



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 2129693 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C08B 37/00 (2006.01)
A61K 39/09 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(21)	Translation Published	2017.03.20
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2016.12.07
(86)	European Application Nr.	08732592.4
(86)	European Filing Date	2008.03.20
(87)	The European Application's Publication Date	2009.12.09
(30)	Priority	2007.03.23, US, 896616 P
(84)	Designated Contracting States:	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MT NL NO PL PT RO SE SI SK TR
(73)	Proprietor	Wyeth LLC, 235 East 42nd Street, New York, NY 10017-5755, US-USA
(72)	Inventor	YUAN, Yonghui, 118 Newport Avenue, Tappan, NY 10983, US-USA RUPPEN, Mark, 6 Lea Avenue, Garnerville, NY 10923, US-USA SUN, Wei-Qiang, 30 Windmill Drive, Morristown, NJ 07960, US-USA CHU, Ling, 5 Potter Lane, Suffern, NY 10901, US-USA SIMPSON, John, 417 Maple Avenue, Upper Nyack, NY 10960, US-USA PATCH, James, 11 River Avenue, Cornwall On Hudson, NY 12520, US-USA FINK CHARBONNEAU, Pamela, 8 Eldor Avenue, New City, NY 10956, US-USA MORAN, Justin, K., 682 Sierra Vista Lane, Valley Cottage, NY 10989, US-USA
(74)	Agent or Attorney	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge

(54)	Title	SHORTENED PURIFICATION PROCESS FOR THE PRODUCTION OF CAPSULAR STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE POLYSACCHARIDES
(56)	References Cited:	EP-A- 0 002 404 EP-A- 1 762 245 WO-A-82/01995 US-A- 5 623 057 US-A1- 2006 228 381

Enclosed is a translation of the patent claims in Norwegian. Please note that as per the Norwegian Patents Acts, section 66i the patent will receive protection in Norway only as far as there is agreement between the translation and the language of the application/patent granted at the EPO. In matters concerning the validity of the patent, language of the application/patent granted at the EPO will be used as the basis for the decision. The patent documents published by the EPO are available through Espacenet (<http://worldwide.espacenet.com>) or via the search engine on our website here: <https://search.patentstyret.no/>

Patentkrav

1. Fremgangsmåte for produksjon av rensede kapsulære polysakkarider fra et *Streptococcus pneumoniae*-cellelysat, idet fremgangsmåten omfatter trinnene med:

- (a) tilveiebringelse av et gjæringsmedium omfattende bakterielle celler som produserer en valgt *Streptococcus pneumoniae*-serotype;
- (b) lysering av de bakterielle cellene i trinn (a) med et lytisk middel, hvilket produserer et cellelysat omfattende cellerester, løselige proteiner, nukleinsyrer og polysakkarider;
- (c) klaring av cellelysatet i trinn (b) ved anvendelse av sentrifugering eller filtrering for å fjerne cellerester, hvilket produserer et klaret cellelysat;
- (d) ultrafiltrering og diafiltrering av det klarede cellelysatet i trinn (c) for å fjerne urenheter med lav molekylvekt og øke polysakkaridkonsentrasjon, hvilket produserer et retentat;
- (e) senking av retentatets pH i trinn (d) til mindre enn 4,5 for å felle ut protein og nukleinsyrer, hvilket danner en surgjort retentatløsning;
- (f) holding av den surgjorte retentatløsningen dannet i trinn (e) tilstrekkelig lenge til at presipitatet felles ut, etterfulgt av filtrering eller sentrifugering av den surgjorte retentatløsningen, hvilket produserer en klaret polysakkaridløsning;
- (g) filtrering av den klarede polysakkaridløsningen i trinn (f) gjennom et aktivkarbonfilter;
- (h) ultrafiltrering og diafiltrering av den filtrerte løsningen produsert i trinn (g), hvilket produserer en konsentrert rensset polysakkaridløsning; og
- (i) filtrering av den konsentrerte rensede polysakkaridløsningen produsert i trinn (h) ved anvendelse av et sterilt filter; hvorved rensede kapsulære polysakkarider i form av en løsning produseres.

2. Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvori den valgte *Streptococcus pneumoniae*-serotypen er valgt fra gruppen bestående av 1,4,5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, og 23F.

3. Fremgangsmåten ifølge krav 1 eller 2, hvori pH-en i trinn (e) senkes til ca. 3,5.

- 4.** Fremgangsmåten ifølge krav 1, 2 eller 3, hvori diafiltreringen av trinn (h) omfatter en pH-justering til mellom ca. 5,5 og ca. 7,5.
- 5 **5.** Fremgangsmåten ifølge krav 1, 2 eller 3, hvori diafiltreringen i trinn (h) omfatter en pH-justering til mellom ca. 7,0 og ca. 7,5.
- 6.** Fremgangsmåten ifølge krav 1, 2 eller 3, hvori diafiltreringen i trinn (h) omfatter en pH-justering til ca. 7,4.
- 10 **7.** Fremgangsmåten ifølge hvilke som helst av krav 1 til 6, hvori trinn (e) fjerner minst 98 % av proteinet fra retentatet i trinn (d).
- 8.** Fremgangsmåten ifølge hvilke som helst av krav 1 til 7, hvori trinn (g) fjerner minst 90 % av proteinet fra den klarede polysakkaridløsningen i trinn (f).
- 15 **9.** Fremgangsmåten ifølge hvilke som helst av krav 1 til 8, hvori aktivkarbonfilteret i trinn (g) omfatter trebasert fosforsyre-aktivkarbon.
- 10.** Fremgangsmåten ifølge hvilke som helst av krav 1 til 9, hvori trinn (f) omfatter holding av den surgjorte retentatløsningen dannet i trinn (e) i minst 2 timer.
- 20 **11.** Fremgangsmåten ifølge hvilke som helst av krav 1 til 10, hvori det lytiske middelet i trinn (b) er deoksyholatnatrium.
- 25 **12.** Fremgangsmåten ifølge hvilke som helst av krav 1 til 10, hvori det lytiske middelet i trinn (b) er et ikke-avledet lytisk middel.
- 13.** Fremgangsmåten ifølge krav 12, hvori det ikke-avlede lytiske middelet er valgt fra gruppen bestående av: dekansvovelsyre, tert-oktylphenoksypropyl(oksyetylen)etanoler, oktylphenoletylenoksidkondensater, N-laurylsarkosinnatrium (NLS), lauryliminodipropionat, natriumdodekylsulfat, chenodeoksyholat, hyodeoksyholat, glykodeoksyholat, taurodeoksyholat, taurochenodeoksyholat og cholat.
- 30
- 35

14. Fremgangsmåten ifølge krav 12, hvori det ikke-avledede lytiske middelet er N-laurylsarkosinnatrium.

15. Fremgangsmåten ifølge krav 1, idet fremgangsmåten omfatter trinnene med:

(a) tilveiebringelse av et gjæringsmedium omfattende bakterielle celler som produserer *Streptococcus pneumoniae*-serotype 1,4,5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F, eller 23F;

(b) lysing av de bakterielle cellene i trinn (a) med et lytisk middel, hvilket produserer et cellelysate omfattende cellerester, løselige proteiner, nukleinsyrer og polysakkarider;

(c) klaring av cellelysate i trinn (b) ved anvendelse av sentrifugering eller filtrering for å fjerne cellerester, hvilket produserer et klart cellelysate;

(d) ultrafiltering og diafiltering av det klarede cellelysate i trinn (c) ved romtemperatur ved nøytral pH i saltfritt medium for å fjerne urenheter med lav molekylvekt og øke polysakkaridkonsentrasjonen, hvilket produserer et saltfritt retentat;

(e) senking av pH-en for det saltfrie retentatet i trinn (d) til mindre enn 4,5 for å felle ut protein og nukleinsyrer, hvilket danner en surgjort retentatløsning;

(f) holding av den surgjorte retentatløsningen dannet i trinn (e) i minst 2 timer ved romtemperatur slik at presipitatet kan felles ut, etterfulgt av filtrering eller sentrifugering av den surgjorte retentatløsningen, hvilket produserer en klart polysakkaridløsning;

(g) filtrering av den klarede polysakkaridløsningen i trinn (f) gjennom et aktivkarbonfilter;

(h) ultrafiltering og diafiltering av den filtrerte løsningen produsert i trinn (g), hvilket produserer en konsentrert rensed polysakkaridløsning; og

(i) filtrering av den konsentrerte rensede polysakkaridløsningen produsert i trinn (h) ved anvendelse av et sterilt filter; hvorved rensede kapsulære polysakkarider omfattende serotype 1,4,5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14,18C, 19F, eller 23F i form av en løsning produseres.

16. Fremgangsmåten ifølge krav 15, hvori pH-en i trinn (e) senkes til ca. 3,5.

- 17.** Fremgangsmåten ifølge krav 15 eller 16, hvori diafiltreringen av trinn (h) omfatter en pH-justering til mellom ca. 5,5 og ca. 7,5.
- 5 **18.** Fremgangsmåten ifølge krav 15 eller 16, hvori diafiltreringen av trinn (h) omfatter en pH-justering til mellom ca. 7,0 og ca. 7,5.
- 19.** Fremgangsmåten ifølge krav 15 eller 16, hvori diafiltreringen i trinn (h) omfatter en pH-justering til ca. 7,4.
- 10 **20.** Fremgangsmåten ifølge hvilke som helst av krav 15 til 19, hvori trinn (e) fjerner minst 98 % protein fra det saltfrie retentatet i trinn (d).
- 21.** Fremgangsmåten ifølge hvilke som helst av krav 15 til 20, hvori trinn (g) fjerner minst 90 % av proteinet fra den klarede polysakkaridløsningen i trinn (f).
- 15 **22.** Fremgangsmåten ifølge hvilke som helst av krav 15 til 21, hvori aktivkarbonfilter i trinn (g) omfatter trebasert fosforsyre-aktivkarbon.
- 23.** Fremgangsmåten ifølge hvilke som helst av krav 15 til 22, hvori det lytiske middelet i trinn (b) er deoksycholatrium.
- 20 **24.** Fremgangsmåten ifølge hvilke som helst av krav 15 til 22, hvori det lytiske middelet i trinn (b) er et ikke-avledet lytisk middel.
- 25.** Fremgangsmåten ifølge krav 24, hvori det ikke-avledede lytiske middelet er valgt fra gruppen bestående av: dekansvovelsyre, tert-oktylfenoksy-poly(oksyetylen)etanoler, oktylfenoletylenoksidkondensater, N-laurylsarkosinnatrium (NLS), lauryliminodipropionat, natriumdodekylsulfat, chenodeoksycholatrium, hyodeoksycholatrium, glykodeoksycholatrium, taurodeoksycholatrium, taurochenodeoksycholatrium, og cholatrium.
- 25 **26.** Fremgangsmåten ifølge krav 24, hvori det ikke-avledede lytiske middelet er N-laurylsarkosinnatrium.
- 30 **27.** Fremgangsmåten ifølge krav 1, idet fremgangsmåten omfatter trinnene med:
- 35

- (a) tilveiebringelse av et gjæringsmedium omfattende bakterielle celler som produserer *Streptococcus pneumoniae*-serotype 19A;
- (b) lysing av de bakterielle cellene i trinn (a) med et lytisk middel, hvilket produserer et cellelysat omfattende cellerester, løselige proteiner, nukleinsyrer og polysakkarider;
- (c) klaring av cellelysatet i trinn (b) ved anvendelse av sentrifugering eller filtrering for å fjerne cellerester, hvilket produserer et klaret cellelysat;
- (d) ultrafiltrering og diafiltrering av det klarede cellelysatet i trinn (c) ved ca. 4 °C ved en pH på ca. 6 i natriumfosfatbuffer for å fjerne urenheter med lav molekylvekt og øke polysakkaridkonsentrasjonen, hvilket produserer et retentat;
- (e) senking av retentatets pH i trinn (d) til mindre enn 4,5 for å felle ut protein og nukleinsyrer, hvilket danner en surgjort retentatløsning;
- (f) holding av den surgjorte retentatløsningen dannet i trinn (e) i minst 2 timer ved ca. 4 °C slik at presipitatet felles ut, etterfulgt av filtrering eller sentrifugering av den surgjorte retentatløsningen, hvilket produserer en klaret polysakkaridløsning;
- (g) justering av pH-en for den klarede polysakkaridløsningen i trinn (f) til ca. 6, hvilket produserer en pH-justert klaret polysakkaridløsning;
- (h) filtrering av den pH-justerte klarede polysakkaridløsningen i trinn (g) gjennom et aktivkarbonfilter;
- (i) ultrafiltrering og diafiltrering av den filtrerte løsningen produsert i trinn (h), hvilket produserer en konsentrert rensed polysakkaridløsning; og
- (j) filtrering av den konsentrerte rensede polysakkaridløsningen produsert i trinn (i) ved anvendelse av et sterilt filter; hvorved rensede kapsulære polysakkarider omfattende serotype 19A i form av en løsning produseres.

28. Fremgangsmåten ifølge krav 27, hvori pH-en i trinn (e) senkes til ca. 3.5.

29. Fremgangsmåten ifølge krav 27 eller 28, hvori diafiltreringen av trinn (i) omfatter en pH-justering til mellom ca. 5,5 til ca. 7,5.

30. Fremgangsmåten ifølge krav 27 eller 28, hvori diafiltreringen av trinn (i) omfatter en pH-justering til mellom ca. 7,0 til ca. 7,5.

31. Fremgangsmåten ifølge krav 27 eller 28, hvori diafiltreringen i trinn (i) omfatter en pH-justering til ca. 7,4.
- 5 32. Fremgangsmåten ifølge hvilke som helst av krav 27 til 31, hvori trinn (e) fjerner minst 98% av proteinet fra retentatet i trinn (d).
- 10 33. Fremgangsmåten ifølge hvilke som helst av krav 27 til 32, hvori trinn (h) fjerner minst 90 % av proteinet fra den pH-justerte klarede polysakkaridløsningen i trinn (g).
34. Fremgangsmåten ifølge hvilke som helst av krav 27 til 33, hvori aktivkarbonfilteret i trinn (h) omfatter trebasert fosforsyre-aktivkarbon.
- 15 35. Fremgangsmåten ifølge hvilke som helst av krav 27 til 34, hvori natriumfosfatbufferet av trinn (d) er 25 mM natriumfosfat.
36. Fremgangsmåten ifølge hvilke som helst av krav 27 til 35, hvori det lytiske middelet i trinn (b) er deoksycholatrium.
- 20 37. Fremgangsmåten ifølge hvilke som helst av krav 27 til 35, hvori det lytiske middelet i trinn (b) er et ikke-avledet lytisk middel.
- 25 38. Fremgangsmåten ifølge krav 37, hvori det ikke-avlede lytiske middelet er valgt fra gruppen bestående av: dekanesvovelsyre, tert-oktylfenoksy-poly(oksyetylen)etanoler, oktylfenoletylenoksidkondensater, N-laurylsarkosinnatrium (NLS), lauryliminodipropionat, natriumdodekylsulfat, chenodeoksycholatrium, hyodeoksycholatrium, glykodeoksycholatrium, taurodeoksycholatrium, taurochenodeoksycholatrium og cholatrium.
- 30 39. Fremgangsmåten ifølge krav 37, hvori det ikke-avlede lytiske middelet er N-lauryl sarcosine natrium.
- 35 40. Fremgangsmåte for produksjon av en pneumokokkvaksine, hvilket omfatter produksjon av rensede kapsulære polysakkarider fra et *Streptococcus pneumoniae*-cellelysat ved en fremgangsmåte ifølge hvilke som helst av krav 1 til 39 og ved anvendelse av de rensede kapsulære polysakkaridene i

produksjonen av en pneumokokkvaksine.

41. Fremgangsmåten ifølge krav 40, hvori vaksinen er en pneumokokkvaksine inneholdende polysakkarid konjugert med en proteinbærer.