



CSA220119

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Organización y
Digitalización CSA Ltda



Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones



SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

08-83658

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO

METODO PARA LA FABRICACION DE ANTIBIOTICOS

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH

DOMICILIO

INGELHEIM AM RHEIN, ALEMANIA

74. APODERADO

EMILIO FERRERO

C.C. 438,019 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D. C.,

99



PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-083658- -00000-0000

Fecha: 2008-08-12 16:06:49 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 75

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

1		SOLICITUD DE:	
☒ Patente de Invención.		☐ Patente de Modelo de Utilidad.	
☒ Capítulo I.		☐ Capítulo II.	
2	Nombre: BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH sociedad constituida y existente bajo las leyes de Alemania. Dirección: Binger Str. 173, 55216 Ingelheim am Rhein, Alemania Domicilio: Ingelheim am Rhein, Alemania		IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número _____
3	Nombre: EMILIO FERRERO Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35 Teléfono: 347 36 11 Fax: 211 86 50 E-mail: clientes@cavelier.com Domicilio: Bogotá, Colombia.		IDENTIFICACIÓN C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número 438.019 T.P 31.929
4	INVENTOR (ES) (72) 1. Hubert MUELLNER Staufenstr. 1, 65779 Kelkheim, Alemania 3. Andreas WERNER Waldthausenstr. 63b, 55126 Mainz, Alemania 5. Kurt EYER Hengart 13, CH-3902 Glis, Suiza 7. Nicholas M., SHAW St. Jodernstrasse 24, CH-3930 Visp, Suiza 2. Martin, A. FOLGER Eisenacher Str. 18, 55218 Ingelheim am Rhein, Alemania 4. Uwe GIERLICH Gürtlerstrasse 2, 55128 Mainz, Alemania 6. Klaus HEINZMANN Unterstalden, CH-3932 Visperterminen, Suiza 8. Fabian WYER Sandstrasse 35, CH-3931 Lalden, Suiza		
5	PCT (86) Solicitud Internacional No. PCT/EP2007/051192 Fecha: 8 de febrero de 2007 Publicación Internacional No. WO 2007/093548 A1 Fecha: 23 de agosto de 2007		
6	Título (54) METODO PARA LA FABRICACION DE LANTIBIOTICOS		
7	Clasificación Internacional (51) C07K 001/030		

8 Prioridad SI☒ NO☐	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
	EP	13 de febrero de 2006	06101571.5

9

Comprobante de pago No.: 08-62,298

Fecha: 4 de agosto de 2008

10

Anexos:

☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 501.000.oo.

☐

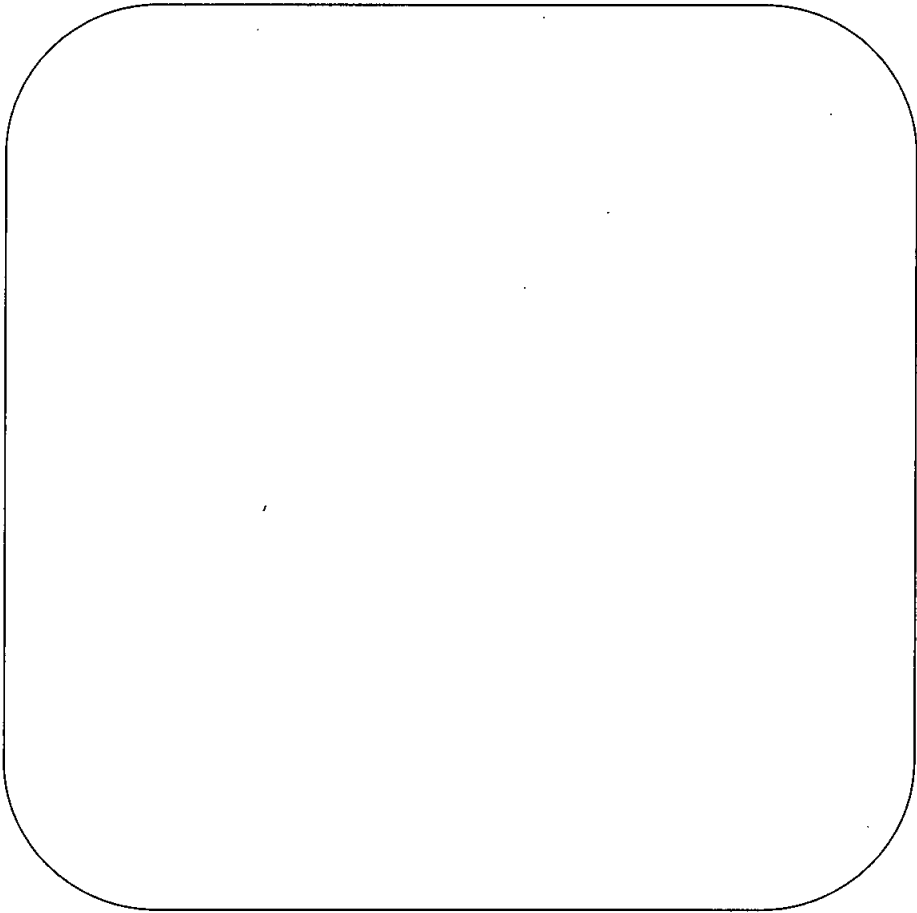
Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.

☒

Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.☒☐☐☒☒☐☐☐☐☐☐☐☒

11

FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: EMILIO FERRERO

FIRMA : 
C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

86/ SCT

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2007/093548 A1

Descripción:

Páginas 25 en el idioma original

Páginas 24 en español

Reivindicaciones: Número (s) 10

Figuras: Número (s) 2

2. ☒ **Forma PCT/ISA/210.** Informe de Búsqueda Internacional.

3. ☒ Extracto de publicación.

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA FASE
INTERNACIONAL**

Für Patente, Modelle, Muster, Warenzeichen, Dienstleistungsmarken, Handelsnamen und Embleme.

Para patentes, modelos y dibujos; marcas de fábrica y de servicios; nombres comerciales y enseñas.

REPRESENTACION Y PODER

VERTRETUNG UND VOLLMACHT

4484
0569

ICH (wir) Unterzeichnende (r) / Yo (nosotros), abajo firmado (s)
BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH

wohnhaft in / domiciliado (s) en D-55216 Ingelheim am Rhein
Federal Republic of Germany

por el presente nombramos a GERMAN CAVELIER, tpa. 832; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; EMILIO FERRERO, tpa. 31929; y LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555; domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1º del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

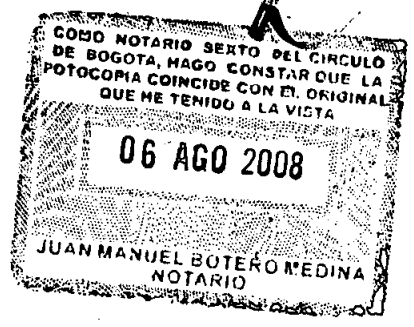
Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos;

ernenne(n) hiermit in Übereinstimmung mit Abs. 1 des Artikels 543 des Handelsgesetzbuches GERMAN CAVELIER (Rechtsanwaltsausweis Nr. 832), GONZALO PERDOMO (Rechtsanwaltsausweis Nr. 831), EMILIO FERRERO (Rechtsanwaltsausweis Nr. 31929) und LUZ CLEMENCIA DE PAEZ (Rechtsanwaltsausweis Nr. 23555), mit Geschäftssitz in Bogotá/Kolumbien, Carrera 4ª N° 72-35 zu meinen (unseren) Prozeßbevollmächtigten (Germán CAVELIER zum Hauptbevollmächtigten, die anderen - in der genannten Reihenfolge - zu seinen Stellvertretern) in allen Angelegenheiten, die das Gewerbliche Eigentum betreffen. Sie sind befugt, Zustellungen entgegenzunehmen und Prozeßbevollmächtigten und außergerichtliche Bevollmächtigte zu ernennen. Der erste Stellvertreter hat Herrn GERMAN CAVELIER bei dessen Abwesenheit oder im Falle einer vorübergehenden oder endgültigen Verhinderung zu vertreten. Dasselbe gilt, wenn der zweite Stellvertreter den ersten, oder aber der dritte den zweiten, zu vertreten hat. In diesen Fällen wird der Hauptvertreter, oder gegebenenfalls der erste oder zweite Stellvertreter, oder beide, in Form einer durch einen Notar (in Kolumbien) oder durch einen Notar oder sonstigen öffentlichen Beamten oder Konsul von Kolumbien (im Ausland) beglaubigten Erklärung seine Absicht, die Vertretung nicht auszuüben, zum Ausdruck bringen. Sollte eine Verhinderung der Grund dafür sein, ist die entsprechende Bescheinigung beizufügen. Sollte einer der Ernannten endgültig ausscheiden, nimmt der Nachfolgende seine Stelle ein. Bei Beendigung der Abwesenheit oder Verhinderung des Hauptvertreters oder seines ersten oder zweiten Stellvertreters, können GERMAN CAVELIER oder aber - je nach Fall die entsprechenden Stellvertreter, die Vertretung ohne weiteres wieder übernehmen und die jeweilige Stellvertretung gilt als aufgehoben.

Außerdem erteile ich (erteilen wir) den oben genannten Rechtsanwälten die Vollmacht, den Schutz meines (unseres) Gewerblichen Eigentums und bei Unlauterem Wettbewerb zu erlangen. Zu diesem Zweck ermächtigen wir die genannten Bevollmächtigten zur Vertretung vor sämtlichen Stellen oder Personen, gleichgültig ob diese rechtsprechende Gewalt ausüben oder nicht, vor allem vor den Verwaltungsbehörden, vor der Verwaltungsgerichtsbarkeit und Gerichten, als auch vor den Schiedsgerichten und zwar in allen Fragen, die sich auf folgende Angelegenheiten beziehen: a) Erlangung von Patenten für Erfindungen, Gebrauchsmustern, Industriezeichnungen, die Eintragung von Warenzeichen, Verbandszeichen, Defensivmarken, Dienstleistungsmarken, Werbeslogans, Handelsnamen und Emblemen, Gemüsearten und

A la vuelta →

Weiter →



acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

Herkunftsbezeichnungen, Erneuerung, Übertragung, Änderung des Namens oder des Geschäftssitzes, freiwilligen Verzicht und die Eintragung von Nutzungslizenzen für diese Rechte; b) Klagen wegen Unlauterem Wettbewerb, Verbraucherschutz, Widersprüchen und Einsprüche verwaltungsrechtlicher und gerichtlicher Löschung, Nichtigkeit, einstweiligen Verfügungen, Konzessionen, Lizenzen, der "tutela" und allgemein für zivil-, straf-, verwaltungsrechtlichen und verwaltungsgerichtliche Prozessen, die mit diesen Rechten in Verbindung stehen und die wir betreiben oder die gegen uns anhängig gemacht werden. Wir ermächtigen sie ebenfalls dazu, in allen oben genannten Angelegenheiten einen Unterbeauftragten einzusetzen, Vergleiche abzuschließen, zu schlichten, Prozeßsachverhalte anzuerkennen, zurückzutreten, zu quittieren, in Empfang zu nehmen, Verzicht zu erklären und die Rechtsgeschäfte nicht bevollmächtigter Personen zu genehmigen.

Geschehen und unterzeichnet am/Dado y firmado hoy August 2, 1996

Ingelheim am Rhein

in/en

BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH

ppa.

Unterschrift

Firma

Reinhold Fleschhut

Dr. Dieter Laudien

Managing Director

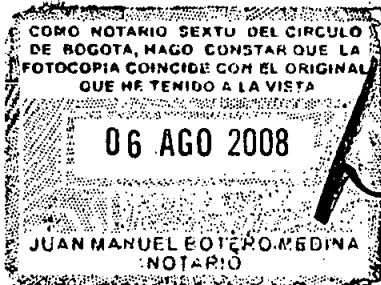
Director of Corporate Patent Department

LEGALIZACION

BEGLAUBIGUNG

Es necesaria la legalización con certificado consular sobre la existencia legal de la compañía, que éste ejerce su objeto social y que la persona que otorga el poder está autorizada para ello. A este efecto les solicitamos que muestren al Cónsul las pruebas que acreditan estos hechos.

Es wird eine Beglaubigung und eine Konsularbescheinigung darüber benötigt, daß die Gesellschaft rechtlich besteht, daß sie ihren Gesellschaftszweck erfüllt und daß die Person, die die Vollmacht erteilt, dazu rechtlich befugt ist. Zu diesem Zweck bitten wir Sie höflich, dem Konsul die entsprechenden Nachweise vorlegen zu wollen.



NOTA PARA EL SEÑOR CONSUL DE COLOMBIA: Según los artículos 65 del C. de P.C. y 480 del C. de Co., si el poderdante es una sociedad, el Señor Cónsul debe certificar que tuvo a la vista las pruebas de su existencia, que ejerce su objeto social y que quien confiere el poder es su representante.

Umseitige, vor mir gefertigte Namensunterschriften von:

1. Herrn ~~Dr.~~ Reinhold F l e s c h h u t, Dipl.-Chemiker, wohnhaft in 55218 Ingelheim, Am Mühlborn 16,
2. Herrn Dr. Dieter L a u d i e n, Dipl.-Chemiker, wohnhaft in 55127 Mainz, Carl-Orff-Straße 11,

- mir vorgestellt durch die Sekretärin Frau Ingrid May, dienstansässig bei der Firma Boehringer Ingelheim GmbH, die sich durch Vorlage ihres Führerscheines ausgewiesen hat -

beglaubige ich hiermit.

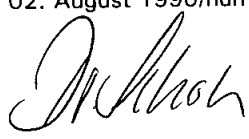
Aufgrund meiner heutigen Einsicht in das Handelsregister des Amtsgerichts Bingen bescheinige ich hiermit:

Die Firma Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH mit Sitz in Ingelheim am Rhein wurde am 12. Juni 1978 im Handelsregister unter HR B 1491 eingetragen und die Herren ~~Dr.~~ Reinhold Fleschhut und Dr. Dieter Laudien sind gemeinsam zur Vertretung der Gesellschaft berechtigt.

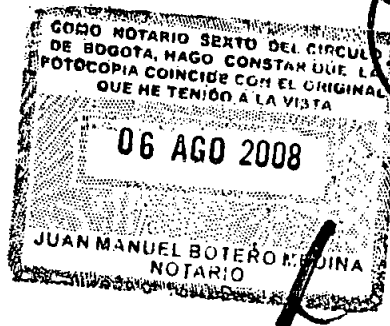
Weiter bescheinige ich, daß die Gesellschaft ihren Sitz in Ingelheim am Rhein hat.

Gegenstand des Unternehmens ist die Entwicklung, die Herstellung und der Vertrieb von veterinärmedizinischen Präparaten und anderen Produkten zur Gesunderhaltung von Tieren.

Ingelheim am Rhein, den 02. August 1996/hün



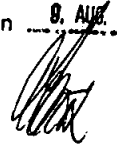
Notarassessor als amtlich bestellter Vertreter
des Notarassessors Dr. Peter Wirth als amtlich
bestelltem Notariatsverweser anstelle von
Notar Justizrat Prof. Weirich in Ingelheim



- 910 E 1 -

Kostenberechnung:
Gebühr für Legalisation
(Wert: DM *1000,-*)
JVKostO. v. 26.7.1957
BGBl. I S. 861
DM *ab-*

Mainz, den 8. AUG. 1996


Amtsinspektor



Mainz, den neunten August neunzehnhundertsechundneunzig
Der Präsident des Landgerichts


(Dr. Hanns Paul Tüttenberg)



CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA
MUNICH

Nr. 131

El sucrito Cónsul General de Colombia

CERTIFICA:

Que el señor(a) **Dr. HAS PAUL TÜTTENBERG**, quién autetica la firma del signatario en el presente documento, ejercía en la fecha allí indicada las funciones de Presidente del Tribunal Regional de Mainz.-----

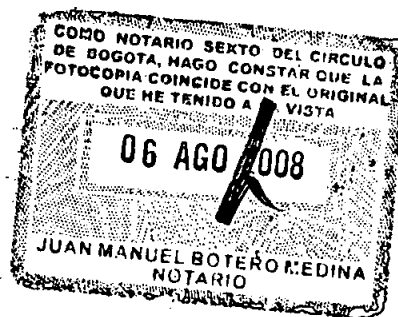
Que la firma **BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH** está registrada en el Registro Mercantil del Juzgado Municipal 653 de Bingen / Rhein, bajo el **número HR B 1491** y que está constituida y ejerce su objeto social de conformidad con las Leyes de la República de Alemania.-----

Que el señor **Dr. DIETER LAUDIN** y el Señor **REINHOLD FLESCHHUT**, quién(es) firma(n) el presente documento tiene(n) facultad legal y suficiente para representar a la mencionada firma y otorgar poderes en su nombre.-----

Que ha tenido a la vista la documentación que prueba lo anterior. -----

Munich, a 23 de agosto de 1996


RICARDO MOSQUERA MESA
Cónsul General de Colombia



Derechos para la Nación	US \$ 6.-	PAGADO
Fondo Rotatorio	US \$ 100.-	
Tasa Consular	US \$ 1,00 = DM 1.60 = DM 169.60	

BOEHNDIENGER INGENIERIA VET MEDICA
G.D.B.M.

0000 00484-801-004-5



NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD POR ERRORES

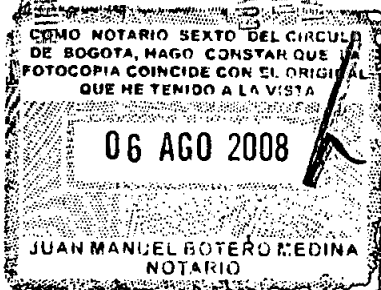
1990 SET - 1991

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

203408

Urgencia
CARTA FIRMA AFILIADO
DOCUMENTO DESLIZADO
LAS FUNCIONES INDICADAS



CURAFIRMA
DOCUMENTO
LAS FUNCIONES

MINISTERIO
RELACIONES

LEGALIZACIONES
SANTAFÉ DE BOGOTÁ

1-5 P 12-13

ASUME
ALFARO DEL TEXTO

TRADUCCION OFICIAL No. 5446

de un documento escrito en Alemán, el cual para su identificación se sella con el sello de la traductora, lo mismo que la presente.-

(A continuación de la representación y el poder conferido a GERMAN CAVELIER, tpa. 832; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; EMILIO FERRERO tpa, 31929; y LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa 23555; domiciliados en la Carrera 4 No. 72-35, Bogotá, Colombia, por la BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH, domiciliada en D-55216 Ingelheim am Rhein, RFA, a través de sus representantes los Srs. Reinhold Fleschhut y Dr. Dieter Laudien:)

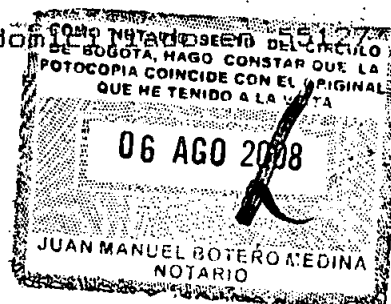
LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
TRADUCTORA INTERPRETE OFICIAL
Resolución No. 509 Ministros

Legalización

Protocolo notarial No. 1656/96 V

Certifico la autenticidad de las firmas antecedentes puestas ante mí por los señores:

1. Reinhold F l e s c h h u t, Dipl.Chem. domiciliado en 55218 Ingelheim, Am Mühlborn 16,
2. Dr. Dieter Laudien, Dipl. Chim., domiciliado en 55127 Mainz, Carl-Orff-Straße 11,



-presentados por la secretaria señora Ingrid May, con domicilio comercial en la Boehringer Ingelheim GmbH, quien a su vez se identificó con su licencia de conducción-.

Igualmente certifico, por haber examinado en la fecha el Registro de Comercio del Juzgado Municipal de Bingen:

Que la firma Boehringer Vetmedica Ingelheim GmbH, domiciliada en Ingelheim am Rhein, fue inscrita bajo el No. HR B 1491 el 12 de junio de 1978 en el Registro de Comercio del Juzgado Municipal de Bingen y que los señores Reinhold Fleschhut y Dr. Dieter Laudien, están facultados para representar conjuntamente a la sociedad. Además certifico que el domicilio de la sociedad es Ingelheim am Rhein.

El objeto social es el desarrollo, producción y venta de preparados médico-veterinarios y otros productos para la salud animal.

Ingelheim am Rhein, 2 de agosto de 1976/hün

Fdo.: firma ilegible

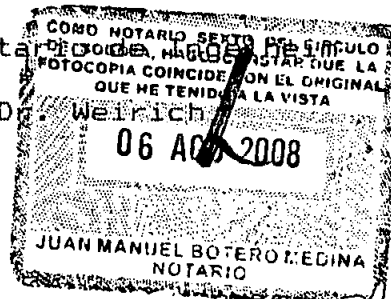
(Hilo y oblea roja en relieve:)

El notario suplente - Ingelheim

El notario suplente

del notario

Prof. Dr. Weirich



UZ ANUAGA DE...
TRADUCCIONES...
Resolución No. 509 Medellín

(dos sellos redondos en tinta del Tribunal Regional de Mainz y en
hojita adjunta)

910 E 1

Se certifica la autenticidad de la firma antecedente del Dr.
Scholl como notari suplente del Dr. Peter Wirth, notario suplente
del Prof. Dr. Weirich, notario de Ingelheim, y la del sello
oficial que la acompaña. Igualmente se certifica que el
mencionado notario estaba facultado para realizar ese acto
oficial.

Mainz, nueve de agosto de mil novecientos
noventa y seis

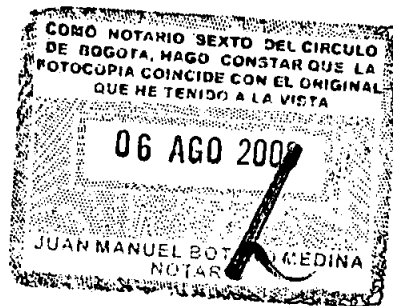
El Presidente del Tribunal Regional

(E) Fdo.: firma ilegible

(Dr. Hanns Paul Tüttenberg)

Costas

Derechos de legalización
(Valor:DM 5.000,-)
JVKostO del 26 de julio 1957
Gacetas Oficial I Pag. 861
DM 20,--
Mainz, 13 de diciembre de 1995
Fdo.: firma ilegible
Inspector



EN ESPAÑOL: La legalización de las firmas antecedentes por el Consulado de Colombia en Munich (Certificación) bajo el No. 131 del 23 de agosto de 1996, y por el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia bajo el No. 205408 del 6 de septiembre de 1996.

Pagados derechos y Fondo Rotatorio US\$ 106,--

ES TRADUCCION FIEL Y COMPLETA, de la cual se deja copia en los archivos de estas oficinas para su confrontación.

Santafé de Bogotá, 10 de septiembre de 1996.

LUZ ARRIAGA DE NEPOMUCENO

TRADUCTORA E INTERPRETE DE LENGUAJES

Resolución No. 559 Ministerio de Relaciones Exteriores

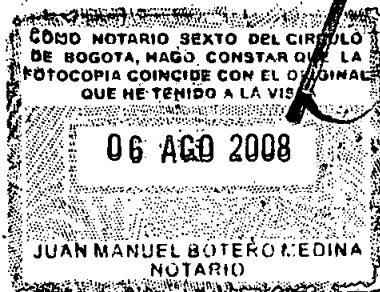
COMO NOTARIO SEXTO DE SANTAFE DE BOGOTA
HAGO CONSTAR QUE LA FIRMA DE _____

C. C. _____

COINCIDE CON LA REGISTRADA POR EL (ELLQS)
EN ESTA NOTARIA..

16 SET. 1996

SANTAFE DE BOGOTA, D.C.



La3 DEN 16D

208894

De Harzo
CUYA FIRMA APARECE EN
DOCUMENTO DESEMPLE
LAS FUNCIONES INDICA

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

1496 SET 13 14:32

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

U6 AGO 2008

MANUEL BOJERD MEDIN
NOTARIO

CONFESIONARIO SEXTO DEL CIRCULO
DE LA SEÑALA, HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA

23 ABRIL AL 300 PARTIDAS 30000
 23 ABRIL AL 300 PARTIDAS 30000
 23 ABRIL AL 300 PARTIDAS 30000

55
56
57
58
59

100

CAVELIER

ABOGADOS

TELEFAX: (57) (1) 2358850
CABLES CAVELEYES
TELEX: 45479

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4ª, No. 72-35
BOGOTÁ 8, COLOMBIA

CORREO ELECTRONICO MUNDIAL: CAVE
TELEFONO: (57) (1) 2120100

Señor Jefe de la
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
Superintendencia de Industria y Comercio
E. S. D.

Poderdante: BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH

Poder conferido el: 02-08-96

Yo, GERMAN CAVELIER, obrando en mi calidad de apoderado principal del poderdante arriba mencionado, atentamente manifiesto a Usted que sustituyo el poder que me ha sido conferido en la persona del doctor EMILIO FERRERO, Abogado con Tarjeta Profesional No. 31.929, con todas las facultades que me fueron conferidas.

Hago la anterior sustitución conforme al artículo 66 del Código de Procedimiento Civil ya que los otros sustitutos faltan en este momento.

Señor Jefe,



GERMAN CAVELIER

T.P.A. No. 832

C.C. No. 2.877.924 de Bogotá

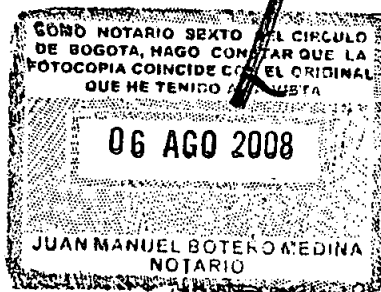
Acepto:



EMILIO FERRERO

T.P.A. No. 31.929

C.C. No. 438.019 de Usaquén



NOTARIA SEXTA DE BOGOTÁ
RECONOCIMIENTO Y PRESENTACION PERSONAL

06 SET 1988

Santafé de Bogotá D. C.

Ante Mí JUAN MANUEL BOTERO MEDINA

NOTARIO SEXTO DEL CÍRCULO DE BOGOTÁ

Compareció(eron) personalmente,

[Signature]
[Signature]

quien(es) exhibió(eron) la(s) C. C.

458019

y la(s) Libreta(s) Militar(es):

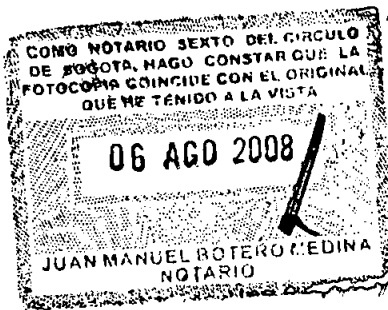
2877924

77652

7721924

diciendo que la(s) firma(s) que
a. el(los) compareciente(s) es(son) la(s) suya(s) y que
el(los) compareciente(s) es(son) la(s) suya(s) y que
En consecuencia se firma esta diligencia.

[Signature]



[Signature]



(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
23 August 2007 (23.08.2007)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2007/093548 A1

(51) International Patent Classification:
C07K 1/30 (2006.01) C07K 1/14 (2006.01)

(74) Agents: HAMMANN, Heinz et al.; BOEHRINGER INGELHEIM GMBH, CD Patents, Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim Am Rhein (DE).

(21) International Application Number:
PCT/EP2007/051192

(22) International Filing Date: 8 February 2007 (08.02.2007)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
06101571.5 13 February 2006 (13.02.2006) EP

(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, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(71) Applicant (for all designated States except US):
BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH [DE/DE]; Binger Str. 173, 55216 Ingelheim Am Rhein (DE).

(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).

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): MUELLNER, Hubert [DE/DE]; Staufenstr. 1, 65779 Kelkheim (DE). FOLGER, Martin A. [DE/DE]; Eisenacher Str. 18, 55218 Ingelheim Am Rhein (DE). WERNER, Andreas [DE/DE]; Waldthausenstr. 63b, 55126 Mainz (DE). GIERLICH, Uwe [DE/DE]; Gürtlerstrasse 2, 55128 Mainz (DE). EYER, Kurt [CH/CH]; Hengart 13, CH-3902 Glis (CH). HEINZMANN, Klaus [CH/CH]; Unterstalden, CH-3932 Visperterminen (CH). SHAW, Nicholas M. [GB/CH]; St. Jodernstrasse 24, CH-3930 Visp (CH). WYER, Fabian [CH/CH]; Sandstrasse 35, CH-3931 Lalden (CH).

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

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.

WO 2007/093548 A1

(54) Title: METHOD FOR THE MANUFACTURE OF LANTIBIOTICS

(57) Abstract: The present invention relates to the manufacture of antibiotic compounds of the class known as lantibiotics. Preferably, the present invention relates to the purification of those lantibiotics.

METHOD FOR THE MANUFACTURE OF LANTIBIOTICS

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to the manufacture of biomolecules. In particular, the present invention relates to the manufacture of antibiotic compounds of the class known as lantibiotics. Preferably, the present invention relates to the purification of those lantibiotics.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Lantibiotics are a class of small peptide antibiotics characterised by the presence of unusual, bridged thioether amino acids, namely lanthione and 3-methyllanthione. Members of this class include subtilin, nisin, epidermin, gallidermin (which is the leu-6 variant of epidermin), pep5, ancovenin, Ro 09-0198, cinnamycin and duramycin. Pep5, Epidermin and Gallierdermin are all naturally produced by microorganisms of the genus *Staphylococcus*.

Fermentation of the Gallidermin-producing strain *S. gallinarium* Tü3928 (DSM4616) is described in detail in EP-342 486, Kellner et al., Eur. J. Biochem. 177:53-59 (1988), Hörner et al., Appl. Microbiol. Biotech. 30, 219-225, and in Ungermann et al., 1st Proc. Int. Workshop Lantibiotics, Tübingen 1991, p. 410-421. Briefly, the media used for the fermentation of Gallidermin comprises at least meat extract, calcium chloride and sodium chloride. The feeding solution comprises meat extract and glucose. Thus, the media used for the fermentation of lantibiotics are very complex, and have large amounts of oligo or polypeptides as the amino acid source.

EP-508 371 A describes a purification strategy for lantibiotics based on a chromatographic procedure. The process comprises multiple chromatographic steps, that are time, material and cost consuming. Briefly, EP 508 371 provides a process for lantibiotic purification comprising obtaining a lantibiotic containing fermentation medium and subjecting said medium or lantibiotic containing media deriving therefrom to successive steps of adsorption on a styrene divinyl copolymerisate matrix, cation exchange chromatography (e.g. Amberlite XAD-1180®), hydrophobic interaction chromatography, optionally but preferably anion exchange chromatography, desalting by ultrafiltration and/or diafiltration and, optionally, lyophilisation. Extra purification steps can of course be used if desired. Yields of about 50% were achieved by the disclosed purification procedure. The fed-batch process described therein lead to volumetric yields of 840 mg/L.

US 2004/0072333 A1 describes a proteolytic purification method for lantibiotics, using nisin as an example. Careful, fine tuned protease treatment leaving nisin unaffected is used to eliminate contaminating peptides that are difficult to remove from crudely purified product.

In summary, the production processes for lantibiotics known in the art are very complex and require several purification steps. Thus there is a need for a simple and cheap production procedure for lantibiotics in the art.

SUMMARY OF THE INVENTION.

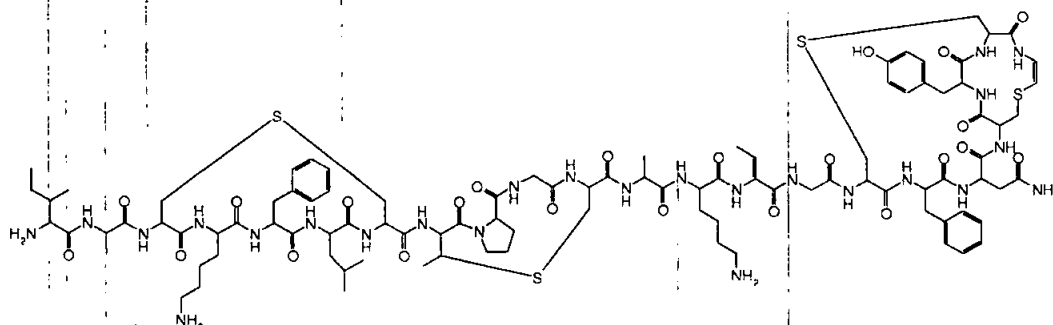
The present invention relates to a simple, time-saving production process for lantibiotics. The production process described herein, is based on a new fermentation concept, with less complex media as compared to those described in the art, and a simple one or two step purification procedure, comprising an initial precipitation step with an inorganic salt. Thus, the present invention relates to a method for the manufacture of a lantibiotic peptide, comprising a fermentation and purification step, wherein the purification step comprises the step (i) precipitation of the lantibiotic peptide from a cell culture supernatant by adding an inorganic salt. According to more preferred embodiment, the purification procedure further comprises the purification step: (ii) subjecting the peptide obtained from the precipitate of step (i) to a washing step, a single chromatographic purification step, a drying step or to crystallisation. According to a further more preferred embodiment, the fermentation is performed in a medium comprising maltose, calcium chloride, and hydrolysed yeast extract with a high amount of free amino acids and simple oligopeptides, preferably more than 50% of the proteinaceous components of said yeast extract are free amino acids. More preferably, the fermentation medium does not include any meat or peptone extract.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Before the embodiments of the present invention it must be noted that as used herein and in the appended claims, the singular forms "a", "an", and "the" include plural reference unless the context clearly dictates otherwise. Thus, for example, reference to "a lantibiotic" includes a plurality of such lantibiotics, reference to the "bacterium" is a reference to one or more bacterium/bacteria and equivalents thereof known to those skilled in the art, and so forth. Unless defined otherwise, all technical and scientific terms used herein have the same meanings as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention

belongs. Although any methods and materials similar or equivalent to those described herein can be used in the practice or testing of the present invention, the preferred methods, devices, and materials are now described. All publications mentioned herein are incorporated herein by reference for the purpose of describing and disclosing the cell lines, genetic material, and methodologies as reported in the publications which might be used in connection with the invention. Nothing herein is to be construed as an admission that the invention is not entitled to antedate such disclosure by virtue of prior invention. Moreover, all processes described herein and are not known to the public, are considered to be a process according to the invention.

The present invention related to a process for the production of lantibiotics. Lantibiotics are peptide antibiotics containing lanthionine. Typically, lantibiotics are polycyclic polypeptide antibiotics with a high content of unsaturated amino acids (dehydroalanine, dehydrobutyrine) and thioether amino acids (meso-lanthionine, (2S,3S,6R)-3-methylanthionine). Furthermore, lysinoalanine, 3-hydroxyaspartic acid and S-(2-aminovinyl)-D-cysteine have been found in some members of the lantibiotics. Exemplarily, the following lantibiotics are known in the art: nisin, subtilin, duramycin, cinnamycin, ancovenin epidermin, Ro09-0198, pep5, lactacin 481 and 3147, mersacidin, actagardin, mutacin 1140, gallidermin. A summary of these lantibiotics is found for example in Kellner et al, (*supra*) or in Current Protein and Peptide Science 2005, no. 6, pp.61-75 (Cotter et al.). The production process described herein preferably is applicable to the production of epidermin and gallidermin, more preferably to the production of gallidermin and most preferred to gallidermin comprising at least the structural motif of formula I:



It is hereby understood that the process for the manufacture of the lantibiotic, as described herein, comprises a fermentation step and a purification step. For clarity, both steps are

separately described more in detail. However, each embodiment described for the fermentation process can be combined with any embodiment described for the purification step in order to come to a final manufacture process.

The fermentation process:

The general understanding existing in the prior art for an optimized production process for lantibiotics relates to a process with a maximal amount in total of lantibiotics within the fermentation step. As a consequence, nutrient-rich and complex media, comprising meat or peptone extracts were used for the fermentation process. In contrast thereto, the present invention is based on the finding that a more controlled fermentation process of the lantibiotics, preferably of gallidermin, facilitates the purification of the lantibiotic peptides and therefore results in a more efficient and economical production process. It was surprisingly found that the fermentation process described herein allows the purification of lantibiotics from the culture supernatant with a "high degree of purity" by a simple one or two step purification strategy comprising an initial precipitation step with an inorganic salt.

"A high degree of purity" according to the present invention means, a product purity of at least 90% (w/w), preferably of at least 92%, more preferred of at least 94%, furthermore preferred of at least 96% furthermore preferred of at least 98% furthermore preferred of at least 99% with respect to the drug product.

Lantibiotics can be easily produced in gram-(+) bacteria known to the state of the art. For example, epidermin and gallidermin can be easily produced in *Staphylococcus spp.* coding for and expressing the relevant genes for epidermin and/or gallidermin production. It is described in the prior art that gallidermin, for example, can be efficiently produced in *Staphylococcus gallinarum strain Tü3928*. This strain is described in detail in EP A-342 486. It has been deposited by the Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) in Braunschweig, Germany under the accession no. 4616. Thus, any bacterial strain known in the art can be used for the production of the lantibiotics as described herein. For the production of gallidermin as described herein, use of *Staphylococcus gallinarum strain Tü3928* (DSM 4616) is most preferred.

The fermentation of the microorganisms capable of producing lantibiotics is known in the art. The microorganism can be fermented in liquid medium after inoculation with a suitable

18

inoculum under any conditions suitable for that particular microorganism, either in batch, fed-batch or continuous mode. Microorganisms of the genus *Staphylococcus* can be fermented under aerobic conditions, preferably at a temperature between 24 to 37°C and more preferably at a pH between about 5.6 and 8.5, preferably between about 6.0 and 8.0, most preferred at about pH 7.3.

Suitable basal culture media for the fermentation of lantibiotics, preferably gallidermin, contain maltose, a calcium source, and yeast extract. Preferably, those basal culture media may comprise additive(s) that prevent foam formation during the fermentation process. More preferred those media do not include any meat or peptone extract. It was surprisingly found, that meat/peptone extracts used in the art contain a high amount of proteineous components that negatively affect the production process of lantibiotics, preferably of gallidermin. Thus, according to another embodiment, the culture media provided herewith, consist of demineralised water, maltose, a calcium source, yeast extract and at least one anti-foaming agent.

As a calcium source, CaCl_2 is preferably used. More preferably, CaCl_2 is used at an amount of about 10 to 200 mg/L culture medium, even more preferred of about 10 to 100 mg/L, even more preferred of about 20 to 80 mg/L, even more preferred of about 30 to 60 mg/L, even more preferred of about 40 to 50 mg/L, most preferably at about 42 to 48 mg/L. However, it is also in the knowledge of a person skilled in the art to substitute, or at least partially substitute the amount of CaCl_2 within the basal medium by other suitable calcium sources in that Ca^{2+} is available in equivalent concentrations in the medium (about 90 μM to 1,8 mM). Moreover, it is also in the knowledge of a person skilled in the art to reduce the amount of the CaCl_2 , or any equivalent calcium source in the basal medium and to continuously or discontinuously feed it during the fermentation process.

The maltose, preferably used as maltose monohydrate, is preferably added to the basal medium in amounts of about 0.5 to 20 g/L medium (corresponds to about 1,39 to 55,5 mM of maltose monohydrate). More preferably, the amount of maltose in the basal medium is between about 1 to 5 g/L, even more preferred between about 2.5 to 7.5 g/L, most preferred about 5 g/L. However, it is also in knowledge of the person skilled in the art to substitute or at least partially substitute the maltose by any metabolic precursor of maltose that can be also consumed by the producer, or any equivalent carbon source. However, for the initial growth

phase of the fermentation process, the use of "indirect carbon sources" is preferred. Indirect carbon sources, are for example di-, oligo-, or polysaccharides, such as maltose, but not glucose. Moreover, it is also in the knowledge of a person skilled in the art to reduce the amount of maltose, any metabolic precursor or suitable equivalent in the basal medium and to continuously or discontinuously feed it during the fermentation process.

It was surprisingly found, that the origin and quality of the protein source seems to be critical for production process of lantibiotics, at least in respect to a combined fermentation and purification process, as described herein. In contrast to fermentation processes described in the prior art – all of them make use of peptone or meat extracts –, the medium used for the fermentation of lantibiotics described herein, comprises yeast extract as preferred, preferably as sole protein and amino acid source. However, addition of trace amounts does not negatively affect the production process of lantibiotics as described herein.

Preferably, the yeast extract is added to the basal medium in an amount of about 10 to 200 mg/L culture medium, even more preferred of about 10 to 100 mg/L, even more preferred of about 20 to 80 mg/L, even more preferred of about 30 to 70 mg/L, even more preferred of about 40 to 60 mg/L, most preferably at about 50 mg/L. However, it is also in the knowledge of a person skilled in the art to reduce the amount of the yeast extract in the basal medium and to continuously or discontinuously feed it during the fermentation process.

Preferably, more than about 50% in total of the amino acids of the yeast extract are free amino acids and/or di-peptides. More preferably more than about 55%, even more preferred more than about 60%, even more preferred more than about 65%, even more preferred more than about 70%, even more preferred more than about 75%, even more preferred more than about 80%, even more preferred more than about 85%, and most preferred more than about 90% in total of the amino acids of the yeast extract are free amino-acids or di-peptides.

According to another embodiment, more than about 50%, preferably more than about 55%, more preferred more than about 60%, even more preferred more than about 65%, even more preferred more than about 70%, even more preferred more than about 75%, even more preferred more than about 80%, even more preferred more than about 85%, and most preferred more than about 90% of the amino acids Asp, Glu, Asn, Gly, Ser, Thr, Ala and Arg of the yeast extract used for the fermentation of the lantibiotics, e.g. gallidermin, as described herein, are free-amino acids or exist in forms of di-peptides.

The basal media furthermore may comprise anti-foam agents that prevent or reduce foam formation during the fermentation process. Those "anti-foam agents" may be added in suitable amounts to the basal media, known to a person skilled in the art. For example, anti-foam agents are ionic or non-ionic surfactants, such as pluronic acids, polyethylene glycols, polyvinyl-pyrrolidone (PVP), polyvinyl alcohol (PVA), alcoholic EO/PO adducts such as Genapol EP, etc. Preferably, a mixture of polyethylene glycol 600 and Genapol® EP00244 (Clariant, Germany) is used.

The fermentation process is preferably performed between about 24 and 37°C, preferably between about 28 to 37°C, even more preferred between about 32 and 37°C, even more preferred between about 35 and 37°C, most preferred about 37°C.

The pH value is adjusted to about pH 5.6 to 8.0. According to more preferred mode, the pH values at start of fermentation is adjusted about pH 5.6 to 8.0, more preferably to about pH 6.5 to 7.5, even more preferred to about 6.8 to 7.5, most preferred to about 7.0 to 7.5.

The fermentation process is preferably performed in a fed-batch mode. Fed-batch processes for the fermentation of bacteria are well known in the art to a skilled person. Briefly, a bio-fermenter is filled with a basal medium and inoculated with bacteria, preferably with 2.0-20 mL ($OD_{600} = 10$) of a bacterial culture / L fermenter broth. During the fermentation process, a feed mix, comprising suitable nutrients, is discontinuously or continuously added. Thus, according to a further embodiment, the fermentation process for the production of antibiotics, as described herein, is performed in a fed-batch mode.

Preferably the feed-mix used for the fermentation process as described herein, comprises at least one energy source and further nutrients which are preferably consumed by the producer during the fermentation process. For example, the feed-mix may comprise a carbon source, preferably selected from the group sugars, sugar alcohols, amino sugars, uronic acids, amino acids, glycerine, glycerol ester. According to a further embodiment of the process as described herein, the feed mix comprises one or more monosaccharides, e.g. glucose, fructose, mannose, galactose, etc, or a mixture thereof. According to a further embodiment of the process as described herein, the feed-mix comprises a sugar, preferably a monosaccharide, and one or more amino acids, preferably selected from the group of Asp, Glu, Asn, Gly, Ser,

Thr, Ala and/or Arg. According to a further embodiment of the process as described herein, the feed-mix comprises glucose or consisting of glucose.

There are several feeding strategies known in the prior art, that can be applied to the production of lantibiotics, preferably gallidermin, in a fed-batch mode. Preferably, the feeding starts, after the pO_2 within the medium is shifted below to 80 mbar, preferably below to 60 mbar, even more preferred below to 40 mbar. Preferably the feeding rate is increased to about 3 - 10 $kg/(m^3 h)$, more preferably about 4 - 8 $kg/(m^3 h)$, even more preferably about 5 - 7 $kg/(m^3 h)$, most preferably about 6,5 $kg/(m^3 h)$. According to a further embodiment of the fermentation process described herein, the basal feeding rate may be continuously and/or stepwise increased during the fermentation. For example, the continuously increasing rate may be to about 0,01 - 0,5 $kg/(m^3 h)$, preferably to about 0,05 - 0,3 $kg/(m^3 h)$, more preferably to about 0,1 - 0,25 $kg/(m^3 h)$, even more preferably to about 0,15 $kg/(m^3 h)$.

Further, more detailed feeding-strategies for the process as described herein are disclosed in figure 1. Briefly, after the pO_2 within the medium is shifted below to 80 mbar, preferably below to 60 mbar, even more preferred below to 40 mbar, a feed mix is added with an initial rate of about 3 - 10 $kg/(m^3 h)$, more preferably of about 4 - 8 $kg/(m^3 h)$, even more preferably of about 5 - 7 $kg/(m^3 h)$, most preferably of about 6,5 $kg/(m^3 h)$. The initial feeding rate is continuously increased with an increasing rate of about 0,01 - 0,5 $kg/(m^3 h)$, preferably of about 0,05 - 0,3 $kg/(m^3 h)$, more preferably of about 0,1 - 0,25 $kg/(m^3 h)$, even more preferably of about 0,15 $kg/(m^3 h)$. Preferably, after the pO_2 is returned to about 100mbar, the feeding rate (exists at that time) is once increased for about 1 - 2 $kg/(m^3 h)$, preferably for about 1 $kg/(m^3 h)$.

Alternatively, after pO_2 within the medium is shifted below to 80 mbar, preferably below to 60 mbar, even more preferred below to 40 mbar, a feed mix is added with an initial rate of about 3 - 10 $kg/(m^3 h)$, more preferably of about 4 - 8 $kg/(m^3 h)$, even more preferably of about 5 - 7 $kg/(m^3 h)$, most preferably of about 6,5 $kg/(m^3 h)$. The initial feeding rate is increased over the fermentation process in two steps, each step for about 0.5 - 2 $kg/(m^3 h)$, preferably for about 1 $kg/(m^3 h)$.

The termination of the formation seems to be important for the overall production process as described herein. It has been surprisingly found, that when the fermentation process is

terminated before the onset of the pseudo stationary phase, a single purification process as described herein can be applied, resulting in highly purified lantibiotics, e.g., gallidermin. In other words, for the production of lantibiotics according to the process as described herein, the cell culture is grown to no longer than to the onset of stationary phase. By term "no longer than the onset of the stationary phase" a fermentation process is meant that is stopped before the pH is < 5.6 , preferably at 6.0. Alternatively, the term "no longer than the onset of the stationary phase" means a fermentation process, in that total number of viable cells within the fermenter is not increased further. Moreover, the term "no longer than the onset of the stationary phase" also means that the fermentation is stopped before the pH is < 6.0 and the total number of viable cells is not longer increased. The total number of cells can be estimated directly or by use of indirect methods, such as for example by estimation of the turbidity of the culture broth. Normally, the turbidity of a cell culture increases when the number of cells increases. "Turbidity", for example can be estimated as optical density (O.D.₆₀₀) measured at a wavelength of 600 nm, per ml culture broth and time. Thus, the term "no longer than the onset of the stationary phase" also means, that the value for $\Delta O.D._{600}$ per ml fermenter broth is dropped down to less than 0.1 for 10 min. fermentation. Preferably the value for $\Delta O.D._{600}$ per ml fermenter broth and 10 min. fermentation time is dropped down to less than 0.05, more preferably to less than 0.01. Thus, alternatively the term "no longer than the onset of the stationary phase" also means that the fermentation is stopped before the pH is < 5.6 , preferably < 6.0 and/or that the value for $\Delta O.D._{600}$ per ml fermenter broth is dropped down to less than 0.1 for 10 min. fermentation. Preferably the value for $\Delta O.D._{600}$ per ml fermenter broth and 10 min. fermentation time is dropped down to less than 0.05, more preferably to more than 0.01.

The purification process:

It was the common understanding that for increased production of the lantibiotics e.g. epidermin and gallidermin, it is important to remove those products during the fermentation process, because lantibiotics are harmful to the producer (bacterium) itself, and are subject to the activity of proteases excreted from the producing strains. As a result, dialyse or discontinuous adsorption chromatographic steps are integrated into the fermentation process (see, e.g. Ungermann et al, (*supra*)), that allow a continuous separation of the lantibiotic from the culture broth. The fermentation process as described herein does not need such a process,

even if such a separation step can be used according to a further embodiment of production process as described herein.

It has surprisingly found that lantibiotic peptides, in particular gallidermin, can be purified at high yields and purity from the culture broth (culture supernatant) by an initial salt precipitation step. The term "initial salt precipitation step" means that the culture broth is not subjected to any other purification steps prior to the salt precipitation. However, cell separation or adjustment of the pH are not considered as purification steps.

Thus, the present invention also relates to a method for the manufacture of a lantibiotic peptide, preferably gallidermin, comprising fermentation and a purification step, wherein the purification step comprises the step (i) precipitating a lantibiotic peptide from a cell culture supernatant by adding a salt, preferably an inorganic salt. It has been surprisingly found that lantibiotics show unexpected precipitation properties, when subjected to salts, preferably to inorganic salts. Preferably, those precipitation properties have been shown in combination with the fermentation process as described herein (*supra*). In other words, the efficacy of the salt precipitation step can be increased, when the lantibiotics are fermented according to a method as described herein. For example, the precipitation experiments with alkaline halogen salts or ammonium sulphate salts resulted in a product yield of about 80 to 90% in total in combination with purities of about 90 to 94% in total.

Salt precipitation procedures – or salting out processes - are well known to a person skilled in the art, and were often used in combination with further purification steps. For example salting out is described in Harris and Angal (eds.) in protein purification methods – a practical approach, Oxford University Press 1995. However, it has never been described, that a single precipitation step results in such a high product purity and yield. Suitable salts for carrying out the precipitation step as described herein are inorganic salts.

Several aspects of the salts used should be considered. The effectiveness of the salt is mainly determined by the nature of the anion, multi-charged anions being the most effective. The order of effectiveness is phosphate > sulphate > acetate > chloride > (and followed by the Hofmeister series). Although phosphate is more effective than sulphate, in practice phosphate consists of mainly HPO_4^{2-} or H_2PO_4^- at neutral pH, rather than the more effective PO_4^{3-} . Monovalent cations are most effective, with $\text{NH}_4^+ > \text{K}^+ > \text{N}^+$. The solubility is also an

important consideration, since concentrations of up to several molar are required. Thus, many potassium salts are not suitable in respect to this aspect. Because of the risk of possible denaturation, or changes in solubility, there should be little increase in heat caused by salt dissolving. The final consideration is the density of the resultant solution, since the difference between the densities of aggregates and the solution determines the ease of separation by centrifugation.

Preferably, salts of the formula: $M^n X^m$, wherein $n=+1, +2$ and $m=-1, -2, -3$ are used for the precipitation of the lantibiotics according to the process as described herein. Even more preferred are inorganic salts, characterised in that X is selected from the group comprising halogen, phosphate, phosphonate, sulphate, sulphonyl, acetate and in that M is selected from the group comprising alkaline metals, alkaline earth metals and ammonium. Even more preferred are inorganic salts, characterised in that X is selected from the group comprising halogen, or sulphate and in that M is selected from the group comprising alkaline metals, alkaline earth metals and ammonium. Even more preferred are inorganic salts, characterised in that when X is a halogen, M is selected from the group comprising alkaline metals, or alkaline earth metals, whereas alkaline metals are most preferred in combination with halogens. The preferred halogen is a chloride, and the preferred alkaline metals are sodium and potassium, whereas sodium is most preferred. As a result, use of sodium chloride and potassium chloride are most preferred, whereas sodium chloride is even more preferred as compared to potassium chloride. The preferable suitability of potassium and sodium chloride, preferably of sodium chloride, for the precipitation of lantibiotics, e.g. gallidermin, was a further unexpected finding, described herein. It has been shown by example 2, that use of sodium chloride results in higher yield and purity as compared to the stronger ammonium sulphate. However, alternatively ammonium salts, preferably ammonium sulphate, have also been shown to be suitable for the precipitation step as described herein.

Preferably, the precipitation with an inorganic salt is carried out at salt concentrations of at least 1.6 M or above. Preferably, the salt concentration used according to the process as described herein is about 1.6 to 10 M, more preferred about 1.6 to 5 M, even more preferred about 2.5 to 4 M, even more preferred to about 3 to 4 M. However, as described above, it is in knowledge of a person skilled in the art that the upper value of molarity is defined by the solubility of the salt at the used temperature. For example, sodium chloride is soluble in water up to 4.2 to 4.4 M at room temperature. Thus, the alkaline halogeno salts, e.g. sodium

chloride, are preferably used in concentration of about 2.6 M to 4.5 M, more preferred of about 3.1 M to 4.2 M, even more preferred of about 3.2 to 3.5 M, most preferred at about 3.4 M.

According to a further embodiment of the precipitation step as described herein, the fermentation broth is adjusted to a neutral and/or slightly alkaline pH prior to the precipitation. Thus, the precipitation step is preferably performed at pH of about 7 to 10, more preferably at pH of about 7.5 to 9, even more preferably at a pH of about 7.8 to 8.8, most preferred at a pH of about 8.0. Precipitation at a slightly alkaline pH, preferably within the ranges described *supra*, is most preferred in combination with use of a halogen salt, preferably the alkaline halogen salt, most preferably with sodium chloride.

According to a further embodiment of the precipitation step as described herein, the salt precipitation is carry out at room temperature (about 20 to 25°C) or less than room temperature. However, it is also in the knowledge of a person skilled in the art that the precipitation step can also preformed at temperatures slightly higher or higher than the room temperature. In general, the higher the temperature the higher the risk that the product is negatively affected. From an economic point of view, it is normally aimed to perform all the process step close to room temperature. It has surprisingly been found, that this works well with lantibiotics, preferably with gallidermin.

It has been shown for the processes described herein, that after 30 min of precipitation (under stirring), more than 80% of the product in total are salted out. The purity was about more 90% in total. Preferably the precipitation is performed for at least 30 min, preferably under stirring. Even more preferred, the precipitation is performed for at least 30 min, but stopped before the purity is decreased below about 75%, preferably below about 78%, even more preferred below about 80%, even more preferred below about 82%, even more preferred below about 84%, even more preferred below about 86%, even more preferred below about 88%, most preferred below about 90%. The product yield can be measured by standard quantitative HPLC analysis.

According to further embodiment, the precipitation is performed until at least about 70%, preferably about 75 %, even more preferably until 75%, even more preferably until 80%, even more preferably until 82%, even more preferably until 85%, even more preferably until 90%

in total of the product is salted out, but is stopped before the purity is decreased below about 75%, preferably below about 78%, even more preferred below about 80%, even more preferred below about 82%, even more preferred below about 84%, even more preferred below about 86%, even more preferred below about 88%, most preferred below about 90%.

According to a further embodiment, the precipitation step is performed for about 30 min to 2 h, preferably for about 30 min to 1 h, preferably, for about 30 min. Preferably, the precipitation mixture is initially stirred for at least 30 min, more preferably for 30 min. Thus, the present manufacture process for lantibiotics as described herein, comprises as an initial purification step a salt precipitation for about 1 h, wherein the first 30 min are conducted under stirring. Preferably, the salt is added over a 30 min period, with stirring, and then stirring is continued for 30 min.

It is herewith understood that the process described herein may comprise any variation described for each parameter, even if the specific combination of parameters is not explicitly mentioned. For example, the process for the manufacture of the lantibiotics as described herein also comprises an adjustment of the fermentation broth to pH 8.0 to 8.5 prior to the precipitation step, precipitation with 3 to 4 M of a halogen salt, preferably sodium chloride, at room temperature, for at least 30 min under stirring followed by another 30 min with stirring. The process described herein, also encompasses a process for the manufacture of the lantibiotics as described herein, wherein said process comprises an adjustment of the fermentation broth to pH 7.5 to 9.0 prior to precipitation, precipitation of the lantibiotic with about 3.4 M of a halogen salt, preferably sodium chloride, at room temperature until at least 80% of the lantibiotic is salted out, but wherein the precipitation step is stopped before the purity is decreased below 90% in total.

According to a further embodiment, the process for the manufacture of the lantibiotic as described herein, is characterized in that the purification process further comprises the purification step: subjecting the peptide obtained from the precipitation step, to a washing step, a single chromatographic purification step, a drying step or to crystallisation.

It has been found that the purification can be further increased when the first precipitate, preferably separated by centrifugation or filtration, wherein filtration is most preferred, is washed with a solution, comprising the same salt and the same salt concentration as used for

the precipitation. Optionally, the salt concentration within the wash solution can be slightly increased as compared to the precipitation solution. Preferably, the wash volume was equivalent to one tenth to half, or one tenth to three quarters of the volume of the initial product solution. After the wash step, the product containing precipitate is separated, preferably by a centrifugation or filtration step. Both, the centrifugation and filtration step are well known to a person skilled in the art. Thus, process described herein relates to a method for the manufacture of a lantibiotic peptide, comprising a fermentation and a purification step, wherein the purification step comprises the step: (i) precipitation of the lantibiotic peptide from a cell culture supernatant by adding an inorganic salt and obtaining the precipitate, (ii) washing the precipitate with a solution comprising the same salt as used for the precipitation and obtaining the precipitate. Preferably, prior to the precipitation step, cells are removed and the pH is adjusted as described *supra*.

According to a further embodiment of the process for the manufacture of lantibiotics, preferably gallidermin, as described herein, the precipitate obtained directly from the precipitation step or alternatively from the washing step with the same salt, both described *supra*, is washed in water, preferably in 1/20th of the initial volume. Preferably the wash step with water is repeated. The product containing precipitate is obtained after each wash step by centrifugation or filtration, whereas filtration is most preferred. Thus the process described herein relates to a method for the manufacture of a lantibiotic peptide, comprising a fermentation and a purification step, wherein the purification step comprises the steps: (i) precipitation of the lantibiotic peptide from a cell culture supernatant by adding an inorganic salt and obtaining the precipitate, (ii) optionally washing the precipitate with a solution comprising the same salt as used for the precipitation and obtaining the precipitate, (iii) optionally washing the precipitate of steps (i) or (ii) with water and obtaining the precipitate, (iv) optionally repeating step (iii). Preferably, prior to the precipitation step, cells are removed and the pH is adjusted as described *supra*.

According to a further embodiment of the process for the manufacture of lantibiotics, preferably gallidermin, as described herein, the precipitate obtained directly from the precipitation step or alternatively from the washing steps, all described *supra*, is dissolved in a suitable buffer, preferably in an acetic buffer, even more preferred in 1% (v/v) acetic acid. Thus, the product containing precipitate (i) of the initial precipitation step, or (ii) of the wash step with the same salt, or (iii) of the first, second or any further wash step with water, is

dissolved in a suitable buffer, preferably in an acetic buffer, even more preferred in about 1% to 2% (v/v) acetic acid, most preferably in about 1% acetic acid. According to a further preferred embodiment, that buffer also comprises 25 to 50% (v/v) of an alcohol, preferably ethanol. Thus a preferred acetic buffer comprises about 1 to 2 % acetic acid and about 15 to 50% preferably 20 to 40% (v/v), most preferably 40% (v/v) alcohol, preferably ethanol. Subsequently, the dissolved product can be titrated to a desired pH and finally filtered and frozen, or freeze-dried or crystallised. Methods for freezing, freeze drying or crystallization are well known to a person skilled in the art, and can apply to the further processing of the lantibiotics, preferably of gallidermin. Examples of these processes are described in (Scopes, R.K., Protein Purification: Principles and Practice. Springer, 1993). Thus the process described herein relates to a method for the manufacture of a lantibiotic peptide, comprising a fermentation and a purification step, wherein the purification step comprises the step: (i) precipitation of the lantibiotic peptide from a cell culture supernatant by adding an inorganic salt and obtaining the precipitate, (ii) optionally washing the precipitate with a solution comprising the same salt as used for the precipitation, and obtaining the precipitate, (iii) optionally washing the precipitate of steps (i) or (ii) with water and obtaining the precipitate, (iv) optionally repeating step (iii), (v) dissolving the precipitate of steps (ii) to (iv) in an acetic buffer, preferably in 1% acetic acid, and (vi) titrating the dissolved product to a desired pH and finally filtered and frozen, or freeze-dried or crystallised. Preferably, prior to the precipitation step, cells are removed and the pH is adjusted as described *supra*.

The purity of the product could be further improved to > 98 area % by preparative HPLC or LPLC, preferably by reverse phase chromatography. Methods for desalting and/or purification products using reverse phase chromatography are well known to a person skilled in the art, and described for example in (Scopes, R.K., Protein Purification: Principles and Practice. Springer, 1993). For example, suitable chromatography media that can be used are Amberchrom HPR10, XT20, cg300c and cg161c (Rohm and Haas, Philadelphia USA), and the like. Thus the process described herein relates to a method for the manufacture of a lantibiotic peptide, comprising a fermentation and a purification step, wherein the purification step comprises the step: (i) precipitation of the lantibiotic peptide from a cell culture supernatant by adding an inorganic salt and obtaining the precipitate, (ii) optionally washing the precipitate with a solution comprising the same salt as used for the precipitation, and obtaining the precipitate, (iii) optionally washing the precipitate of steps (i) or (ii) with water and obtaining the precipitate, (iv) optionally repeating step (iii), (v) subjecting the lantibiotic

peptide obtained from any of the proceeding steps (i) to (iv) to a single chromatographic purification step, preferably, wherein said chromatographic purification step is reverse phase chromatography. Preferably, prior to the precipitation step, cells are removed and the pH is adjusted as described *supra*.

According to a further embodiment, the precipitate obtained (i) directly from the precipitation step, (ii) from the washing step with the same salt, (iii) the first, second or any further washing step with water, as described *supra*, can be loaded on to reverse phase chromatography column, which is then washed with a solution in water, for example of 16 % (v/v) acetonitrile, preferably together with 0.1 % (v/v) trifluoroacetic acid in water, or the like. The product can then be eluted from the column with a gradient of acetonitrile, preferably from 20-40% (v/v), e.g. from 24-36% (v/v) acetonitrile in water, or the like. Preferably, the elution buffer can also include trifluoroacetic acid and the like, preferably from about 0.01 to 0.5% (v/v), even more preferably at about 0.1% (v/v). The organic solvent, is then removed from the product solution by distillation at low pressure, the product is titrated to a desired pH and finally filtered and frozen, or freeze-dried or crystallised. The collection of product from HPLC column can be adjusted to further increase the purity, however with a consequent in decrease in yield)

Alternatively, the precipitate obtained (i) directly from the precipitation step, (ii) from the washing step with the same salt, (iii) the first, second or any further washing step with water, as described *supra*, is suspended in an aqueous buffer, comprising ethanol and acetic acid. Preferably, the ethanol concentration is about 5 to 50% (v/v), even more preferred 20 to 45% (v/v), most preferred about 40% (v/v) and the acetic acid is of about 0,1 to 10% (v/v), preferably of about 0,5 to 5% (v/v), most preferred of about 1.0% (v/v). The resulting product solution was optionally filtered, whereas the filtration step is preferably used, and loaded on to a column for low pressure reverse phase chromatography, e.g. onto Amberchrom cg300c (Rohm and Haas, Philadelphia USA). Similar reverse phase chromatographic media would also be suitable, for example, Amberchrom cg161c, or the like. It is in the general knowledge of a person skilled in the art to select a suitable reverse phase chromatographic media for realizing the process as described herein. The column is then washed with a suitable buffer comprising for example acetonitrile and preferably trifluoroacetic acid in water, preferably about 16% acetonitrile and about 0.1 % trifluoroacetic acid in water. However, any other suitable aqueous buffer, containing an organic solvent and an acid substance can be used in

order to perform the reverse phase chromatography. Product elution is preferably done with a strong organic solvent, for example with about 60 to 90 % (v/v) acetonitrile in water, preferably with about 80% acetonitrile in water. The organic solvent, is then removed from the product solution by distillation at low pressure, the product is titrated to a desired pH and finally filtered and frozen, or freeze-dried or crystallised.

Trifluoroacetic acid, if used during purification process, can optionally be removed from the Trifluoroacetic acid containing material by standard procedures well known in the art. For example, Trifluoroacetic acid free material can be obtained by incubation the Trifluoroacetic acid containing material with an ion-exchange matrix, preferably an anion-exchange matrix (e.g. SAX counterion hydrogencarbonate), until most of the Trifluoroacetic acid, preferably more than 90%, even more preferably more than 95%, most preferably about than 99.9% of the Trifluoroacetic acid is bound to the ion-exchange matrix. The amount of the ion-exchange matrix that is necessary depends on the binding capacity and the total content of Trifluoroacetic acid but exceeded the maximal binding capacity by minimal 10 %. After at least 30 min of incubation, the solution is separated from the ion-exchanger. After washing the ion-exchange matrix with 1-2 tenths of the starting volume of a washing buffer of acetonitrile in water, that washing buffer preferably contains 10 – 20% acetonitrile in water, the combined solution is then distilled at low pressure to remove the acetonitrile until the solution became slightly turbid. Other well known methods to remove Trifluoroacetic acid or to exchange the Trifluoro-salt against other counterions can be used as well to produce either the free base or other salts like the hydrochloride or the acetate.

According to a further embodiment, the process described herein relates to a method for the manufacture of a lantibiotic peptide, comprising a fermentation and a purification step, wherein the purification step comprises the step: (i) precipitation of the lantibiotic peptide from a cell culture supernatant by adding an inorganic salt, and obtaining the precipitate, (ii) washing the precipitate with a solution comprising the same salt as used for the precipitation and obtaining the precipitate, (iii) subjecting the lantibiotic peptide obtained from the washing step (ii) to a single chromatographic purification step, preferably, wherein said chromatographic purification step is a reverse phase chromatography, (iv) removing the organic solvent from the product solution by distillation at low pressure, (v) titrating it to a desired pH and finally freeze-dried it. Preferably, prior to the precipitation step, cells are removed and the pH is adjusted as described *supra*.

EXAMPLES:

The following examples serve to further illustrate the present invention; but the same should not be construed as limiting the scope of the invention disclosed herein. Rather more, the following examples shall illustrate the general inventive concept of the process, as described herein.

**Example 1:
Fermentation of gallidermin**

Frozen culture (WCC):

One vial of *Staphylococcus gallinarum* (Tü 3928; DSM 4616) of frozen stock (Zellbank BO-002; Kampagne 1940122004033, Reference 35/3/18) was used to aseptically inoculate an agar plate. The agar culture was incubated at 37 °C for 1 day, followed by 1 day at 4 °C (with Parafilm – but this step is not necessary). This culture was used for inoculation of first seed. For every production a new vial must be used.

Plate culture medium:

Yeast-Extract Hy-Yest 455i	5 g/L	Kerry Bioscience
Glucose x H ₂ O	1 g/L	Cerestar or Merck
NaCl	5 g/L	Fluka or Merck
Bacto Agar	12 g/L	Bekton Dickinson
H ₂ O	Deion.	
pH	7.3	(before sterilisation)

Pre-culture or first seed (2 shake flasks; 500 ml):

One piece of cultured plate (ca. 0.5 x 0.5 cm) was transferred aseptically to two 500 ml baffled shake flasks (one baffle), containing 100 ml of sterilized seed medium. The seeded flasks are incubated on a rotary shaker (140 - 180 rpm) at 37°C for 16-18h. End product titre should be in the range of: = 100 mg/L.

Medium:

Yeast-Extract Ohly Kat	50 g/L	Deutsche Hefewerke
CaCl ₂ x H ₂ O	45 g/L	Merck
Maltose x H ₂ O	5 g/L	Merck
PEG600 / Genapol EP 0244(1:1)	0.5 ml/L	Fluka / Clariant
H ₂ O	Deion.	
pH	7.3	Before sterilisation

Second seed (or laboratory fermenter):

Second Seed Medium:

Yeast-Extract Ohly Kat	50 g/L	Deutsche Hefewerke
CaCl ₂ x H ₂ O	45 g/L	Merck
Maltose x H ₂ O	5 g/L	Merck
PEG600 / Genapol EP 0244(1:1)	0.5 ml/L	Fluka / Clariant
Feeding: Glucose Monohydrat (40%, w/w)		Cerestar
H ₂ O	Deion.	
pH	7.3	Before sterilisation

The first seed (2.0 %) is transferred aseptically to a 20 L bioreactor with the same medium as in the pre-culture (= seed medium). The seeded jar or flask or the culture in the bioreactor is incubated at 37°C for up to 24 h. After 5-6 hours a pO₂ shift occurs and at this time glucose feeding is started (feeding profile see under production fermentation). To prevent foam formation 0.05ml/L of a 1:1 mixture of Genapol EP 0244 and PEG 600 is added before sterilisation. If the fermenter is used as inoculum for the production fermenter then the culture is incubated only for 16-18 h and then transferred to the production bioreactor (reason: product titre should be < 200 mg/L when transferred)

Production fermentation:

The production fermentation was performed in a 1500L tank with working volumes of 1000 L (NB up to now 20 L fermenter scale (10 L working volume, 1.5 m³ is planned). The sterilized medium is cooled down to 37 °C, and inoculated with the second seed. The amount of

inoculum was 0.5 %. The fermentation conditions were as follows:

Medium:	the same as for seed culture
Incubation temperature:	37°C
pH:	not controlled, <i>but pH at inoculation should be fixed at 6.3</i>
preventing foaming:	0.5 mL/L of a 1:1 mixture of Genapol and PEG 600 was used
Stirrer rate:	starting at 300 rpm
Aeration rate:	0.5 vvm

Two different feeding-profiles were tested

Feeding A: After pO₂ shift (after 5-6 h), the feeding is started with a feed rate of 6.5 kg / (m³ h) with a constant slope of 0.15 kg / (m³ h) (A).

Feeding B: After 5 hours of feeding the feed-rate is increased by 1 kg / (m³ h) with the same slope as above (B):

A typical fermentation profile for the production gallidermin as described above is shown in figure 1.

Based on all findings several fermentations were performed under the same conditions (see above) to see if the process is robust and reproducible. Figure 2 shows the typical profiles of two standard fermentations resulting in a productivity of gallidermin as described herein.

Example 2: Purification of gallidermin

Starting from the culture supernatant of the fermentation process as described under Example 1, gallidermin was purified by the following procedures:

Procedure A: Precipitation with Ammonium sulfate

After fermentation the cells were removed by centrifugation and the product was precipitated from the cell-free supernatant (pH 6.7) by the addition, with gentle stirring over 30 min at room temperature, of 314 g/l ammonium sulphate, which is equivalent to 50 % saturation.

In a separate experiment precipitation with various concentrations (saturation) of ammonium sulphate were tested.

% saturation of ammonium sulphate	Yield (%)
20	9
30	31
40	69
50	76
60	74

The suspension was stirred slowly for a further 30 min and then the precipitate was collected by filtration. The precipitate was dissolved in a 40 % ethanol, 1 % acetic acid solution in water (1/4 of the starting volume). The yield of the product was 87 %, and the purity, as measured by analytical HPLC was 93.6 area %.

The purity of the product could be further improved to > 98 area % by preparative HPLC. The chromatography medium was Amberchrom HPR10 (XT20 was also tested successfully). The product was loaded on to the column, which was then washed with a solution in water of 16 % acetonitrile, 0.1 % trifluoroacetic acid. The product was eluted from the column with a gradient from 24-36% acetonitrile.

Procedure B: Precipitation with NaCl**Variant A:**

1. After fermentation, the cells were removed by centrifugation and the product was precipitated from the cell free supernatant by the addition of 200 g/L NaCl with gentle stirring over 30 min at room temperature. Precipitation was continued for 30 min.

1a). In a separate experiment the effect of precipitation time on the yield and purity of the product was tested (200 g/L NaCl, pH 6.7, room temperature):

Precipitation time (h)	Yield (%)	Purity after precipitation (area % by HPLC)
0.5	83.2	91.5
1.0	80.0	91.1
2.0	79.4	90.9
19	81.9	88.1

1b). In a further experiment, the effect of NaCl concentration on the product yield and purity was tested (precipitation time 30 min, pH 6.7, room temperature):

NaCl concentration (g/L)	Yield (%)	Purity after precipitation (area % by HPLC)
310	86.0	79.6
279	85.7	81.6
248	88.3	83.3
217	85.6	85.7
186	81.2	86.3
155	74.4	86.9

1c). In a further experiment, the effect of the pH of the product solution before precipitation on the yield and purity of the product was tested (precipitation time 30 min, 200 g/L NaCl, room temperature):

pH	Yield (%)	Purity after precipitation (area % by HPLC)
6.7 (direct from the fermenter)	59.8	92.8
7.5	75.0	94.2
8.0	83.7	93.9
8.5	90.4	92.8

2. The product precipitate was centrifuged and washed with a 200 g/L solution of NaCl. The wash volume was equivalent to half of the volume of the initial product solution.
3. The precipitate was centrifuged again and suspended in 1/20th of the initial volume of water.
4. After centrifugation, the precipitate was suspended in 1/20th of the initial volume of water and centrifuged for a second time.
5. The product precipitate was dissolved in 1 % acetic acid, and could then be titrated to a desired pH with a NaOH solution, and finally filtered and frozen.

Variant B:

1. After fermentation, the cells were removed by centrifugation and the product was precipitated from the cell free supernatant by the addition of 200 g/L NaCl with gentle stirring over 30 min at room temperature. Precipitation was continued for 30 min.
2. The product precipitate was centrifuged and washed with a 200 g/L solution of NaCl. The wash volume was equivalent to half of the volume of the initial product solution.
3. The precipitate was centrifuged again and suspended in 1/20th of the initial volume of water.
4. A solution of 20 % ethanol, 2% acetic acid in water was added to give a final volume of 1/4 of the initial volume. A larger volume is also possible.
5. The product solution was filtered and loaded on to a column of Amberchrom cg300c (low pressure reverse phase chromatography). Similar reverse phase chromatographic media would also be suitable, for example, Amberchrom cg161c. The column was washed with 16% acetonitrile, 0.1 % trifluoroacetic acid in water, and then the product was eluted with 80 % acetonitrile in water.
6. Acetonitrile was removed from the product solution by distillation at low pressure.
7. The product was freeze-dried. The overall yield was 57 %, the purity by HPLC was 95 % and the content was 68 %.

Variant C:

1. After fermentation, the cells were removed by centrifugation and the cell-free supernatant adjusted to pH 8.0 with 0.5 M NaOH. The product was precipitated from the cell-free supernatant by the addition of 200 g/L NaCl and 17 g/L Celite with gentle stirring over 30 min at room temperature. Precipitation was continued for 30 min.

2. The product precipitate was filtered and washed with three portions of a 200 g/L solution of NaCl. The total salt wash volume was equivalent to three quarters of the volume of the initial product solution.
3. The precipitate was washed with one portion of water, equivalent to 1/20th of the volume of the initial product solution.
4. The precipitate was dissolved with three portions of 40 % ethanol, 1 % acetic acid. The total volume was one quarter of the volume of the initial product solution.
5. The product solution was filtered and loaded on to a column of Amberchrom HPR10 reverse phase HPLC resin. Other reverse phase HPLC resins such as Amberchrom XT20, or Kromasil 100A-10-C18 would also be suitable. The column was then washed with a solution in water of 16 % acetonitrile, 0.1 % trifluoroacetic acid. The product was eluted from the column with a gradient from 24-36% acetonitrile in water containing 0.1 % trifluoroacetic acid.
6. Acetonitrile was removed from the product solution by distillation at low pressure.
7. The product was freeze-dried. Typically, purities of > 98 area% were obtained. The collection of product from the HPLC column can be adjusted to increase the purity (with a consequent decrease in yield).

Variant D:

1. After fermentation, the cells were removed by centrifugation and the cell-free supernatant adjusted to pH 8.0 with 0.5 M NaOH. The product was precipitated from the cell-free supernatant by the addition of 200 g/L NaCl and 17 g/L Celite with gentle stirring over 30 min at room temperature. Precipitation was continued for 30 min.
2. The product precipitate was filtered and washed with three portions of a 200 g/L solution of NaCl. The total salt wash volume was equivalent to three quarters of the volume of the initial product solution.
3. The precipitate was washed with one portion of water, equivalent to 1/20th of the volume of the initial product solution.
4. The precipitate was dissolved with three portions of 40 % ethanol, 1 % acetic acid. The total volume was one quarter of the volume of the initial product solution.
5. The product solution was filtered and loaded on to a column of Amberchrom HPR10 reverse phase HPLC resin. Other reverse phase HPLC resins such as Amberchrom XT20, or Kromasil 100A-10-C18 would also be suitable. The column was then washed with a solution in water of 16 % acetonitrile, 0.1 % trifluoroacetic acid (TFA). The product was eluted from

the column with a gradient from 24-36% acetonitrile in water containing 0.1 % trifluoroacetic acid.

6. TFA is removed by treating the fractions coming from the HPLC column directly with an ion-exchanger, preferably an anion-exchanger (e.g. SAX counterion hydrogencarbonate), once or two times until 99.9 % of the TFA was bound to the ion-exchanger. The amount necessary depends on the binding capacity (total content of TFA) but exceeded the maximal binding capacity by minimal 10 %. After 30 min of reaction time with the ion-exchanger, the complete suspension is poured into a large glass frit and the solution separated from the ion-exchanger. After a wash of the ion-exchange column IEC resin with 1-2 tenths of the starting volume of a 10-20 % acetonitrile in water (wfi like quality), the combined solution is then distilled at low pressure to remove the acetonitrile until the solution became slightly turbid. Other well known methods to remove TFA or to exchange the trifluoroacetate against other counterions can be used as well to produce either the free base or other salts like the hydrochloride or the acetate.

7. The product is freeze-dried. Typically, purities of > 98 area % were obtained. The collection of product from the HPLC column can be adjusted to increase the purity (with a consequent decrease in yield).

Claims

1. Method for the manufacture of a lantibiotic peptide, comprising a fermentation and a purification step, wherein the purification step comprises the step:
 - (i) precipitation of the lantibiotic peptide from a cell culture supernatant by adding an inorganic salt.
2. Method according to claim 1, characterized in that it further comprises the purification step:
 - (ii) subjecting the peptide obtained from the precipitate step i) to a washing step, a single chromatographic purification step, a drying step or to crystallisation.
3. Method according to claim 1 or 2, characterised in that the inorganic salt comprising the composition $M^n X^m$, wherein $n=+1,+2$ and $m=-1,-2,-3$.
4. Method according to claim 3, characterised in that X is selected from the group comprising halogen, phosphate, phosphonate, sulfate, sulfonyl, acetate and in that M is selected from the group comprising alkaline metals, alkaline earth metals and ammonium.
5. Method according to claim 4, characterised in that the salt preferably is an alkali halogen, preferably is sodium or potassium chloride.
6. Method according to claim 1, characterised in that the precipitation with an inorganic salt is carried out at salt concentrations of at least 1.6 M or above.
7. Method according to anyone of claims 1 to 6, characterised in that the cell culture supernatant resulting from the fermentation step is harvested from a bacterial batch or fed-batch cell culture having grown no longer than to the onset of stationary phase, or is from continuous bacterial cell culture.
8. Method according to any one of claims 1 to 7, characterised in that the medium used for the fermentation step is supplemented with yeast extract.

9. Method according to claim 9, characterised in that the bacterial cell culture is a *Staphylococcus* culture, preferably is a culture of *S. gallinarium*.
10. Method according to claim 1, characterised in that the lantibiotic peptide is selected from the group comprising epidermin, pep 5 or gallidermin or variants thereof comprising at least the structural motif of formula I

41

Figure 1:

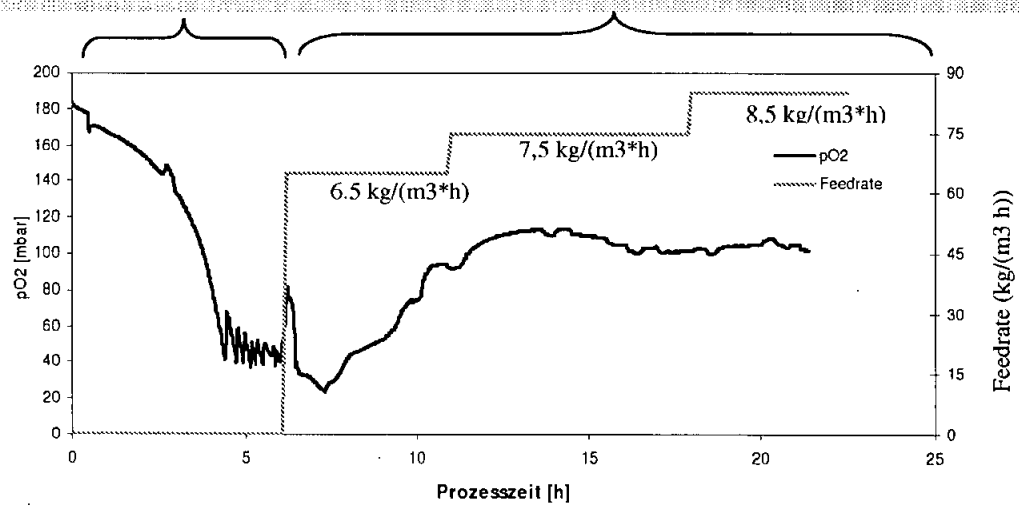
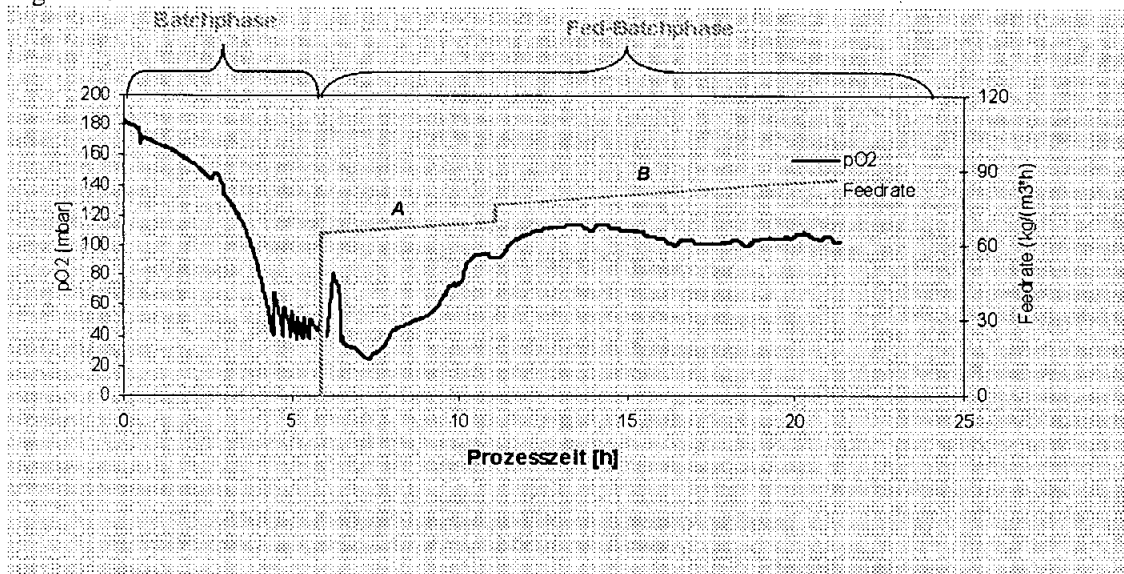
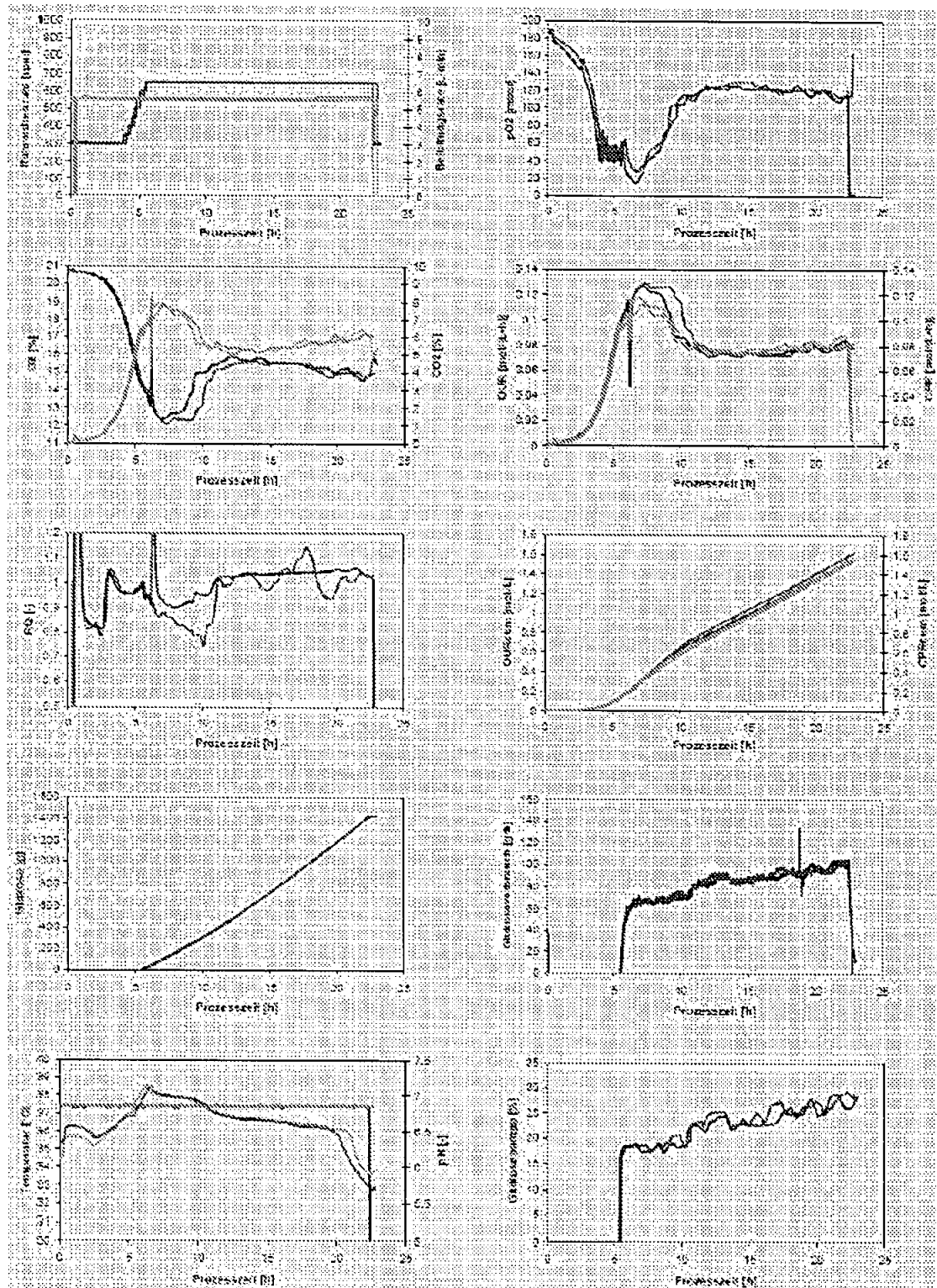


Figure 2:



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2007/051192

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K1/30 C07K1/14		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FURMANEK B ET AL: "Identification, characterization and purification of the lantibiotic staphylococcin T, a natural gallidermin variant" JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY, vol. 87, December 1999 (1999-12), - December 1999 (1999-12) pages 856-866, XP002435158 page 857, right-hand column, paragraph 1; figure 7	1-4,6-10
X	WO 03/045987 A (UNIV BRUXELLES [BE]; DE VUYST LUC [BE]; GEORGALAKI MARINA [GR]; TSAKAL) 5 June 2003 (2003-06-05) examples 2,3	1-4,6-8
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.		
☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance 'E' earlier document but published on or after the international filing date 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed 'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention 'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone 'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. '&' document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 25 May 2007		Date of mailing of the international search report 13/06/2007
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Stoyanov, Borislav

METODO PARA LA FABRICACIÓN DE LANTIBIOTICOS

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a la fabricación de biomoléculas. En particular,
5 la presente invención se refiere a la fabricación de compuestos antibióticos de la clase conocida como lantibióticos. Preferiblemente, la presente invención se refiere a la purificación de esos lantibióticos.

FUNDAMENTO DE LA INVENCION

Los lantibióticos son una clase de pequeños antibióticos peptídicos caracteri-
10 zados por la presencia de inusuales aminoácidos con puentes de tioéter, a saber lantionina y 3-metil-lantionina. Miembros de esta clase incluyen subtilina, nisina, epidermina, gallidermina (que es la variante leu-6 de la epidermina), pep5, ancovenina, Ro 09-0198, cinnamicina y duramicina. La Pep5, Epidermina y Gallidermina se producen todas naturalmente por microorganismos del género *Estafilococo*.

15 La fermentación de la cepa productora de Gallidermina, *S. gallinarium* Tü3928 (DSM4616) se describe en detalle en el documento EP-342 486, Kellner et al., Eur. J. Biochem. 177:53-59 (1988), Hörner et al., Appl. Microbiol. Biotech., 30, 219-225, y en Ungermann et al., 1ª Proc. Int. Workshop Lantibiotics, Tübingen 1991, p. 410-421. En pocas palabras, el medio usado para la fermentación de Gallidermina comprende al
20 menos extracto de carne, cloruro de calcio y cloruro sódico. La disolución de alimentación comprende extracto de carne y glucosa. Así, los medios usados para la fermentación de lantibióticos son muy complejos y tienen grandes cantidades de oligo y polipéptidos como la fuente de aminoácidos.

El documento EP-508 371 A describe una estrategia de purificación para lanti-
25 bióticos basada en un procedimiento cromatográfico. El proceso comprende múltiples etapas cromatográficas, que son consumidoras de tiempo, material y coste. En pocas palabras, el documento EP 508 371 proporciona un proceso para la purificación de lantibióticos que comprende obtener un lantibiótico que contiene un medio de fermentación y someter dicho medio o medios que contienen el lantibiótico derivándolos de
30 allí a etapas sucesivas de adsorción en una matriz de estireno-divinil-copolimerisato, cromatografía de intercambio de cationes (por ejemplo Amberlita XAD-1180®), cromatografía de interacción hidrofóbica, opcionalmente aunque preferiblemente cromatografía de intercambio de aniones, desalación por ultrafiltración y/o diafiltración y, opcionalmente, liofilización. Por supuesto pueden usarse si se desea etapas extra de purifi-
35 cación. Se alcanzaron rendimientos de aproximadamente 50% mediante el procedi-

miento de purificación descrito. El proceso de cargas de alimentación descrito en este documento llevó a rendimientos volumétricos de 840 mg/L.

El documento US 2004/0072333 A1 describe un método de purificación proteolítica para lantibióticos usando nisina como un ejemplo. El tratamiento de proteasa cuidadoso, bien afinado, que deja a la nisina sin afectar, se usa para eliminar péptidos contaminantes que son difíciles de eliminar del producto purificado en bruto.

En resumen, los procesos de producción para lantibióticos conocidos en la técnica son muy complejos y necesitan varias etapas de purificación. Así, hay una necesidad de un procedimiento de producción sencillo y barato para lantibióticos en la técnica.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un proceso de producción para lantibióticos sencillo, que ahorra tiempo. El proceso de producción descrito en este documento, se basa en un nuevo concepto de fermentación, con medios menos complejos en comparación con los descritos en la técnica, y un sencillo procedimiento de purificación de una o dos etapas, que comprende una etapa inicial de precipitación con una sal inorgánica. Así, la presente invención se refiere a un método para la fabricación de un péptido lantibiótico, que comprende una etapa de fermentación y purificación, en el que la etapa de purificación comprende la etapa (i) de precipitación del péptido de lantibiótico a partir de un sobrenadante de cultivo celular añadiendo una sal inorgánica. Según la realización más preferida, el procedimiento de purificación comprende además la etapa de purificación: (ii) sometiendo al péptido obtenido del precipitado de la etapa (i) a una etapa de lavado, una única etapa de purificación cromatográfica, una etapa de secado o a cristalización. Según una realización adicional más preferida, la fermentación se realiza en un medio que comprende maltosa, cloruro de calcio y extracto de levadura hidrolizada con una alta cantidad de aminoácidos libres y oligopéptidos sencillos, preferiblemente más del 50% de los componentes proteínicos de dicho extracto de levadura son aminoácidos libres. Más preferiblemente, el medio de fermentación no incluye ningún extracto de carne o peptona.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

Antes de las realizaciones de la presente invención, debe anotarse que como se usan en este documento y en las reivindicaciones añadidas, las formas singulares "un", "una", y "la (el)" incluyen la referencia plural a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. Así, por ejemplo, la referencia a "un lantibiótico" incluye una pluralidad de dichos lantibióticos, la referencia a la "bacteria" es una referencia a una o más

Se entiende por la presente, que el proceso para la fabricación del antibiótico, como se describe en este documento, comprende una etapa de fermentación y una etapa de purificación. Por claridad, ambas etapas se describen separadamente en más detalle. Sin embargo, cada realización descrita para el proceso de fermentación puede combinarse con cualquier realización descrita para la etapa de purificación para llegar a un proceso final de fabricación.

El proceso de fermentación:

El acuerdo general que existe en la técnica anterior para un proceso de producción optimizado para antibióticos se refiere a un proceso con una cantidad máxima en el total de antibióticos dentro de la etapa de fermentación. Como consecuencia, los medios ricos en nutrientes y complejos, que comprenden extractos de carne o peptona, se usaron para el proceso de fermentación. En contraste a esto, la presente invención se basa en el descubrimiento de que un proceso de fermentación más controlado de los antibióticos, preferiblemente de gallidermina, facilita la purificación de los péptidos de antibiótico y da por resultado, por lo tanto, en un proceso de producción más eficaz y económico. Se encontró sorprendentemente que el proceso de producción descrito en este documento permite la purificación de antibióticos a partir del sobrenadante del cultivo con un "alto grado de pureza" mediante una sencilla estrategia de purificación de una o dos etapas que comprende una etapa inicial de precipitación con una sal inorgánica.

"Un alto grado de pureza" según la presente invención significa, una pureza de producto de al menos 90% (p/p), preferiblemente de al menos 92%, más preferido de al menos 94%, aún más preferido de al menos 96%, aún más preferido de al menos 98%, aún más preferido de al menos 99%, con respecto al fármaco.

Los antibióticos pueden producirse fácilmente en bacterias gram-(+) conocidas para el estado de la técnica. Por ejemplo, la epidermina y gallidermina pueden producirse fácilmente en *Staphylococcus spp.* codificando y expresando los genes relevantes para la producción de epidermina y/o gallidermina. Se describe en la técnica anterior que la gallidermina, por ejemplo, puede producirse eficazmente en la cepa *Staphylococcus gallinarum* Tü3928. La cepa se describe en detalle en el documento EP A-342 486. Ha sido depositado por el Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) en Braunschweig, Alemania, bajo el núm. de acceso 4616. Así, cualquier cepa bacteriana conocida en la técnica puede usarse para la producción de antibióticos como se describe en este documento. Para la producción de gallidermina

como se describe en este documento, lo más preferido es el uso de la cepa *Staphylococcus gallinarum* Tü3928 (DSM 4616).

La fermentación de los microorganismos capaces de producir antibióticos es conocida en la técnica. El microorganismo puede fermentarse en medio líquido después de la inoculación con un inóculo adecuado bajo cualquier condición adecuada para ese microorganismo particular, o bien en modo de cargas, cargas de alimentación o continuo. Los microorganismos del género *Staphylococcus* pueden fermentarse en condiciones aeróbicas, preferiblemente a una temperatura entre 24 a 37°C y lo más preferiblemente a pH entre aproximadamente 5,6 y 8,5, preferiblemente entre aproximadamente 6,0 y 8,0, lo más preferido a aproximadamente pH 7,3.

Los medios de cultivo basal adecuados para la fermentación de antibióticos, preferiblemente gallidermina, contienen maltosa, una fuente de calcio y extracto de levadura. Preferiblemente, esos medios de cultivo basal pueden comprender aditivo(s) que evitan la formación de espuma durante el proceso de fermentación. Más preferido, esos medios no incluyen ningún extracto de carne o peptona. Se encontró sorprendentemente, que los extractos de carne/peptona usados en la técnica contienen una alta cantidad de componentes proteínicos que afectan negativamente al proceso de producción de antibióticos, preferiblemente gallidermina. Así, según cualquier realización, los medios de cultivo proporcionados adjuntos, consisten en agua desmineralizada, maltosa, una fuente de calcio, extracto de levadura y al menos un agente anti-espumante.

Como una fuente de calcio, se usa preferiblemente CaCl_2 . Más preferiblemente, se usa CaCl_2 en una cantidad de aproximadamente 10 a 200 mg/L de medio de cultivo, incluso más preferido de aproximadamente 10 a 100 mg/L, incluso más preferido de aproximadamente 20 a 80 mg/L, incluso más preferido de aproximadamente 30 a 60 mg/L, incluso más preferido de aproximadamente 40 a 50 mg/L, lo más preferiblemente de aproximadamente 42 a 48 mg/L. Sin embargo, también está en el conocimiento de un experto en la técnica, sustituir o al menos sustituir parcialmente, la cantidad de CaCl_2 dentro del medio basal por otras fuentes de calcio adecuadas en las que el Ca^{2+} está disponible en concentraciones equivalentes en el medio (aproximadamente 90 μM a 1,8 mM). Además, también está en el conocimiento de un experto en la técnica reducir la cantidad del CaCl_2 , o cualquier fuente equivalente de calcio en el medio basal y alimentarla continua o discontinuamente durante el proceso de fermentación.

La maltosa, preferiblemente usada como monohidrato de maltosa, se añade preferiblemente al medio basal en cantidades de aproximadamente 0,5 a 20 g/L de

medio (que corresponde a aproximadamente 1,39 a 55,5 mM de monohidrato de maltosa). Más preferiblemente, la cantidad de maltosa en el medio basal está entre aproximadamente 1 a 5 g/L, incluso más preferido entre aproximadamente 2,5 a 7,5 g/L, lo más preferido aproximadamente 5 g/L. Sin embargo, también está en el conocimiento del experto en la técnica, sustituir o al menos sustituir parcialmente la maltosa por cualquier precursor metabólico de maltosa que pueda consumirse, también por el productor, o cualquier fuente de carbono equivalente. Sin embargo, para la fase inicial de crecimiento del proceso de fermentación, se prefiere el uso de "fuentes indirectas de carbono". Fuentes indirectas de carbono son por ejemplo, di-, oligo- o polisacáridos, tales como maltosa, aunque no glucosa. Además, también está en el conocimiento de un experto en la técnica, reducir la cantidad de maltosa, cualquier precursor metabólico o equivalente adecuado en el medio basal y alimentarlo continua o discontinuamente durante el proceso de fermentación.

Se encontró sorprendentemente, que el origen y calidad de la fuente de proteínas parece ser crítica para el proceso de producción de antibióticos, al menos respecto al proceso combinado de fermentación y purificación, como se describe en este documento. En contraste a los procesos de fermentación descritos en la técnica anterior – todos hacen uso de extractos de peptona o carne –, el medio usado para la fermentación de antibióticos descrito en este documento comprende extracto de levadura como preferido, preferiblemente como única fuente de proteínas y aminoácidos. Sin embargo, la adición de cantidades traza no afecta negativamente al proceso de producción de antibióticos como se describe en este documento.

Preferiblemente, el extracto de levadura se añade al medio basal en una cantidad de aproximadamente 10 a 200 mg/L de medio de cultivo, incluso más preferido de aproximadamente 10 a 100 mg/L, incluso más preferido de aproximadamente 20 a 80 mg/L, incluso más preferido de aproximadamente 30 a 70 mg/L, incluso más preferido de aproximadamente 40 a 60 mg/L, lo más preferiblemente a aproximadamente 50 mg/L. Sin embargo, también está en el conocimiento de un experto en la técnica reducir la cantidad del extracto de levadura en el medio basal y alimentarlo continua o discontinuamente durante el proceso de fermentación.

Preferiblemente, más de aproximadamente el 50% del total de los aminoácidos del extracto de levadura son aminoácidos libres y/o di-péptidos. Más preferiblemente, más de aproximadamente el 55%, incluso más preferido más de aproximadamente el 60%, incluso más preferido más de aproximadamente el 65%, incluso más preferido más de aproximadamente el 70%, incluso más preferido más de aproximadamente el 75%, incluso más preferido más de aproximadamente el 80%, incluso más preferido

más de aproximadamente el 85%, y lo más preferido más de aproximadamente el 90% del total de los aminoácidos del extracto de levadura son aminoácidos libres o di-péptidos.

Según otra realización, más de aproximadamente el 50%, preferiblemente más de aproximadamente el 55%, más preferido más de aproximadamente el 60%, incluso más preferido más de aproximadamente el 65%, incluso más preferido más de aproximadamente el 70%, incluso más preferido más de aproximadamente el 75%, incluso más preferido más de aproximadamente el 80%, incluso más preferido más de aproximadamente el 85%, y lo más preferido más de aproximadamente el 90% de los aminoácidos Asp, Glu, Asn, Gly, Ser, Thr, Ala y Arg del extracto de levadura usado para la fermentación de los lantibióticos, por ejemplo gallidermina, como se describe en este documento, son aminoácidos libres o existen en formas de di-péptidos.

Los medios basales pueden comprender además agentes anti-espumantes para evitar o reducir la formación de espuma durante el proceso de fermentación. Esos "agentes anti-espumantes" pueden añadirse en cantidades adecuadas a los medios basales, conocidos por un experto en la técnica. Por ejemplo, los agentes anti-espumantes son tensioactivos iónicos o no iónicos, tales como ácidos plurónicos, polietilenglicoles, polivinil-pirrolidona (PVP), alcohol de polivinilo (PVA), aductos alcohólicos EO/PO tales como Genapol EP, etc. Preferiblemente, se usa una mezcla de polietilenglicol 600 y Genapol® EP00244 (Clariant, Alemania).

El proceso de fermentación se realiza preferiblemente entre aproximadamente 24 y 37°C, preferiblemente entre aproximadamente 28 a 37°C, incluso más preferido entre aproximadamente 32 y 37°C, incluso más preferido entre aproximadamente 35 y 37°C, lo más preferido aproximadamente 37°C.

El valor de pH se ajusta a aproximadamente pH 5,6 a 8,0. Según el modo más preferido, los valores de pH al principio de la fermentación se ajustan aproximadamente a pH 5,6 a 8,0, más preferiblemente a aproximadamente pH 6,5 a 7,5, incluso más preferido a aproximadamente 6,8 a 7,5, lo más preferido a aproximadamente 7,0 a 7,5.

El proceso de fermentación se realiza preferiblemente en modo de carga de alimentación. Los procesos de alimentación de carga para la fermentación de bacterias son bien conocidos en la técnica por un experto. En pocas palabras, se llena un bio-fermentador con un medio basal y se inocula con bacterias, preferiblemente con 2,0-20 mL ($OD_{600} = 10$) de un cultivo bacteriano / caldo de fermentador L. Durante el proceso de fermentación, una mezcla de alimentación, que comprende nutrientes adecuados, se añade discontinua o continuamente. Así, según una realización adicional,

el proceso de fermentación para la producción de lantibióticos, como se describe en este documento, se realiza en un modo de carga de alimentación.

Preferiblemente, la mezcla de alimentación usada para el proceso de fermentación como se describe en este documento, comprende al menos una fuente de energía y nutrientes adicionales que se consumen preferiblemente por el productor durante el proceso de fermentación. Por ejemplo, la mezcla de alimentación puede comprender una fuente de carbono, preferiblemente seleccionada del grupo de azúcares, alcoholes de azúcar, aminoazúcares, ácidos urónicos, aminoácidos, glicerina y éster de glicerol. Según una realización adicional del proceso como se describe en este documento, la mezcla de alimentación comprende uno o más monosacáridos, por ejemplo, glucosa, fructosa, mannososa, galactosa, etc., o una de sus mezclas. Según una realización adicional del proceso como se describe en este documento, la mezcla de alimentación comprende un azúcar, preferiblemente un monosacárido, y uno o más aminoácidos, preferiblemente seleccionados del grupo de Asp, Glu, Asn, Gly, Ser, Thr, Ala y/o Arg. Según una realización adicional del proceso como se describe en este documento, la mezcla de alimentación comprende glucosa o consiste en glucosa.

Hay varias estrategias de alimentación conocidas en la técnica anterior, que pueden aplicarse a la producción de lantibióticos, preferiblemente gallidermina, en un modo de carga de alimentación. Preferiblemente, la alimentación comienza, después la pO_2 dentro del medio se mueve por debajo de 80 mbar, preferiblemente por debajo de 60 mbar, incluso más preferido por debajo de 40 mbar. Preferiblemente, la velocidad de alimentación se aumenta a aproximadamente 3 - 10 $kg/(m^3 h)$, más preferiblemente aproximadamente 4 - 8 $kg/(m^3 h)$, incluso más preferiblemente aproximadamente 5 - 7 $kg/(m^3 h)$, lo más preferiblemente aproximadamente 6,5 $kg/(m^3 h)$. Según una realización adicional del proceso de fermentación descrito en este documento, la velocidad de alimentación basal puede aumentarse de forma continua y/o en pasos durante la fermentación. Por ejemplo, la velocidad aumentada continuamente puede ser de aproximadamente 0,01 - 0,5 $kg/(m^3 h)$, preferiblemente de aproximadamente 0,05 - 0,3 $kg/(m^3 h)$, más preferiblemente de aproximadamente 0,1 - 0,25 $kg/(m^3 h)$, incluso más preferiblemente de aproximadamente 0,15 $kg/(m^3 h)$.

Además, estrategias de alimentación más detalladas para el proceso como se describe en este documento, se describen en la figura 1. En pocas palabras, después de que la pO_2 dentro del medio se mueve por debajo de 80 mbar, preferiblemente por debajo de 60 mbar, incluso más preferido por debajo de 40 mbar, una mezcla de alimentación se añade con una velocidad inicial de aproximadamente 3 - 10 $kg/(m^3 h)$, más preferiblemente de aproximadamente 4 - 8 $kg/(m^3 h)$, incluso más preferiblemente

de aproximadamente 5 - 7 kg/(m³ h), lo más preferiblemente de aproximadamente 6,5 kg/(m³ h). La velocidad inicial de alimentación se aumenta continuamente con una velocidad de aumento de aproximadamente 0,01 - 0,5 kg/(m³ h), preferiblemente de aproximadamente 0,05 - 0,3 kg/(m³ h), más preferiblemente de aproximadamente 0,1 - 0,25 kg/(m³ h), incluso más preferiblemente de aproximadamente 0,15 kg/(m³ h). Preferiblemente, después de que la pO₂ se devuelve a aproximadamente 100 mbar, la velocidad de alimentación (que existe en ese momento) se aumenta una vez más para aproximadamente 1 - 2 kg/(m³ h), preferiblemente para aproximadamente 1 kg/(m³ h).

De manera alternativa, después de que la pO₂ dentro del medio se mueve por debajo de 80 mbar, preferiblemente por debajo de 60 mbar, incluso más preferido por debajo de 40 mbar, se añade una mezcla de alimentación con una velocidad inicial de aproximadamente 3 - 10 kg/(m³ h), más preferiblemente de aproximadamente 4 - 8 kg/(m³ h), incluso más preferiblemente de aproximadamente 5 - 7 kg/(m³ h), lo más preferiblemente de aproximadamente 6,5 kg/(m³ h). La velocidad inicial de alimentación se aumenta durante el proceso de fermentación en dos etapas, cada etapa para aproximadamente 0,5 - 2 kg/(m³ h), preferiblemente para aproximadamente 1 kg/(m³ h).

La terminación de la formación parece ser importante para el proceso total de producción como se describe en este documento. Se ha encontrado sorprendentemente, que cuando el proceso de fermentación se termina antes del comienzo de la fase pseudo estacionaria, puede aplicarse un único proceso de purificación como se describe en este documento, dando por resultado lantibióticos altamente purificados, por ejemplo, gallidermina. En otras palabras, para la producción de lantibióticos según el proceso como se describe en este documento, el cultivo celular no se hace crecer más allá del comienzo de la fase estacionaria. Por el término "no más allá que del comienzo de la fase estacionaria" se entiende que un proceso de fermentación se para antes de que el pH sea <5,6, preferiblemente a 6,0. De forma alternativa, el término "no más allá que del comienzo de la fase estacionaria" significa un proceso de fermentación, en que el número total de células viables dentro del fermentador no se aumenta adicionalmente. Además, el término "no más allá que del comienzo de la fase estacionaria" también significa que la fermentación se para antes de que el pH sea < 6,0 y el número total de células viables no se aumenta más. El número total de células puede estimarse directamente o mediante el uso de métodos indirectos, tal como por ejemplo por estimación de la turbidez del caldo de cultivo. Normalmente, la turbidez de un cultivo celular aumenta cuando el número de células aumenta. La "turbidez", por ejemplo, puede estimarse como densidad óptica (O.D.₆₀₀) medida a una longitud de onda de 600 nm, por ml de cultivo celular y tiempo. Así, el

600 nm, por ml de cultivo celular y tiempo. Así, el término "no más allá que del comienzo de la fase estacionaria" también significa que el valor para el $\Delta O.D_{600}$ por ml de caldo del fermentador se deja caer a menos de 0,1 para 10 min. de fermentación. Preferiblemente, el valor para el $\Delta O.D_{600}$ por ml de caldo de fermentador y 10 min. de tiempo de fermentación se deja caer a menos que 0,05, más preferiblemente a menos que 0,01. Así, alternativamente, el término "no más allá que del principio de la fase estacionaria" también significa que la fermentación se para antes de que el pH sea < 5,6, preferiblemente 6,0 y/o que el valor para el $\Delta O.D_{600}$ por ml de caldo de fermentador se deja caer a menos que 0,1 para 10 min. de fermentación. Preferiblemente el valor para el $\Delta O.D_{600}$ por ml de caldo de fermentador y 10 min. de tiempo de fermentación se deja caer a menos que 0,05, más preferiblemente a más que 0,01.

El proceso de purificación:

Fue el común acuerdo que para producción aumentada de los lantibióticos, por ejemplo, epidermina y gallidermina, es importante eliminar esos productos durante el proceso de fermentación, porque los lantibióticos son dañinos para el productor (bacteria), y se someten a la actividad de proteasas excretadas de las cepas productoras. Como resultado, las etapas cromatográficas de diálisis o adsorción discontinua se integran en el proceso de fermentación (véase, por ejemplo, Ungermann et al, (*supra*)), que permiten una separación continua del lantibiótico del caldo de cultivo. El proceso de fermentación como se describe en este documento no necesita dicho proceso, incluso si dicha etapa de separación puede usarse según una realización adicional del proceso de producción como se describe en este documento.

Se encontró sorprendentemente que los péptidos de lantibiótico, en particular gallidermina, pueden purificarse a altos rendimientos y pureza desde el caldo de cultivo (sobrenadante del cultivo) mediante una etapa inicial de precipitación de sal. El término "etapa inicial de precipitación de sal" significa que el caldo de cultivo no está sometido a ninguna otra etapa de purificación antes de la precipitación de la sal. Sin embargo, la separación celular o ajuste del pH no se consideran como etapas de purificación.

Así, la presente invención también se refiere a un método para la fabricación de un péptido de lantibiótico, preferiblemente gallidermina, que comprende fermentación y una etapa de purificación, en el que la etapa de purificación comprende la etapa (i) de precipitar un péptido de lantibiótico de un sobrenadante de cultivo celular añadiendo una sal, preferiblemente una sal inorgánica. Se ha encontrado sorprendentemente que los lantibióticos muestran propiedades de precipitación inesperadas, cuando se someten a sales, preferiblemente a sales inorgánicas. Preferiblemente, esas propiedades de

precipitación se han mostrado en combinación con el proceso de fermentación como se describe en este documento (*supra*). En otras palabras, la eficacia de la etapa de precipitación de sal puede aumentarse, cuando los lantibióticos se fermentan según un método como se describe en este documento. Por ejemplo, los experimentos de precipitación con sales alcalinas de halógeno o sales de sulfato de amonio que dan por resultado un rendimiento de producto de aproximadamente 80 a 90% del total en combinación con purezas de aproximadamente 90 a 94% del total.

Los procedimientos de precipitación de sales – o procesos de precipitación por sales – se conocen bien por un experto en la técnica, y se usaron a menudo en combinación con etapas de purificación adicionales. Por ejemplo, el precipitado por sales se describe en Harris and Angal (eds.) en métodos de purificación de proteínas – una aproximación práctica, Oxford University Press 1995. Sin embargo, no se ha descrito nunca, que una única etapa de precipitación diera por resultado una alta pureza y rendimiento de producto tal. Sales adecuadas para llevar a cabo la etapa de precipitación como se describe en este documento son sales inorgánicas.

Varios aspectos de las sales usadas deberían considerarse. La eficacia de la sal se determina principalmente por la naturaleza del anión, siendo los aniones de carga múltiple los más eficaces. El orden de eficacia es fosfato > sulfato > acetato > cloruro > (y seguido por la serie Hofmeister). Aunque el fosfato es más eficaz que el sulfato, en la práctica el fosfato consiste principalmente de HPO_4^{2-} o H_2PO_4^- a pH neutro, más que el más eficaz PO_4^{3-} . Los cationes monovalentes son los más eficaces, con $\text{NH}_4^+ > \text{K}^+ > \text{N}^+$. La solubilidad es también una consideración importante, ya que se necesitan concentraciones de hasta varias molaridades. Así, muchas sales de potasio no son adecuadas respecto a este aspecto. Por el riesgo de posible desnaturalización o cambios en la solubilidad, debería haber poco aumento en el calor provocado por la disolución de la sal. La consideración final es la densidad de la disolución resultante, ya que la diferencia entre las densidades de los agregados y la disolución determina la facilidad de la separación por centrifugado.

Preferiblemente, se usan sales de la fórmula: $\text{M}^n \text{X}^m$, en la que $n=+1, +2$ y $m=-1, -2, -3$, para la precipitación de los lantibióticos según el proceso como se describe en este documento. Son incluso más preferidas las sales inorgánicas, caracterizadas porque X se selecciona del grupo que comprende halógeno, fosfato, fosfonato, sulfato, sulfonilo, acetato y en la que M se selecciona del grupo que consiste en metales alcalinos, metales alcalinotérreos y amonio. Son incluso más preferidas las sales inorgánicas, caracterizadas porque X se selecciona del grupo que comprende halógeno o sulfato y en la que M se selecciona del grupo que comprende metales alcalinos, metales

alcalinotérreos y amonio. Incluso se prefieren más las sales inorgánicas, caracterizadas en que cuando X es un halógeno, M se selecciona del grupo que comprende metales alcalinos o metales alcalinotérreos, mientras que los metales alcalinos son más preferidos en combinación con halógenos. El halógeno preferido es un cloruro, y los metales alcalinos preferidos son sodio y potasio, mientras que el sodio es el más preferido. Como resultado, el uso de cloruro sódico y el cloruro de potasio son los más preferidos, mientras que el cloruro sódico es incluso más preferido comparado con el cloruro de potasio. La adecuación preferible del cloruro de potasio y sodio, preferiblemente de cloruro sódico, para la precipitación de lantibióticos, por ejemplo, gallidermina, fue un descubrimiento inesperado adicional, descrito en este documento. Se ha mostrado por el ejemplo 2, que el uso de cloruro sódico da por resultado más rendimiento y pureza en comparación con el sulfato de amonio más fuerte. Sin embargo, alternativamente, las sales de amonio, preferiblemente sulfato de amonio, se han visto que también son adecuadas para la etapa de precipitación como se describe en este documento.

Preferiblemente, la precipitación con una sal inorgánica se lleva a cabo a concentraciones de sal de al menos 1,6 M o superior. Preferiblemente, la concentración de sal usada según el proceso como se describe en este documento es aproximadamente 1,6 a 10 M, más preferido aproximadamente 1,6 a 5 M, incluso más preferido aproximadamente 2,5 a 4 M, incluso más preferido aproximadamente 3 a 4 M. Sin embargo, como se describe anteriormente, está en el conocimiento de un experto en la técnica que el valor superior de molaridad está definido por la solubilidad de la sal a la temperatura usada. Por ejemplo, el cloruro sódico es soluble en agua hasta 4,2 a 4,4 M a temperatura ambiente. Así, las sales alcalinas de halógeno, por ejemplo, cloruro sódico, se usan preferiblemente en concentración de aproximadamente 2,6 M a 4,5 M, más preferido de aproximadamente 3,1 M a 4,2 M, incluso más preferido de aproximadamente 3,2 a 3,5 M, lo más preferido a aproximadamente 3,4 M.

Según una realización adicional de la etapa de precipitación como se describe en este documento, el caldo de fermentación se ajusta a un pH neutro y/o ligeramente alcalino antes de la precipitación. Así, la etapa de precipitación se realiza preferiblemente a pH de aproximadamente 7 a 10, más preferiblemente a pH de aproximadamente 7,5 a 9, incluso más preferiblemente a pH de aproximadamente 7,8 a 8,8, lo más preferido a pH de aproximadamente 8,0. La precipitación a un pH ligeramente alcalino, preferiblemente dentro de los intervalos que describe *supra*, es lo más preferido en combinación con el uso de una sal de halógeno, preferiblemente la sal alcalina de halógeno, lo más preferiblemente con cloruro sódico.

Según una realización adicional de la etapa de precipitación, como se describe en este documento, la precipitación de la sal se lleva a cabo a temperatura ambiente (aproximadamente 20 a 25°C) o menos que temperatura ambiente. Sin embargo, está también en el conocimiento de un experto en la técnica que la etapa de precipitación
5 puede además realizarse a temperaturas ligeramente superiores o superiores que la temperatura ambiente. En general, cuanto mayor es la temperatura mayor es el riesgo de que el producto se afecte negativamente. Desde un punto de vista económico, se tiene la intención normalmente de realizar todos las etapas del proceso cerca de la temperatura ambiente. Se ha encontrado sorprendentemente que esto funciona bien
10 con lantibióticos, preferiblemente con gallidermina.

Se ha mostrado para los procesos descritos en este documento, que después de 30 min de precipitación (bajo agitación), más del 80% del producto del total está en forma de sal. La pureza fue aproximadamente más del 90% del total. Preferiblemente la precipitación se realiza durante al menos 30 min, preferiblemente bajo agitación.
15 Incluso más preferido, la precipitación se realiza durante al menos 30 min, aunque se para antes de que la pureza disminuya por debajo de aproximadamente 75%, preferiblemente por debajo de aproximadamente 78%, incluso más preferido por debajo de aproximadamente 80%, incluso más preferido por debajo de aproximadamente 82%, incluso más preferido por debajo de aproximadamente 84%, incluso más preferido por
20 debajo de aproximadamente 86%, incluso más preferido por debajo de aproximadamente 88%, lo más preferido por debajo de aproximadamente 90%. El rendimiento del producto puede medirse mediante análisis HPLC cuantitativo estándar.

Según una realización adicional, la precipitación se realiza hasta al menos aproximadamente 70%, preferiblemente aproximadamente 75 %, incluso más preferiblemente 75%, incluso más preferiblemente hasta 80%, incluso más preferiblemente hasta 82%, incluso más preferiblemente hasta 85%, incluso más preferiblemente hasta 90% del total del producto está en forma de sal, aunque se para antes de que la pureza disminuya por debajo de aproximadamente 75%, preferiblemente por debajo de aproximadamente 78%, incluso más preferido por debajo de aproximadamente 80%,
30 incluso más preferido por debajo de aproximadamente 82%, incluso más preferido por debajo de aproximadamente 84%, incluso más preferido por debajo de aproximadamente 86%, incluso más preferido por debajo de aproximadamente 88%, lo más preferido por debajo de aproximadamente 90%.

Según una realización adicional, la etapa de precipitación se realiza durante
35 aproximadamente 30 min a 2 h, preferiblemente durante aproximadamente 30 min a 1 h, preferiblemente durante aproximadamente 30 min. Preferiblemente, la mezcla de

precipitación se agita inicialmente durante al menos 30 min, más preferiblemente durante 30 min. Así, el presente proceso de fabricación para lantibióticos como se describe en este documento, comprende como una etapa inicial de purificación, una precipitación de sal durante aproximadamente 1 h, en la que los primeros 30 min se llevan a cabo bajo agitación. Preferiblemente, la sal se añade durante un periodo de 30 min, con agitación, y la agitación se continúa durante 30 min.

Se entiende junto con esto que el proceso descrito en este documento puede comprender cualquier variación descrita para cada parámetro, incluso si la combinación específica de parámetros no se menciona explícitamente. Por ejemplo, el proceso para la fabricación de los lantibióticos como se describe en este documento comprende además un ajuste del caldo de fermentación a pH 8,0 a 8,5 antes de la etapa de precipitación, precipitación con 3 a 4 M de una sal de halógeno, preferiblemente cloruro sódico, a temperatura ambiente, durante al menos 30 min bajo agitación seguido por otros 30 min con agitación. El proceso descrito en este documento, abarca además un proceso para la fabricación de los lantibióticos como se describe en este documento, en el que dicho proceso comprende un ajuste del caldo de fermentación a pH 7,5 a 9,0 antes de la precipitación, precipitación del lantibiótico con aproximadamente 3,4 M de una sal de halógeno, preferiblemente cloruro sódico a temperatura ambiente hasta que al menos el 80% del lantibiótico está en forma de sal, pero en el que la etapa de precipitación se para antes de que la pureza disminuya por debajo del 90% del total.

Según una realización adicional, el proceso para la fabricación del lantibiótico como se describe en este documento, se caracteriza porque el proceso de purificación comprende además la etapa de purificación: sometiendo el péptido obtenido de la etapa de precipitación, a una etapa de lavado, etapa única de purificación por cromatografía, una etapa de secado o cristalización.

Se ha encontrado que la purificación puede aumentarse adicionalmente cuando el primer precipitado, separado preferiblemente por centrifugado o filtración, en el que la filtración es la más preferida, se lava con una disolución, que comprende la misma sal y la misma concentración de sal que se usa para la precipitación. Opcionalmente, la concentración de sal dentro de la disolución de lavado puede estar aumentada ligeramente en comparación con la disolución de precipitación. Preferiblemente, el volumen de lavado era equivalente a una décima parte a la mitad, o una décima parte a tres cuartos del volumen de la disolución inicial de producto. Después de la etapa de lavado, el producto que contiene precipitado se separa, preferiblemente mediante una etapa de centrifugado o filtración. Ambas, la etapa de centrifugado y filtración, son bien

57

conocidas por un experto en la técnica. Así, el proceso descrito en este documento se refiere a un método para la fabricación de un péptido de antibiótico, que comprende una fermentación y una etapa de purificación, en la que la etapa de purificación comprende la etapa: (i) precipitación del péptido de antibiótico de un sobrenadante del cultivo celular añadiendo una sal inorgánica y obteniendo el precipitado, (ii) lavado del precipitado con una disolución que comprende la misma sal que la usada para la precipitación y obteniendo el precipitado. Preferiblemente, antes de la etapa de precipitación, las células se eliminan y el pH se ajusta como se describe en *supra*.

Según una realización adicional del proceso para la fabricación de antibióticos, preferiblemente gallidermina, como se describe en este documento, el precipitado obtenido directamente de la etapa de precipitación o alternativamente de la etapa de lavado con la misma sal, ambos descritos en *supra*, se lava en agua, preferiblemente en 1/20° del volumen inicial. Preferiblemente se repite la etapa de lavado con agua. El producto que contiene precipitado se obtiene después de cada etapa de lavado por centrifugación o filtración, mientras que la filtración es la más preferida. Así, el proceso descrito en este documento se relaciona con un método para la fabricación de un péptido de antibiótico, que comprende una fermentación y una etapa de purificación, en la que la etapa de purificación comprende las etapas: (i) precipitación del péptido de antibiótico de un sobrenadante de cultivo celular añadiendo una sal inorgánica y obteniendo el precipitado, (ii) lavando opcionalmente el precipitado con una disolución que comprende la misma sal que la usada para la precipitación y obteniendo el precipitado, (iii) lavando opcionalmente el precipitado de las etapas (i) o (ii) con agua y obteniendo el precipitado, (iv) repitiendo opcionalmente la etapa (iii). Preferiblemente, antes de la etapa de precipitación, las células se eliminan y el pH se ajusta como se describe en *supra*.

Según una realización adicional del proceso para la fabricación de antibióticos, preferiblemente gallidermina, como se describe en este documento, el precipitado obtenido directamente de la etapa de precipitación o de manera alternativa de las etapas de lavado, todas descritas en *supra*, se disuelve en un tampón adecuado, preferiblemente un tampón acético, incluso más preferido ácido acético al 1% (v/v). Así, el producto que contiene precipitado (i) de la etapa inicial de precipitación, o (ii) de la etapa de lavado con la misma sal, o (iii) de la primera, segunda o cualquier etapa de lavado adicional con agua, se disuelve en un tampón adecuado, preferiblemente en un tampón acético, incluso más preferido en ácido acético aproximadamente al 1% a 2% (v/v), lo más preferiblemente en ácido acético aproximadamente al 1%. Según unas realizaciones preferidas adicionales, ese tampón comprende además 25 a 50% (v/v)

de un alcohol, preferiblemente etanol. Así, un tampón acético preferido comprende ácido acético aproximadamente al 1 a 2 % y aproximadamente 15 a 50%, preferiblemente 20 a 40% (v/v), lo más preferiblemente 40% (v/v) de alcohol, preferiblemente etanol. Posteriormente, el producto disuelto puede titularse a un pH deseado y finalmente filtrarse y congelarse, o secarse por congelación o cristalizarse. Los métodos para congelar, secar por congelación y cristalización son bien conocidos por un experto en la técnica, y pueden aplicarse al procesado adicional de los lantibióticos, preferiblemente de gallidermina. Ejemplos de estos procesos se describen en (Scopes, R.K., Protein Purification: Principles and Practice. Springer, 1993). Así, el proceso descrito en este documento se relaciona con un método para la fabricación de un péptido de lantibiótico, que comprende una fermentación y una etapa de purificación, en la que la etapa de purificación comprende la etapa: (i) precipitación del péptido de lantibiótico del sobrenadante del cultivo celular añadiendo una sal inorgánica y obteniendo el precipitado, (ii) lavando opcionalmente el precipitado con una disolución que comprende la misma sal que la usada para la precipitación, y obteniendo el precipitado, (iii) lavando opcionalmente el precipitado de las etapas (i) o (ii) con agua y obteniendo el precipitado, (iv) repitiendo opcionalmente la etapa (iii), (v) disolviendo el precipitado de las etapas (ii) a (iv) en un tampón acético, preferiblemente en ácido acético al 1%, y (vi) titrando el producto disuelto a un pH deseado y finalmente filtrando y congelando, o secando por congelación o cristalizando. Preferiblemente, antes de la etapa de precipitación, las células se eliminan y el pH se ajusta como se describe en *supra*.

La pureza del producto podría mejorarse adicionalmente al > 98% del área mediante HPLC o LPLC preparativo, preferiblemente por cromatografía de fase inversa. Los métodos para el desalado y/o la purificación de productos usando cromatografía de fase inversa son bien conocidos por un experto en la técnica, y se describen por ejemplo en (Scopes, R.K., Protein Purification: Principles and Practice. Springer, 1993). Por ejemplo, medios adecuados de cromatografía que pueden usarse son Amberchrom HPR10, XT20, cg300c y cg161c (Rohm and Haas, Filadelfia USA), y similares. Así, el proceso descrito en este documento se refiere a un método para la fabricación de un péptido de lantibiótico, que comprende una fermentación y una etapa de purificación, en la que la etapa de purificación comprende la etapa: (i) precipitación del péptido de lantibiótico de un sobrenadante de cultivo celular añadiendo una sal inorgánica y obteniendo el precipitado, (ii) lavar opcionalmente el precipitado con una disolución que comprende la misma sal que la usada para la precipitación y obteniendo el precipitado, (iii) lavar opcionalmente el precipitado de las etapas (i) o (ii) con agua y obtener el precipitado, (iv) repetir opcionalmente la etapa (iii), (v) someter al péptido de

lantibiótico obtenido de cualquiera de las etapas anteriores (i) a (iv) a una única etapa de purificación cromatográfica, preferiblemente en la que dicha etapa de purificación cromatográfica es cromatografía de fase inversa. Preferiblemente, antes de la etapa de precipitación, las células se eliminan y el pH se ajusta como se describe en *supra*.

5 Según una realización adicional, el precipitado obtenido (i) directamente de la etapa de precipitación, (ii) de la etapa de lavado con la misma sal, (iii) de la primera, segunda o cualquier etapa de lavado adicional con agua, como se describe en *supra*, puede cargarse en una columna de cromatografía de fase inversa, que se lava entonces con una disolución en agua, por ejemplo de acetonitrilo al 16% (v/v), ácido trifluoroacético al 0,1% (v/v) en agua, o similares. El producto puede entonces eluirse de la
10 columna con un gradiente de acetonitrilo, preferiblemente de 20-40% (v/v), por ejemplo de 24-36% (v/v) de acetonitrilo en agua o similar. Preferiblemente, el tampón de elución puede incluir además ácido trifluoroacético y similares, preferiblemente de aproximadamente 0,01 a 0,5% (v/v), incluso más preferiblemente a aproximadamente
15 0,1% (v/v). El disolvente orgánico se elimina entonces de la disolución de producto por destilación a baja presión, el producto se titra a un pH deseado y finalmente se filtra y congela, o se seca por congelación o se cristaliza. La recogida del producto de la columna de HPLC puede ajustarse a un aumento adicional de la pureza, sin embargo, con una consiguiente disminución en rendimiento.

20 De manera alternativa, el precipitado obtenido (i) directamente de la etapa de precipitación, (ii) de la etapa de lavado con la misma sal, (iii) de la primera, segunda o cualquier etapa de lavado adicional con agua, como se describe en *supra*, se suspende en un tampón acuoso, que comprende etanol y ácido acético. Preferiblemente, la concentración de etanol es aproximadamente 5 a 50% (v/v), incluso más preferido de
25 20 a 45% (v/v), lo más preferido aproximadamente 40% (v/v), y el ácido acético es de aproximadamente 0,1 a 10% (v/v), preferiblemente de aproximadamente 0,5 a 5% (v/v), lo más preferido de aproximadamente 1,0% (v/v). La disolución de producto resultante se filtró opcionalmente, mientras la etapa de filtración se usa preferiblemente, y se cargó en una columna de cromatografía en fase inversa a baja presión, por ejemplo en Amberchrom cg300c (Rohm and Haas, Filadelfia USA). Los medios cromatográficos en fase inversa similares también serían adecuados, por ejemplo, Amberchrom cg161c, o similares. Está en el conocimiento general de un experto en la técnica seleccionar unos medios cromatográficos en fase inversa adecuados para realizar el
30 proceso como se describe en este documento. La columna se lava entonces con un
35 tampón adecuado que comprende, por ejemplo, acetonitrilo y ácido fluoroacético en agua, preferiblemente aproximadamente 16% de acetonitrilo y aproximadamente 0,1

% de ácido trifluoroacético en agua. Sin embargo, cualquier otro tampón acuoso adecuado, que contenga un disolvente orgánico y una sustancia ácida puede usarse para llevar a cabo la cromatografía en fase inversa. La elución del producto se hace preferiblemente con un disolvente ácido fuerte, por ejemplo, con aproximadamente 60 a 90 % (v/v) de acetonitrilo en agua, preferiblemente con aproximadamente 80% de acetonitrilo en agua. El disolvente orgánico se elimina entonces de la disolución de producto por destilación a baja presión, el producto se titra a un pH deseado y finalmente se filtra y congela, se seca por congelación o se cristaliza.

Según una realización adicional, el proceso descrito en este documento se refiere a un método para la fabricación de un péptido de lantibiótico, que comprende una fermentación y una etapa de purificación, en la que la etapa de purificación comprende la etapa: (i) precipitación del péptido de lantibiótico de un sobrenadante de cultivo celular añadiendo una sal inorgánica y obteniendo el precipitado, (ii) lavar el precipitado con una disolución que comprende la misma sal que la usada para la precipitación y obtener el precipitado, (iii) someter al péptido de lantibiótico obtenido de la etapa de lavado (ii) a una única etapa de purificación cromatográfica, preferiblemente en la que dicha etapa de purificación cromatográfica es cromatografía de fase inversa, (iv) eliminar el disolvente orgánico de la disolución de producto por destilación a baja presión, (v) titularla a un pH deseado y finalmente secarla por congelación. Preferiblemente, antes de la etapa de precipitación, las células se eliminan y el pH se ajusta como se describe en *supra*.

EJEMPLOS:

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar adicionalmente la presente invención; aunque los mismos no están contruidos como limitantes del alcance de la invención descrita en este documento. Más bien, los siguientes ejemplos ilustrarán el concepto inventivo general del proceso, como se describe en este documento.

Ejemplo 1:

Fermentación de gallidermina

Cultivo congelado (WCC):

Se usó un vial de *Staphylococcus gallinarum* (Tü 3928; DSM 4616) de existencias congeladas (Zellbank BO-002; Kampagne 1940122004033, Referencia 35/3/18) para inocular de forma aséptica una placa de agar. El cultivo de agar se incubó a 37 °C durante 1 día, seguido por 1 día a 4 °C (con Parafilm – aunque esta etapa no es necesaria). Este cultivo se usó para la inoculación de la primera siembra. Para cada producción debe usarse un nuevo vial.

61

Medio de cultivo por placa:

Extracto de Levadura Hy-Yest 455	5 g/L	Kerry Bioscience
Glucosa x H ₂ O	1 g/L	Cerestar o Merck
NaCl	5 g/L	Fluka o Merck
Bacto Agar	12 g/L	Bekton Dickinson
H ₂ O	Desionizada	
pH	7,3	(antes de la esterilización)

Pre-cultivo o primera siembra (2 matraces de agitación; 500 ml):

5 Un pedazo de placa cultivada (ca. 0,5 x 0,5 cm) se transfirió de forma aséptica a dos matraces de agitación con deflector de 500 ml (un deflector), que contienen 100 ml de medio de siembra esterilizado. Los matraces sembrados se incubaron en un agitador rotatorio (140 - 180 rpm) a 37°C durante 16-18h. El título del producto final estaría en el intervalo de: ≥ 100 mg/L.

Medio:

Extracto de levadura Ohly Kat	50 g/L	Deutsche Hefewerke
CaCl ₂ x H ₂ O	45 g/L	Merck
Maltosa x H ₂ O	5 g/L	Merck
PEG600 / Genapol EP 0244(1:1)	0,5 ml/L	Fluka / Clariant
H ₂ O	Desionizada	
pH	7,3	Antes de la esterilización

10

Segunda siembra (o fermentador de laboratorio):

Segundo medio de siembra:

Extracto de levadura Ohly Kat	50 g/L	Deutsche Hefewerke
CaCl ₂ x H ₂ O	45 g/L	Merck
Maltosa x H ₂ O	5 g/L	Merck
PEG600 / Genapol EP 0244(1:1)	0,5 ml/L	Fluka / Clariant
Alimentación: Monohidrato de glucosa (40%, p/p)		Cerestar
H ₂ O	Desionizada	
pH	7,3	antes de la esterilización

La primera siembra (2,0 %) se transfirió de forma aséptica a un bioreactor de 20 L con el mismo medio que en el pre-cultivo (= medio de siembra). El tarro o matraz sembrado o el cultivo en el bioreactor se incubó a 37°C durante hasta 24 h. Después de 5-6 horas se dio un cambio de pO_2 y en ese momento se comenzó la alimentación de glucosa (véase perfil de alimentación bajo fermentación de producción). Para evitar la formación de espuma, se añadieron 0,05 ml/L de una mezcla 1:1 de Genapol EP 0244 y PEG 600 antes de la esterilización. Si el fermentador se usó como inóculo para el fermentador de producción, entonces el cultivo se incubó solo durante 16-18 h y entonces se transfirió al bioreactor de producción (razón: el título del producto sería < 200 mg/L cuando se transfirió)

Fermentación de producción:

La fermentación de la producción se realizó en un tanque de 1500 L con volúmenes de trabajo de 1000 L (NB hasta ahora 20 L en la escala del fermentador (estaba planeado 10 L de volumen de trabajo, 1,5 m³). El medio esterilizado se enfrió a 37 °C, y se inocularó con la segunda siembra. La cantidad de inóculo fue 0,5 %. Las condiciones de fermentación fueron como sigue:

Medio: el mismo que para el cultivo de siembra

Temperatura de incubación: 37°C

pH: no controlado, *aunque el pH en la inoculación se fijaría en 6,3*

Impedimento de formación de espuma: se usaron 0,5 ml/L de una mezcla 1:1 de Genapol y PEG 600

Velocidad del agitador: empieza a 300 rpm

Velocidad de aireación: 0,5 vvm

Se probaron dos perfiles de alimentación distintos

Alimentación A: Después del cambio de pO_2 (después de 5-6 h), la alimentación se empezó con una velocidad de alimentación de 6,5 kg / (m³ h) con una pendiente constante de 0,15 kg / (m³ h) (A).

Alimentación B: Después de 5 horas de alimentación, la velocidad de alimentación se aumentó en 1 kg / (m³ h) con la misma pendiente que anteriormente (B):

Un perfil de fermentación típico para la producción de gallidermina como se describe anteriormente, se muestra en la figura 1.

Basadas en todos los descubrimientos, se realizaron varias fermentaciones bajo las mismas condiciones (véase anteriormente) para ver si el proceso era fuerte y reproducible. La figura 2 muestra los perfiles típicos de dos fermentaciones estándar, dando por resultado una productividad de gallidermina como se describe en este documento.

Ejemplo 2:

Purificación de gallidermina

Empezando desde el sobrenadante del cultivo del proceso de fermentación como se describe en el Ejemplo 1, se purificó la gallidermina mediante los siguientes procedimientos:

Procedimiento A: Precipitación con sulfato de amonio

Después de la fermentación, las células se eliminaron por centrifugación y el producto se precipitó desde el sobrenadante libre de células (pH 6,7) mediante la adición, con agitación suave durante 30 min a temperatura ambiente, de 314 g/l de sulfato de amonio, que es equivalente a 50% de saturación.

En un experimento separado, se probó la precipitación con diversas concentraciones (saturaciones) de sulfato de amonio.

% de saturación de sulfato de amonio	Rendimiento (%)
20	9
30	31
40	69
50	76
60	74

La suspensión se agitó lentamente durante unos 30 min adicionales y entonces el precipitado se recogió por filtración. El precipitado se disolvió en una disolución de 40% de etanol, 1% de ácido acético en agua (1/4 del volumen inicial). El rendimiento del producto fue 87%, y la pureza, medida por HPLC analítico, fue 93,6% de área.

La pureza del producto podría mejorarse adicionalmente a > 98% de área mediante HPLC de preparación. El medio de cromatografía fue Amberchrom HPR10 (XT20 también se probó con éxito). El producto se cargó en la columna, que después se lavó con una disolución en agua de 16 % de acetonitrilo, 0,1 % de ácido trifluoroacético. El producto se eluyó de la columna con un gradiente de 24-36% de acetonitrilo.

Procedimiento B: Precipitación con NaCl

Variante A:

1. Después de la fermentación, las células se eliminaron por centrifugación y el producto se precipitó del sobrenadante libre de células mediante la adición de 200 g/L de NaCl con agitación suave durante 30 min a temperatura ambiente. Se continuó la precipitación durante 30 min.

64

1a). En un experimento separado, se probó el efecto del tiempo de precipitación en el rendimiento y la pureza del producto (200 g/L de NaCl, pH 6,7, temperatura ambiente):

Tiempo de precipitación (h)	Rendimiento (%)	Pureza después de la precipitación (% de área por HPLC)
0,5	83,2	91,5
1,0	80,0	91,1
2,0	79,4	90,9
19	81,9	88,1

5 1b). En un experimento adicional, se probó el efecto de la concentración de NaCl en el rendimiento y pureza del producto (tiempo de precipitación 30 min, pH 6,7, temperatura ambiente):

Concentración de NaCl (g/L)	Rendimiento (%)	Pureza después de la precipitación (% de área por HPLC)
310	86,0	79,6
279	85,7	81,6
248	88,3	83,3
217	85,6	85,7
186	81,2	86,3
155	74,4	86,9

10 1c). En un experimento adicional, se probó el efecto del pH de la disolución de producto antes de la precipitación en el rendimiento y pureza del producto (tiempo de precipitación 30 min, 200 g/L de NaCl, temperatura ambiente):

pH	Rendimiento (%)	Pureza después de la precipitación (% de área por HPLC)
6,7 (directo desde el fermentador)	59,8	92,8
7,5	75,0	94,2
8,0	83,7	93,9
8,5	90,4	92,8

65

2. El precipitado de producto se centrifugó y lavó con una disolución de 200 g/L de NaCl. El volumen de lavado fue equivalente a la mitad del volumen de la disolución inicial de producto.

3. El precipitado se centrifugó de nuevo y se suspendió en 1/20° del volumen inicial de agua.

4. Después de la centrifugación, el precipitado se suspendió en 1/20° del volumen inicial de agua y se centrifugó una segunda vez.

5. El precipitado de producto se disolvió en ácido acético al 1% y pudo entonces titrarse a un pH deseado con una disolución de NaOH, y finalmente se filtró y congeló.

Variante B:

1. Después de la fermentación, las células se eliminaron por centrifugación y el producto se precipitó del sobrenadante libre de células mediante la adición de 200 g/L de NaCl con agitación suave durante 30 min a temperatura ambiente. La precipitación se continuó durante 30 min.

2. El precipitado de producto se centrifugó y lavó con una disolución de 200 g/L de NaCl. El volumen de lavado fue equivalente a la mitad del volumen de la disolución inicial de producto.

3. El precipitado se centrifugó de nuevo y se suspendió en 1/20° del volumen inicial de agua.

4. Se añadió una disolución de 20% de etanol, 2% de ácido acético en agua para dar un volumen final de ¼ del volumen inicial. También es posible un volumen mayor.

5. La disolución del producto se filtró y cargó en una columna de Amberchrom cg300c (cromatografía de fase inversa a baja presión). También podrían ser adecuados medios cromatográficos en fase inversa similares, por ejemplo, Amberchrom cg161c. La columna se lavó con 16% de acetonitrilo, 0,1% de ácido trifluoroacético en agua, y luego el producto se eluyó con acetonitrilo al 80% en agua.

6. Se eliminó el acetonitrilo de la disolución de producto por destilación a baja presión.

7. El producto se secó por congelación. El rendimiento total fue 57%, la pureza por HPLC fue 95% y el contenido fue 68%.

Variante C:

1. Después de la fermentación, las células se eliminaron por centrifugación y el sobrenadante libre de células se ajustó a pH 8,0 con NaOH 0,5 M. El producto se precipitó del sobrenadante libre de células mediante la adición de 200 g/L de NaCl y 17

g/L de Celite con agitación suave durante 30 min a temperatura ambiente. La precipitación se continuó durante 30 min.

2. El precipitado de producto se filtró y lavó con tres partes de una disolución de 200 g/L de NaCl. El volumen total de lavado de sal fue equivalente a tres cuartos
5 del volumen de la disolución inicial de producto.

3. El precipitado se lavó con una parte de agua, equivalente a 1/20° del volumen de la disolución inicial de producto.

4. El precipitado se disolvió con tres partes de 40% de etanol, 1% de ácido acético. El volumen total fue un cuarto del volumen de la disolución inicial de producto.

10 5. La disolución de producto se filtró y cargó en una columna de resina en HPLC en fase inversa Amberchrom HPR10. Otras resinas de HPLC en fase inversa tal como Amberchrom XT20 o Kromasil 100A-10-C18, podrían ser también adecuadas. La columna se lavó después con una disolución en agua de 16 % de acetonitrilo, 0,1 % de ácido trifluoroacético. El producto se eluyó de la columna con un gradiente de 24-36%
15 de acetonitrilo en agua que contenía 0,1 % de ácido trifluoroacético.

6. Se eliminó el acetonitrilo de la disolución de producto por destilación a baja presión.

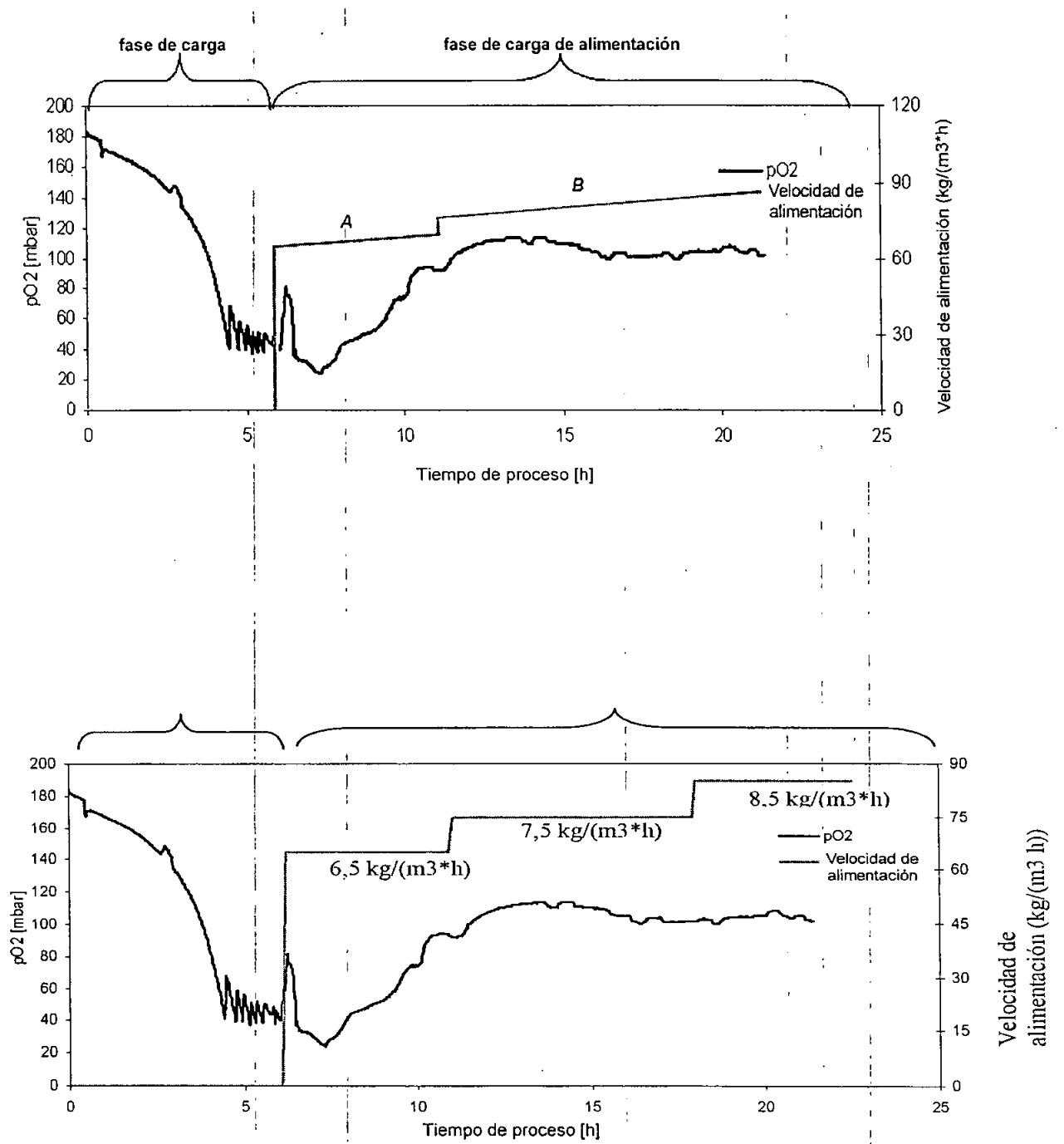
7. El producto se secó por congelación. Típicamente, se obtuvieron purezas de > 98% en área. La recogida de producto de la columna de HPLC podía ajustarse para
20 aumentar la pureza (con una consecuente disminución en el rendimiento).

Reivindicaciones

1. Método para la fabricación de un péptido de lantibiótico, que comprende una etapa de fermentación y purificación, en el que la etapa de purificación comprende la etapa:
 - (i) precipitación del péptido de lantibiótico de un sobrenadante de cultivo celular añadiendo una sal inorgánica.
2. Método según la reivindicación 1, caracterizada porque comprende además la etapa de purificación:
 - (ii) someter el péptido obtenido de la etapa de precipitado i) a una etapa de lavado, una única etapa de purificación cromatográfica, una etapa de secado o a cristalización.
3. Método según la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque la sal inorgánica comprende la composición $M^n X^m$, en la que $n=+1, +2$ y $m=-1, -2, -3$.
4. Método según la reivindicación 3, caracterizado porque X se selecciona del grupo que comprende halógeno, fosfato, fosfonato, sulfato, sulfonilo, acetato y porque M se selecciona del grupo que comprende metales alcalinos, metales alcalinotérreos y amonio.
5. Método según la reivindicación 4, caracterizado porque la sal es preferiblemente un halógeno alcalino, preferiblemente es cloruro sódico o de potasio.
6. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque la precipitación con una sal inorgánica se lleva a cabo a concentraciones de sal de al menos 1,6 M o por encima.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque el sobrenadante de cultivo celular resultante de la etapa de fermentación se cosecha de una carga bacteriana o cultivo celular de carga de alimentación que no ha crecido más allá del comienzo de la fase estacionaria, o procede del cultivo celular bacteriano continuo.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque el medio usado para la etapa de fermentación se suplementa con extracto de levadura.
9. Método según la reivindicación 9, caracterizado porque el cultivo celular bacteriano es un cultivo de Estafilococo, preferiblemente es un cultivo de *S. gallinarum*.
10. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque el péptido de lantibiótico se selecciona del grupo que consiste en epidermina, pep5 o gallidermina o sus variantes que comprenden al menos el motivo estructural de fórmula I.

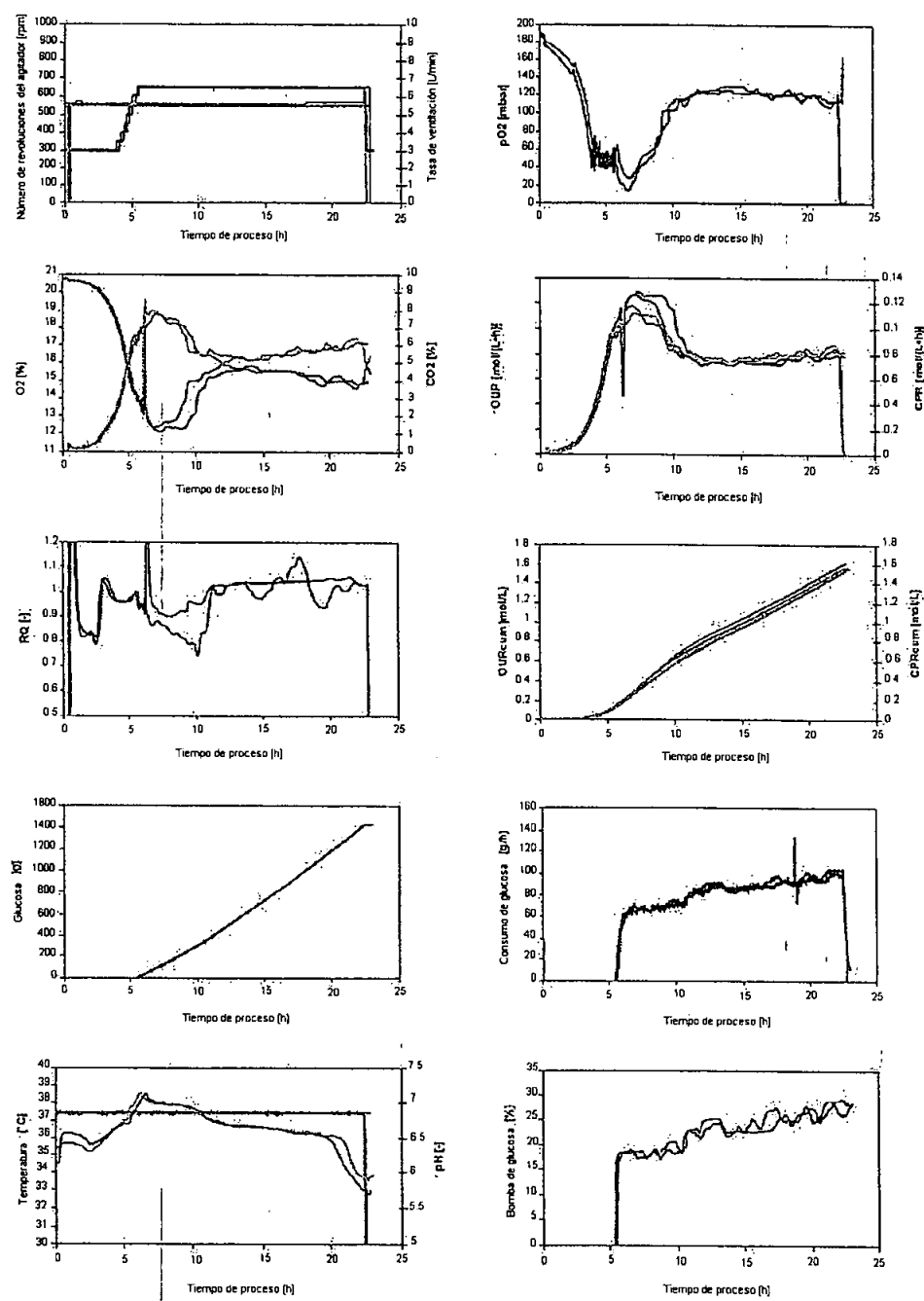
68

Figura 1:



69

Figura 2:



RESUMEN

La presente invención se refiere a la fabricación de compuestos de antibiótico de la clase conocida como lantibióticos. Preferiblemente, la presente invención se refiere a la purificación de esos lantibióticos.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2007/051192

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

72

International Application No. PCT/EP2007 /051192

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2007/051192

73

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03045987 A	05-06-2003	AU 2002358522 A1	10-06-2003
		CA 2467114 A1	05-06-2003
		NZ 533636 A	30-03-2007
		US 2005106662 A1	19-05-2005

75

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-083658- -00000-0000

Fecha: 2008-08-12 16:06:49 Dep. 2020 NUECREACIONI
 Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 75

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 62,298
 FECHA : AGOSTO 4 DE 2008

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	434542	04/08/2008	40,844,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	501,000.00
		TOTAL :	\$ 501,000.00

SON: QUINIENTOS UN MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

[Signature]
 020104484 - 841-015-3.

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

76

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-083658-00000-0000

Fecha: 2008-08-12 16:06:49 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 75



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 2008-08-12-08

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

77

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
FERRERO EMILIO
Apoderado(a) y/o Representante de
BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH

REFERENCIA	Radicación No.	8 83658
	Solicitud internacional	PCT/EP2007/051192
	Fecha inicio fase nacional	13/09/2008
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	11603

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 12 SET. 2008
adpall