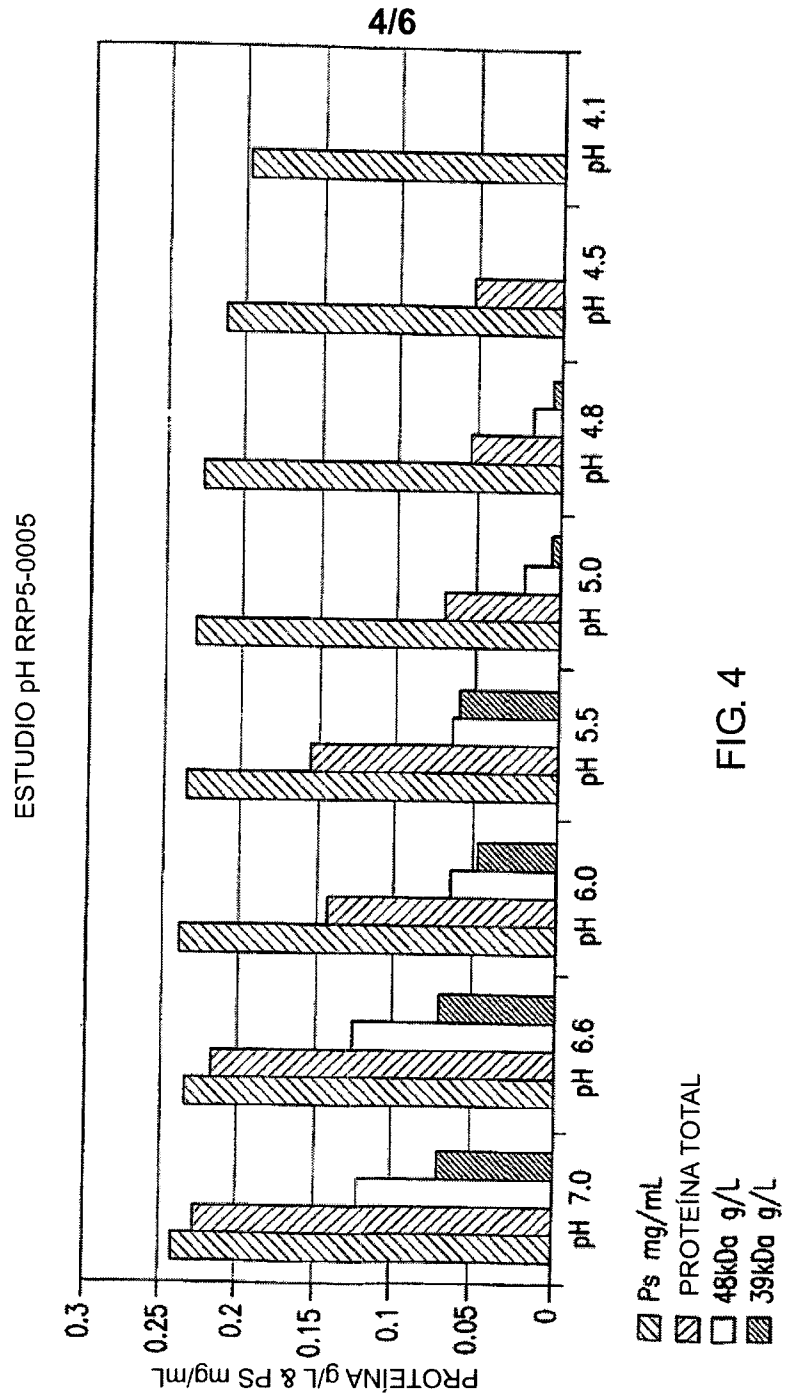


FIG. 4

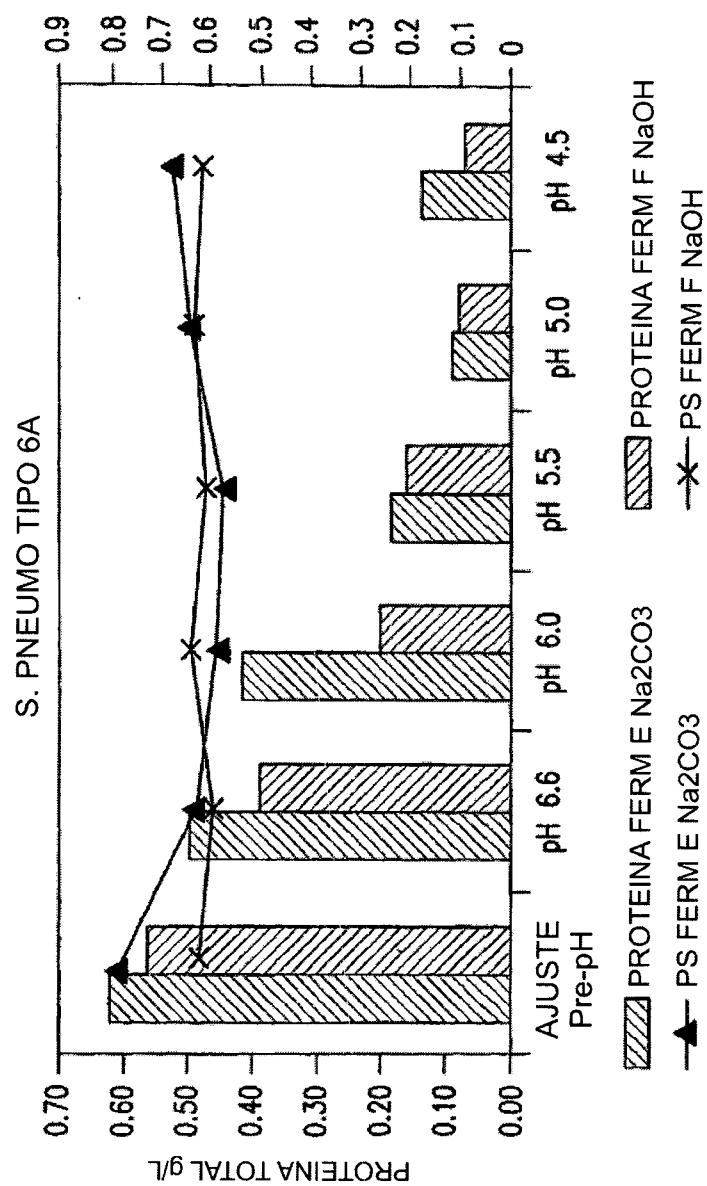
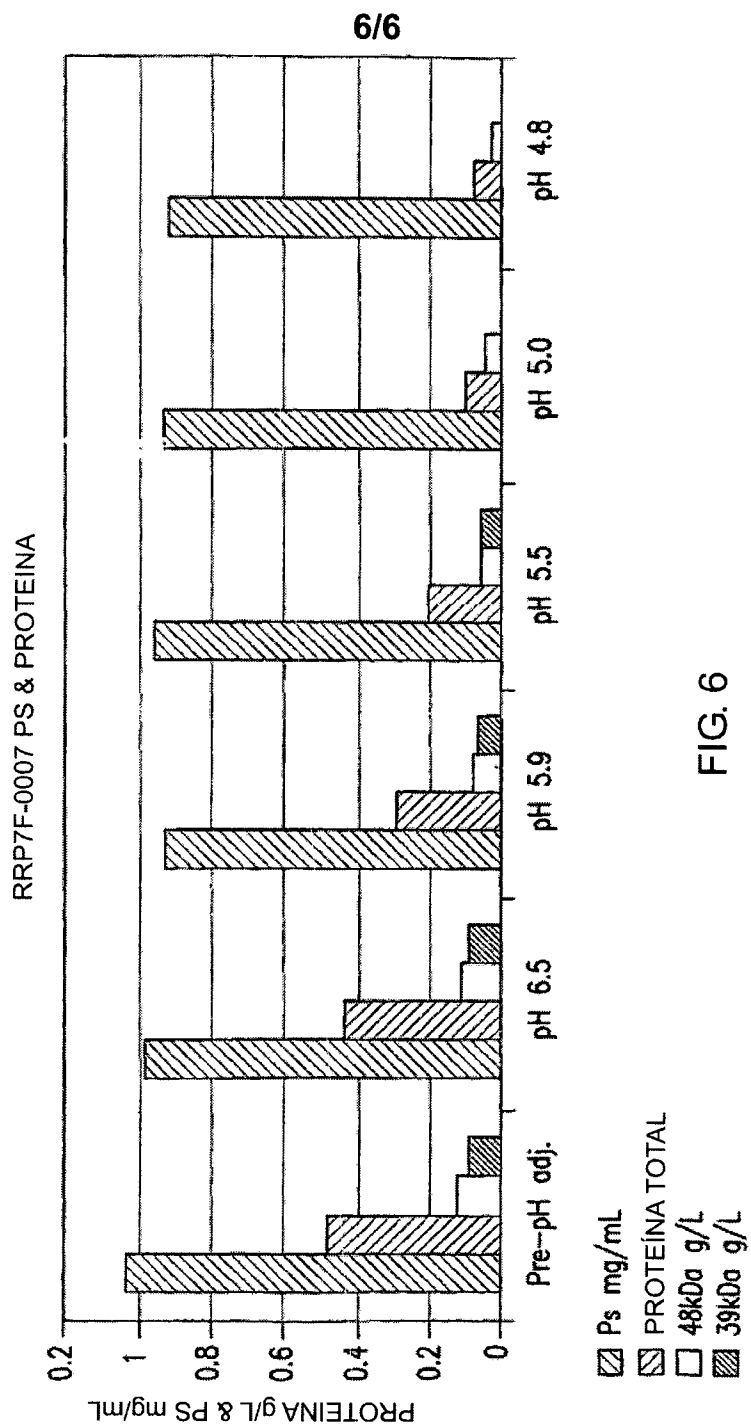


FIG. 5

000077




Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Espacio reservado para el adhesivo de radicación

FORMULARIO UNICO DE CORRECCIONES Y MODIFICACIONES

①

SOLICITUD DE



Corrección de Error Material



Modificación de una solicitud

②

SOLICITANTE

Nombre: **WYETH**

Dirección: **Five Giralda Farms, Madison, NJ**

07940, Estados Unidos

Nacionalidad o Domicilio: **Nueva Jersey, Estados U.**

Lugar de Constitución: **Delaware, Estados Unidos**

Teléfono:

Fax:

E-Mail

IDENTIFICACION

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

③

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: **ALVARO CORREA ORDOÑEZ**

Dirección: **Avenida 82 No.10-62 Piso 60.**

Teléfono: **634 1500**

Fax: **376 2211**

E-Mail: **patents.bogota@bakernet.com**

IDENTIFICACION

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número **79.143.366**

TP **20.281**

④

Numero de expediente

⑤

Descripción de la corrección o modificación solicitada

El solicitante presenta nuevo capítulo reivindicatorio con la solicitud de patente de invención

⑥

Comprobante de Pago No.

07-66609

Fecha

16-AGO -07

⑦

Anexos



Comprobante de pago de la tasa.



Poderes, si fuere el caso.



Documento que acredita la existencia y representación legal de las partes, cuando sean personas jurídicas.

⑧

NOMBRE **ALVARO CORREA ORDOÑEZ**

FIRMA

C.C. **79.143.366**

T.P. **20.281**

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

80079

00000017

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 66,609
FECHA : AGOSTO 16 DE 2007

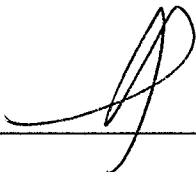
***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
RAISBECK LARA RODRIGUEZ	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	48717720	16/08/2007	73,144,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-03	CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICA	
12		MARCAS Y LEMAS COMERCIALES	99,000.00
		TOTAL :	\$ 99,000.00

SON: NOVENTA Y NUEVE MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

REIVINDICACIONES

Lo que se reivindica es:

- 5 1. Un proceso para reducir el contenido de proteína y preservar el contenido de polisacárido capsular en un caldo de cultivo del lisato celular complejo de *Streptococcus pneumoniae* antes de purificación, el proceso comprende las etapas de:
- 10 (a) Hacer crecer un serotipo de *S. pneumoniae* seleccionado en un medio basado en soya, que incluye:
- 15 (i) Inocular un primer recipiente que contiene el medio basado en soya con semillas del serotipo seleccionado, e incubar el primer recipiente hasta que se cumplan los requerimientos de crecimiento.
- 20 (ii) Inocular un segundo recipiente que contiene el medio basado en soya con el cultivo de la etapa (i) mientras mantiene una temperatura y pH estable en el segundo recipiente, y
- 25 (b) Lisar con un detergente las células bacterianas producidas en la etapa (a), produciendo por lo tanto un lisato que contiene proteínas solubles, restos celulares, ácidos nucleicos y polisacáridos;

(c) Agitar el lisato celular durante un tiempo suficiente para asegurar la lisis completa y la liberación de polisacáridos;

5

(d) Reducir el pH del lisato celular a menos de 5.5 para precipitar el detergente y la mayoría de proteínas solubles;

10

(e) Mantener la solución y el precipitado formado en la etapa (d) sin agitación durante un tiempo suficiente para permitir la sedimentación del precipitado; y

15

(f) Procesar la solución y el precipitado por centrifugación y/o filtración, con lo cual el polisacárido capsular en solución se preserva y la proteína soluble se reduce eficientemente.

20

2. Un proceso para reducir el contenido de proteína y preservar el contenido de polisacárido capsular en un caldo de cultivo de lisato celular complejo de *Streptococcus pneumoniae* antes de purificación, el proceso comprende las etapas de:

25

(a) Expandir en volúmenes incrementados de un recipiente de partida a un recipiente de producción a

gran escala en un medio basado en soya un serotipo de *S. pneumoniae* seleccionado y mantener una temperatura y pH estables durante el crecimiento celular;

5 (b) Hacer la lisis con un detergente a las células bacterianas producidas en la etapa (a), produciendo por lo tanto un lisato que contiene proteínas solubles, restos celulares, ácidos nucleicos y polisacáridos;

10

(c) Agitar el lisato celular durante un tiempo suficiente para asegurar la lisis completa y la liberación de polisacáridos;

15

(d) Reducir el pH del lisato celular a menos de 5.5 para precipitar el detergente y la mayoría de proteínas solubles;

20

(e) Mantener la solución y el precipitado formado en la etapa (d) sin agitación durante un tiempo suficiente para permitir la sedimentación del precipitado; y

25

(f) Procesar la solución y el precipitado por centrifugación y/o filtración, con lo cual el polisacárido capsular en solución se preserva y la proteína soluble se reduce eficientemente.

3. El proceso de la reivindicación 1 o 2, en donde el serotipo S, pneumoniae seleccionado es 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F o 19A.

5

4. El proceso de la reivindicación 1 o 2, en donde el pH en la etapa (a) se mantiene por una alimentación base de hidróxido de sodio, carbonato de sodio, o una combinación de estos.

10

5. Un proceso para reducir el contenido de proteína y preservar el contenido de polisacárido capsular en un caldo de cultivo de lisato celular complejo de Streptococcus pneumoniae antes de purificación, el proceso comprende las etapas de:

15

(a) Expandir en volúmenes incrementados de un recipiente de partida a un recipiente de producción a gran escala en un medio basado en soya un serotipo de S. pneumoniae seleccionado del grupo de serotipos 1, 4, 6A, 6B y 7F, y mantener una temperatura y pH estables durante el crecimiento celular, el pH se mantiene con hidróxido de sodio;

20

(b) Lisar con un detergente las células bacterianas producidas en la etapa (a), produciendo por lo tanto

25

un lisato que contiene proteínas solubles, restos celulares, ácidos nucleicos y polisacáridos;

(c) Agitar el lisato celular durante un tiempo suficiente para asegurar la lisis completa y la liberación de polisacáridos;

(d) Reducir el pH del lisato celular a menos de 5.5 para precipitar el detergente y la mayoría de proteínas solubles;

(e) Mantener la solución y el precipitado formado en la etapa (d) sin agitación durante un tiempo suficiente para permitir la sedimentación del precipitado; y

(f) Procesar la solución y el precipitado por centrifugación y/o filtración, con lo cual el polisacárido capsular en la solución se preserva y la proteína soluble se reduce eficientemente.

6. Un proceso para reducir el contenido de proteína y preservar el contenido de polisacárido capsular en un caldo de cultivo de lisato celular complejo de *Streptococcus pneumoniae* antes de purificación, el proceso comprende las etapas de:

(a) Expandir en volúmenes incrementados el serotipo 5 de *S. pneumoniae* seleccionado, de un recipiente de partida a un recipiente de producción a escala en un medio basado en soya complementado con bicarbonato de sodio, y mantener una temperatura y pH estable durante el crecimiento celular, el pH se mantiene con hidróxido de sodio;

(b) Hacer lisis con un detergente a las células bacterianas producidas en la etapa (a), produciendo por lo tanto un lisato que contiene proteínas solubles, restos celulares, ácidos nucleicos y polisacáridos;

(c) Agitar el lisato celular durante un tiempo suficiente para asegurar la lisis completa y la liberación de polisacáridos;

(d) Reducir el pH del lisato celular a menos de 5.5 para precipitar el detergente y la mayoría de proteínas solubles;

(e) Mantener la solución y el precipitado formado en la etapa (d) sin agitación durante un tiempo suficiente para permitir la sedimentación del precipitado; y

(f) Procesar la solución y el precipitado por centrifugación y/o filtración, con lo cual el polisacárido capsular en la solución se preserva y la proteína soluble se reduce eficientemente.

5

7. Un proceso para reducir el contenido de proteína y preservar el contenido de polisacárido capsular en un caldo de cultivo de lisato celular complejo de *Streptococcus pneumoniae* antes de purificación, el proceso comprende las etapas de:

10

(a) Expandir en volúmenes incrementados el serotipo 19A de *S. pneumoniae*, de un recipiente de partida a un recipiente de producción a escala en un medio basado en soya complementado con bicarbonato de sodio, y mantener una temperatura y pH estable durante el crecimiento celular, el pH se mantiene con carbonato de sodio;

15

(b) Hacer lisis con un detergente a las células bacterianas producidas en la etapa (a), produciendo por lo tanto un lisato que contiene proteínas solubles, restos celulares, ácidos nucleicos y polisacáridos;

20

25

(c) Agitar el lisato celular durante un tiempo suficiente para asegurar la lisis completa y la liberación de polisacáridos;

5 (d) Reducir el pH del lisato celular a menos de 5.5 para precipitar el detergente y la mayoría de proteínas solubles;

10 (e) Mantener la solución y el precipitado formado en la etapa (d) sin agitación durante un tiempo suficiente para permitir la sedimentación del precipitado; y

15 (f) Procesar la solución y el precipitado por centrifugación y/o filtración, con lo cual el polisacárido capsular en la solución se preserva y la proteína soluble se reduce eficientemente.

20 8. El proceso de cualquiera de la reivindicación 1, reivindicación 2, reivindicación 5, reivindicación 6 o reivindicación 7, en donde el detergente es desoxicolato de sodio.

25 9. El proceso de cualquiera de la reivindicación 1, reivindicación 2, reivindicación 5, reivindicación 6 o reivindicación 7, en donde el pH en la etapa (d) se reduce entre 4.5 y menos de 5.5.

From the INTERNATIONAL BUREAU

nnn88

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

To:

ROZEK, Carol, E.
Wyeth
Patent Law Department
Five Giralda Farms
Madison, NJ 07940
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

Date of mailing (day/month/year) 08 June 2006 (08.06.2006)	
Applicant's or agent's file reference AM101821	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US2006/012134	International filing date (day/month/year) 31 March 2006 (31.03.2006)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 08 April 2005 (08.04.2005)
Applicant WYETH et al	

1. By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. (If applicable) The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
3. (If applicable) An asterisk (*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
08 April 2005 (08.04.2005)	60/669,546	US	24 May 2006 (24.05.2006)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Pergod Claudine

Facsimile No. +41 22 338 89 65

Telephone No. +41 22 338 92 07

Facsimile No. +41 22 338 82 70

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/US2006/012134

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
TRANSMITTAL OF COPY OF INTERNATIONAL
PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY
(CHAPTER I OF THE PATENT COOPERATION
TREATY)
(PCT Rule 44bis.1(c))

To:

ERGENZINGER, Edward
ALSTON & BIRD LLP
Bank of America Plaza
101 South Tryon Street, Suite 4000
Charlotte, NC 28280-4000
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

ALSTON & BIRD
JLS RTA 10/26/07
RECEIVED

Date of mailing (day/month/year)
18 October 2007 (18.10.2007)

Applicant's or agent's file reference
AM101821(325078)

IMPORTANT NOTICE

International application No.
PCT/US2006/012134

International filing date (day/month/year)
31 March 2006 (31.03.2006)

Priority date (day/month/year)
08 April 2005 (08.04.2005)

Applicant

WYETH et al

The International Bureau transmits herewith a copy of the international preliminary report on patentability (Chapter I of the Patent Cooperation Treaty)

10-25-07

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Nora Lindner

Facsimile No. +41 22 338 82 70

e mail: pct@wipo.int

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter I of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Rule 44bis)

Applicant's or agent's file reference AM101821(325078)	FOR FURTHER ACTION		See item 4 below
International application No. PCT/US2006/012134	International filing date (day/month/year) 31 March 2006 (31.03.2006)	Priority date (day/month/year) 08 April 2005 (08.04.2005)	
International Patent Classification (8th edition unless older edition indicated) See relevant information in Form PCT/ISA/237			
Applicant WYETH			

1. This international preliminary report on patentability (Chapter I) is issued by the International Bureau on behalf of the International Searching Authority under Rule 44 bis.1(a).

2. This REPORT consists of a total of 7 sheets, including this cover sheet.

In the attached sheets, any reference to the written opinion of the International Searching Authority should be read as a reference to the international preliminary report on patentability (Chapter I) instead.

3. This report contains indications relating to the following items:

- | | |
|--|---|
| ☒ Box No. I | Basis of the report |
| ☐ Box No. II | Priority |
| ☐ Box No. III | Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability |
| ☐ Box No. IV | Lack of unity of invention |
| ☒ Box No. V | Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement |
| ☐ Box No. VI | Certain documents cited |
| ☐ Box No. VII | Certain defects in the international application |
| ☒ Box No. VIII | Certain observations on the international application |

4. The International Bureau will communicate this report to designated Offices in accordance with Rules 44bis.3(c) and 93bis.1 but not, except where the applicant makes an express request under Article 23(2), before the expiration of 30 months from the priority date (Rule 44bis.2).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. +41 22 338 82 70	Date of issuance of this report 09 October 2007 (09.10.2007)
	Authorized officer Nora Lindner e-mail: pt02.pct@wipo.int

nnng1

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

see form PCT/ISA/220

PCT

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY
(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/US2006/012134

International filing date (day/month/year)
31.03.2006

Priority date (day/month/year)
08.04.2005

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. C08B37/00 A61K39/09

Applicant
WYETH

1. This opinion contains indications relating to the following items:
- ☒ Box No. I Basis of the opinion
 - ☐ Box No. II Priority
 - ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
 - ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
 - ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
 - ☐ Box No. VI Certain documents cited
 - ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
 - ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:  European Patent Office - P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl Fax: +31 70 340 - 3018	Date of completion of this opinion see form PCT/ISA/210	Authorized Officer Mazet, Jean-François Telephone No. +31 70 340-3509
--	--	---



**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**International application No.
PCT/US2006/012134**Box No. I Basis of the opinion**

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
 - ☐ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
 - ☐ on paper
 - ☐ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing:
 - ☐ contained in the international application as filed.
 - ☐ filed together with the international application in electronic form.
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
3. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
4. Additional comments:

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2006/012134

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	1-19
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	4,9,13,16,19
	No: Claims	1-3,5-8,10-12,14,15,17,18
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	1-19
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2006/012134

Re Item V

**Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability;
citations and explanations supporting such statement**

Reference is made to the following documents :

- D1: EP-A2-0 024 493 (AMERICAN CYANAMID CO [US]) 11 March 1981 (1981-03-11)
- D2: OHNO NAHOITA ET AL: "CHARACTERIZATION OF TYPE XIX CAPSULAR POLYSACCHARIDE FROM *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* IID 559" MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY, TOKYO, JP, vol. 26, no. 6, 1982, pages 523-530, XP008073834 ISSN: 0385-5600
- D3: EP-A2-0 072 513 (SMITH KLINE RIT [BE]) 23 February 1983 (1983-02-23)
- D4: WO 82/01995 A (MERIEUX INST [FR]) 24 June 1982 (1982-06-24)
- D5: EP-A-0 002 404 (MERCK & CO INC [US]) 13 June 1979 (1979-06-13)

1. Claims 1 and 6

The document **D1** is considered as being the closest prior art for the subject-matter of **claim 1** and shows (the references in parentheses applying to this document): a process for reducing the protein content (see page 5, lines 11-15; page 6, lines 20-28; page 7, lines 1-4) and preserving the capsular polysaccharide content in a complex cellular *Streptococcus pneumoniae* lysate broth prior to purification, the process comprising the steps of growing a selected *S. pneumoniae* serotype (page 6, lines 12-13), lysing with a detergent the bacterial cells (page 6, lines 20-28), lowering the pH of the cellular lysate to 6.6 (page 13, lines 5-35), adding alcohol and adjusting the pH to 7.0; holding the solution as the precipitate forms slowly overnight (page 14, lines 2-17), and processing by centrifugation to eliminate precipitated contaminants, thus obtaining the capsular polysaccharide in solution (page 14, lines 17-24).

The subject-matter of **claim 1** differs from this known process in that after lysing the bacterial cells with a detergent, the pH is lowered to less than 5.5 to precipitate out the detergent and most of the soluble proteins.

The subject-matter of **claim 1** is therefore new (Article 33(2) PCT).

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2006/012134

The problem to be solved by the present invention may be regarded as to provide a process for reducing the residual protein content in the purified polysaccharide to a lower level (description, page 2, lines 20-29).

The solution to this problem proposed in **claim 1** of the present application is not considered as involving an inventive step (Article 33(3) PCT) for the following reasons:

The document **D2** discloses a process for isolating a cellular polysaccharide comprising the steps of growing a selected *S. pneumoniae* serotype in a medium, the pH of the culture being maintained at 7.8 by adding NaHCO₃ powder, lysing with a detergent (sodium deoxycholate) the bacterial cells produced in previous step and lowering the pH of the cellular lysate to less than 5.5 (pH 3.0) by adding acetic acid. The precipitate contains the detergent, nucleic acid and some other material (see page 523, second paragraph). No details concerning the growing steps is given.

Thus starting from **D1**, and aware of the teaching of **D2**, the skilled person seeking to solve the problem mentioned above would contemplate to lower the pH of the cellular lysate to less than 5.5 to purify the polysaccharide.

The same reasoning applies for the subject-matter of **independent claim 6**.

2. Dependent Claims 2, 3, 5, 7, 8, 10-12, 14, 15, 17, 18 do not seem to contain any features which, in combination with the features of any claim to which they refer, meet the requirements of the PCT in respect of novelty and/or inventive step (see **D1-D5** and corresponding citations in the search report).

3. The subject-matter of dependent claims 4, 9, 13, 16, 19 seems to meet the requirements of the PCT in respect of novelty and/or inventive step (lowering the pH of the cellular lysate to between 4.5 and less than 5.5).

Re Item VIII

Certain observations on the international application

Although claims 1 and 6 have been drafted as separate independent claims, they appear

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2006/012134

to relate effectively to the same subject-matter and to differ from each other only with regard to the definition of the subject-matter for which protection is sought and/or in respect of the terminology used for the features of that subject-matter. The aforementioned claims therefore lack conciseness and as such do not meet the requirements of Article 6 PCT.

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT		000097
(21) N° de solicitud:		(51) Int Cl: C08B 37/00, A61K 39/09		
22) Fecha de solicitud:		(71) Solicitante(s) WYETH		
(30) Prioridad	(31) No. 60/669,546	32) Fecha 08/04/05	(33) País US	(72) Inventor(es) BAHLER, Brian LEE, Tsu-shun Y otros
				(74) Apoderado: ALVARO CORREA ORDOÑEZ
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 08/11/07	(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT			(87) Publicación internacional
Fecha de presentación de la solicitud: 31/03/06				Fecha: 19/10/06
No. de solicitud PCT/US2006/012134				N° publicación: WO/2006/110352
(54) Título: SEPARACIÓN DE CONTAMINANTES DE POLISACÁRIDOS DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE MEDIANTE MANIPULACIÓN DE PH				

Reivindicación(es):

1. Un proceso para reducir el contenido de proteína y preservar el contenido de polisacárido capsular en un caldo de cultivo del lisato celular complejo de Streptococcus pneumoniae antes de purificación, el proceso comprende las etapas de:
- (a) Hacer crecer un serotipo de S. pneumoniae seleccionado en un medio basado en soya, que incluye:
- (i) Inocular un primer recipiente que contiene el medio basado en soya con semillas del serotipo seleccionado, e incubar el primer recipiente hasta que se cumplan los requerimientos de crecimiento.
- (ii) Inocular un segundo recipiente que contiene el medio basado en soya con el cultivo de la etapa (i) mientras mantiene una temperatura y pH estable en el segundo recipiente, y
- (b) Lisar con un detergente las células bacterianas producidas en la etapa (a), produciendo por lo tanto un lisato que contiene proteínas solubles, restos celulares, ácidos nucleicos y polisacáridos;
- (c) Agitar el lisato celular durante un tiempo suficiente para asegurar la lisis completa y la liberación de polisacáridos;
- (d) Reducir el pH del lisato celular a menos de 5.5 para precipitar el detergente y la mayoría de proteínas solubles;
- (e) Mantener la solución y el precipitado formado en la etapa (d) sin agitación durante un tiempo suficiente para permitir la sedimentación del precipitado; y
- (f) Procesar la solución y el precipitado por centrifugación y/o filtración, con lo cual el polisacárido capsular en solución se preserva y la proteína soluble se reduce eficientemente.

100



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION []

MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Descripción de la invención []
Dibujos de ser estos pertinentes []
Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

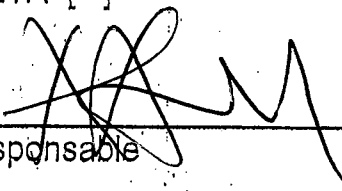
INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
Representación gráfica del esquema trazado []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []


Firma Responsable

Fecha _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-117690- -00000-0000

Fecha: 2007-11-07 16:24:15 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 99

ra 13.No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Commutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: Info@slc.gov.co
www.slc.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia