

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 551 123**

51 Int. Cl.:

C07H 19/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.06.2008 E 08770873 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.08.2015 EP 2170919**

54 Título: **Proceso mejorado para la producción de azúcares de nucleótido**

30 Prioridad:

12.06.2007 US 943527 P
27.08.2007 US 968274 P
05.09.2007 US 970247 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.11.2015

73 Titular/es:

RATIOPHARM GMBH (100.0%)
Graf-Arco-Strasse 3
89079 Ulm, DE

72 Inventor/es:

DEFREES, SHAWN y
BOWE, CARYN

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 551 123 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Proceso mejorado para la producción de azúcares de nucleótido

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a métodos de preparación de nucleótidos de azúcar, en los que el resto de azúcar se modifica con un grupo modificador polimérico.

10 **Antecedentes de la invención**

Los azúcares de nucleótido producidos mediante reacciones enzimáticamente catalizadas (por ejemplo, usando glucosiltransferasas) y/u otros métodos sintéticos se obtienen frecuentemente en forma de mezclas complejas que incluyen no solo el compuesto deseado, sino también contaminantes tales como azúcares sin reaccionar, sales, piruvato, fosfato, nucleósidos, nucleótidos, proteínas y similares. La presencia de estos contaminantes no es deseable para muchas aplicaciones aguas abajo. Los productos secundarios normalmente se eliminan usando una o más etapas de purificación cromatográficas. Un método cromatográfico común es la cromatografía de fase inversa. Sin embargo, la cromatografía de fase inversa es frecuentemente no factible para aplicaciones a gran escala debido a los caros medios de separación y el limitado suministro de columnas previamente rellenas. Además, para la cromatografía de fase inversa, normalmente se requieren disolventes orgánicos para la óptima separación y resolución. Existe la necesidad de procesos rentables y eficientes en cuanto al tiempo y métodos de purificación útiles para la producción de azúcares de nucleótido y su aislamiento de mezclas de reacción complejas. La presente invención trata estas y otras necesidades.

25 **Sumario de la invención**

La presente invención proporciona métodos (por ejemplo, procesos a gran escala) para la producción de azúcares de nucleótido, que se modifican con un grupo modificador polimérico. Grupos modificadores a modo de ejemplo incluyen al menos un resto polimérico seleccionado de restos de poli(óxido de alquilenos), tales como restos de poli(etilenglicol) (PEG) y poli(propilenglicol) (PPG). En particular, la presente invención proporciona procesos para la producción de citidina-monofosfato-ácidos siálicos (CMP-SA) modificados. Azúcares de nucleótido modificados a modo de ejemplo, que pueden producirse usando los métodos de la invención, incluyen CMP-SA-PEG-10 kDa, CMP-SA-PEG-20 kDa y CMP-SA-glicerol-PEG-40 kDa (véase la Figura 2 para CMP-SA-PEG a modo de ejemplo).

Se usan azúcares de nucleótido modificados, por ejemplo, en procesos de glucoconjugación (por ejemplo, glucoPEGilación). Se han descrito diversos métodos para la síntesis de azúcares de nucleótido modificados (por ejemplo, CMP-SA-PEG). Véase, por ejemplo, el documento WO2003/31464 presentado el 9 de octubre de 2002, el documento WO2004/99231 presentado el 9 de abril de 2004 y el documento WO2007/056191 presentado el 3 de noviembre de 2006.

Los azúcares de nucleótido modificados pueden prepararse haciendo reaccionar un derivado de azúcares de nucleótido que incorpora un grupo funcional reactivo (por ejemplo, un grupo amino) con un reactivo polimérico reactivo, tal como un carbonato de PEG-*p*-nitrofenilo (*p*NP). Por ejemplo, pueden prepararse CMP-SA-PEG, tales como CMP-SA-PEG-10 kDa, CMP-SA-PEG-20 kDa y CMP-SA-glicerol-PEG-40 kDa, haciendo reaccionar CMP-SA-glicina (GSC) con un reactivo de PEG que incorpora un resto de carbonato de *p*-nitrofenilo. Una ruta de síntesis a modo de ejemplo según esta realización se explica brevemente en la Figura 2. Inesperadamente, los inventores han descubierto que un intervalo de pH entre aproximadamente 8,0 y aproximadamente 8,8 en un sistema de disolvente acuoso es crítico durante la reacción de acoplamiento entre PEG-carbonatos de *p*-nitrofenilo (*p*NP) (por ejemplo, mPEG-*p*-nitrofenilo) y un derivado de azúcares de nucleótido (por ejemplo, CMP-SA-glicina). El intervalo de pH optimizado reduce en gran medida la formación de productos secundarios debido a la hidrólisis de los componentes de reacción y así aumenta significativamente los rendimientos y las purezas para los productos finales.

La presente invención describe procesos, que incorporan menos etapas de producción y proporcionan azúcares de nucleótido modificados (por ejemplo, CMP-SA-PEG) con purzas mejoradas y rendimientos globales cuando se compara con los métodos conocidos. Un proceso típico incorpora (a) cromatografía de intercambio aniónico (AEX), que es útil, por ejemplo, para eliminar impurezas basadas en PEG. La cromatografía de intercambio aniónico va seguida de (b) desalar la disolución de producto parcialmente purificada usando filtración en membrana (es decir, ultrafiltración), tal como filtración de flujo tangencial (TFF). Un proceso representativo de la invención se representa en la Figura 1. En un ejemplo, la etapa de TFF usa una membrana con un corte de peso molecular (MWCO) significativamente más pequeño que el peso molecular del azúcar de nucleótido modificado que se purifica. Por ejemplo, para CMP-SA-PEG-10 kDa, CMP-SA-PEG-20 kDa y CMP-SA-glicerol-PEG-40 kDa se usa una membrana con un corte de peso molecular entre aproximadamente 10 kDa y aproximadamente 1 kDa. El proceso mejorado no requiere ultrafiltración (por ejemplo, TFF) antes de la cromatografía de intercambio aniónico. En su lugar, el volumen de la mezcla de reacción en bruto puede reducirse evaporando parte del disolvente que está presente en la mezcla de reacción (por ejemplo, THF). En un ejemplo, la evaporación se lleva a cabo usando evaporación rotatoria. La mezcla de volumen reducido puede entonces filtrarse para eliminar partículas, por ejemplo, a través de un filtro de

0,22 μm , antes de que la mezcla se someta a cromatografía de intercambio aniónico. En un ejemplo, se obtienen azúcares de nucleótido modificados (por ejemplo, CMP-SA-PEG) producidos por un método de la invención con purezas superiores a aproximadamente el 90 % (peso/peso) y rendimientos aislados entre aproximadamente el 60 y aproximadamente el 80 %.

5 En diversos ejemplos, la invención proporciona un método de preparación de una composición que incluye un azúcar de nucleótido modificado enlazado covalentemente a un grupo modificador polimérico, en el que el grupo modificador polimérico incluye al menos un resto de poli(óxido de alquileo) lineal o ramificado. El método incluye: (i) poner en contacto una mezcla de reacción que comprende el azúcar de nucleótido modificado con un medio de intercambio aniónico; (ii) eluir el azúcar de nucleótido modificado del medio de intercambio aniónico, formando así una fracción de eluato que contiene el azúcar de nucleótido modificado; y (iii) desalar la fracción de eluato. El método no incluye ultrafiltración (por ejemplo, TFF) antes de la cromatografía de intercambio aniónico.

15 En un ejemplo particular, el método de la invención incluye: (i) poner en contacto un derivado de azúcar de nucleótido que incluye un grupo amino primario con un resto de poli(óxido de alquileo) activado que incorpora un resto de carbonato de *p*-nitrofenilo en condiciones suficientes para formar un enlace covalente entre el grupo amino de los derivados de azúcar de nucleótido y el resto de poli(óxido de alquileo). La puesta en contacto se produce en presencia de un disolvente acuoso que tiene un pH entre aproximadamente 8,0 y aproximadamente 8,8. Se forma una mezcla de reacción, que incluye el azúcar de nucleótido modificado. El método incluye adicionalmente (ii) poner en contacto la mezcla de reacción con un medio de intercambio aniónico y (iii) eluir el azúcar de nucleótido modificado del medio de intercambio aniónico que forma una fracción de eluato que contiene el azúcar de nucleótido modificado. El método puede incluir adicionalmente: (iv) desalar la fracción de eluato usando filtración en membrana; y (v) eliminar agua de la fracción de eluato. El método no incluye ultrafiltración antes de la etapa (i).

25 Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** es un diagrama de un proceso de producción a modo de ejemplo de la invención.

30 La **Figura 2** es un esquema sintético que explica brevemente métodos a modo de ejemplo para la síntesis de CMP-SA-PEG que incorporan restos de PEG lineales (por ejemplo, CMP-SA-PEG-10 kDa y CMP-SA-PEG-20 kDa) y ramificados (por ejemplo, CMP-SA-PEG-glicerol-40 kDa). En la Figura 2, *n* es un número entero seleccionado de 1 a 2500.

35 La **Figura 3** es un diagrama que resume los productos secundarios formados durante la síntesis de PEG de azúcares de nucleótidos (por ejemplo, CMP-SA-PEG) usando una reacción de acoplamiento que implica un derivado de azúcar de nucleótido (por ejemplo, CMP-SA-glicina) y un reactivo de PEG-carbonato de *p*-nitrofenilo (por ejemplo, mPEG-*p*NF). Las impurezas mPEG-OH y *p*-nitrofenol (PNP) pueden formarse durante la hidrólisis de mPEG-carbonato de *p*-nitrofenilo. Puede formarse CMP mediante la hidrólisis de CMP-SA-glicina y/o CMP-SA-PEG. SA-PEG puede formarse mediante la hidrólisis de CMP-SA-PEG. En la Figura 3, *n* es un número entero seleccionado de 1 a 2500.

40 La **Figura 4** es un cromatograma de intercambio aniónico obtenido durante la purificación de CMP-SA-PEG-10 kDa usando una columna de cromatografía Q Sepharose Big Beads y un protocolo de elución escalonado con bicarbonato sódico como se describe en el Ejemplo 2.2 (NaHCO₃ 5 mM durante 0,6 VC; 30 mM durante 3 VC; y 1 M durante 7 VC). Los tiempos de retención fueron: SA-PEG-10 kDa (55 min); CMP-SA-PEG-10 kDa (63 min); CMP y CMP-SA-Glu (GSC, 110 min) y *p*-nitrofenol (180 min).

45 La **Figura 5** es un cromatograma de intercambio aniónico obtenido durante la purificación de CMP-SA-PEG-10 kDa usando una columna de cromatografía Q Sepharose Big Beads y elución en gradiente de bicarbonato sódico como se describe en el Ejemplo 7 (0-30 mM durante 3 VC; 30 mM durante 2 VC; 30 mM a 280 mM durante 5 VC; y 1 M durante 10 VC).

50 La **Figura 6** es un cromatograma de intercambio aniónico obtenido durante la purificación de CMP-SA-PEG-20 kDa usando una columna de cromatografía Q Sepharose Big Beads y un protocolo de elución escalonado con bicarbonato sódico como se describe en el Ejemplo 2.3 (NaHCO₃ 2 mM durante 1 VC; 30 mM durante 3 VC; y 1 M durante 7 VC). Los tiempos de retención fueron: SA-PEG-20 kDa (55 min); CMP-SA-PEG-20 kDa (75 min); CMP y CMP-SA-Glu (120 min) y *p*-nitrofenol (200 min).

55 La **Figura 7** es un cromatograma de intercambio aniónico obtenido durante la purificación de CMP-SA-PEG-40 kDa usando una columna de cromatografía Q Sepharose Big Beads y un protocolo de elución escalonado con bicarbonato sódico como se describe en el Ejemplo 2.4 (2 mM durante 1 VC y 30 mM durante 3 VC).

60 La **Figura 8** es un cromatograma de intercambio aniónico obtenido durante la purificación de CMP-SA-PEG-40 kDa usando una columna de cromatografía Q Sepharose Big Beads y una elución con bicarbonato sódico como se describe en el Ejemplo 7 (NaHCO₃ 2 mM durante 4 VC).

65

Descripción detallada de la invención**I. Abreviaturas**

5 PEG, poli(etilenglicol); PPG, poli(propilenglicol); Ara, arabinosilo; Fru, fructosilo; Fuc, fucosilo; Gal, galactosilo; GalNAc, N-acetilgalactosaminilo; Glc, glucosilo; GlcNAc, N-acetilglucosaminilo; Man, manosilo; ManAc, acetato de manosaminilo; Xilo, xilosilo; y NeuAc, sialilo (N-acetilneuraminilo); M6P, manosa-6-fosfato; BEVS, sistema de vector de expresión de baculovirus; VC, volumen de columna; NTU, unidades nominales de turbidez; vvm, volumen/volumen/min; ACN, acetonitrilo; mcl, microlitro; RO, ósmosis inversa.

10

II. Definiciones

15 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento generalmente tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Generalmente, la nomenclatura usada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio en cultivo celular, genética molecular, química orgánica y química de ácidos nucleicos e hibridación son aquellos muy conocidos y comúnmente empleados en la materia. Se usan técnicas convencionales para la síntesis de ácidos nucleicos y de péptidos. Las técnicas y procedimientos se realizan generalmente según métodos convencionales en la materia y diversas referencias generales (véase en general Sambrook et al. MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2d ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.), que se proporciona en todo el presente documento. La nomenclatura usada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio en química analítica y orgánica sintética descritos a continuación son aquellos muy conocidos y comúnmente empleados en la materia. Técnicas convencionales, o modificaciones de las mismas, se usan para síntesis químicas y análisis químicos.

25

El término "azúcar de nucleótido" se usa indistintamente con el término "nucleótido de azúcar" y se refiere a un nucleótido enlazado covalentemente a un resto de azúcar adicional, tal como ácido siálico. El azúcar de nucleótido está opcionalmente covalentemente modificado con un grupo modificador polimérico, tal como un resto de PEG lineal o ramificado.

30

El "resto de azúcar" del azúcar de nucleótido de la invención está seleccionado de tanto furanosas y hexanosas naturales como no naturales. Los sacáridos no naturales opcionalmente incluyen un resto hidroxilo y/o amina alquilado o acilado, por ejemplo, éteres, ésteres y sustituyentes de amida sobre el anillo. Otros sacáridos no naturales incluyen un sustituyente de H, hidroxilo, éter, éster o amida en una posición sobre el anillo en la que un sustituyente tal no está presente en el sacárido natural. Alternativamente, el hidrato de carbono está echando en falta un sustituyente que se encontraría en el hidrato de carbono del que se deriva su nombre, por ejemplo, desoxiazúcares. Todavía otros azúcares no naturales a modo de ejemplo incluyen tanto hidratos de carbono oxidados (por ejemplo, ácidos -ónicos y -urónicos) como reducidos (alcoholes de azúcar). El resto de azúcar puede ser un mono-, oligo- o polisacárido.

35

Azúcares naturales a modo de ejemplo de uso en la presente invención incluyen glucosa, galactosa, fucosa, manosa, xilanosas, ribosa, N-acetilglucosa (GlcNAc), ácido siálico y N-acetilgalactosa (GalNAc).

40

Similarmente, el nucleósido puede seleccionarse de tanto nucleósidos naturales como no naturales. Nucleósidos naturales a modo de ejemplo de uso en la presente invención incluyen citosina, timina, guanina, adenina y uracilo. Varios nucleósidos no naturales y métodos de preparación de ellos se conocen en la técnica.

45

El término "ácido siálico" se refiere a cualquier miembro de una familia de azúcares carboxilados de nueve carbonos. El miembro más común de la familia del ácido siálico es el ácido N-acetil-neuramínico (ácido 2-ceto-5-acetamido-3,5-didesoxi-D-glucero-D-galactonulopiranos-1-ónico (frecuentemente abreviado Neu5Ac, NeuAc, NAN o NANA). Un segundo miembro de la familia es el ácido N-glicolil-neuramínico (Neu5Gc o NeuGc), en el que el grupo N-acetilo de NeuAc está hidroxilado. Un tercer miembro de la familia del ácido siálico es el ácido 2-ceto-3-desoxi-nonulosónico (KDN) (Nadano et al. (1986) J. Biol. Chem. 261: 11550-11557; Kanamori et al., J. Biol. Chem. 265: 21811-21819 (1990)). También están incluidos ácidos siálicos 9-sustituídos tales como un 9-O-acil C₁-C₆-Neu5Ac como 9-O-lactil-Neu5Ac o 9-O-acetil-Neu5Ac, 9-desoxi-9-fluoro-Neu5Ac y 9-azido-9-desoxi-Neu5Ac. Para una revisión de la familia de los ácidos siálicos véanse, por ejemplo, Varki, Glycobiology 2: 25-40 (1992); Sialic Acids: Chemistry, Metabolism and Function, R. Schauer, Ed. (Springer-Verlag, New York (1992)). La síntesis y uso de compuestos de ácido siálico en un procedimiento de sialilación se desvela en la solicitud internacional WO 92/16640, publicada el 1 de octubre de 1992.

55

El término "cromatografía de intercambio aniónico" incluye procedimientos que implican columnas rellenas, además de procedimientos que implican membranas de intercambio aniónico. El término "cromatografía de intercambio aniónico" incluye cromatografía realizada usando cualquier medio en modo mezclado que tiene capacidades de intercambio aniónico.

60

65

- 5 El término “disolvente acuoso” describe disolventes que incorporan al menos aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el 20 %, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 % o al menos aproximadamente el 80 % de agua (v/v). El disolvente acuoso puede incluir opcionalmente disolventes orgánicos miscibles en agua, tales como alcoholes (por ejemplo, metanol, etanol o butanol), THF y otros éteres alifáticos o cíclicos.
- 10 El término “grupo modificador polimérico” se refiere a cualquier polímero unido a un azúcar de nucleótido de la invención. El grupo modificador polimérico puede ser soluble en agua o esencialmente insoluble en agua. Polímeros solubles en agua a modo de ejemplo de uso en la presente invención incluyen PEG, m-PEG y otros restos funcionalizados de PEG, m-PPG, PPG, poli(ácido siálico), poliglutamato, poliaspartato, polilisina, polietilenimina y polímeros biodegradables (por ejemplo, polilactida, poliglicérido).
- 15 El término “soluble en agua” se refiere a restos que tienen algún grado detectable de solubilidad en agua. Métodos para detectar y/o cuantificar la solubilidad en agua son muy conocidos en la técnica. Polímeros solubles en agua a modo de ejemplo incluyen péptidos, sacáridos, poli(éteres), poli(aminas), poli(ácidos carboxílicos) y similares. Los péptidos pueden tener secuencias mixtas compuestas de un único aminoácido, por ejemplo, poli(lisina). Un polisacárido a modo de ejemplo es poli(ácido siálico). Un poli(éter) a modo de ejemplo es poli(etilenglicol), por ejemplo, m-PEG. La poli(etilenimina) es una poliamina a modo de ejemplo y el ácido poli(acrílico) es un poli(ácido carboxílico) representativo.
- 20 El esqueleto de polímero del polímero soluble en agua puede ser poli(etilenglicol) (es decir, PEG). Sin embargo, debe entenderse que también son adecuados otros polímeros relacionados para su uso en la práctica de la presente invención y que el uso del término PEG o poli(etilenglicol) pretende ser inclusivo y no exclusivo a este respecto. El término “PEG” incluye poli(etilenglicol) en cualquiera de sus formas, que incluye alcoxi-PEG, PEG difuncional, PEG de varios brazos, PEG bifurcado, PEG ramificado, PEG lateral (es decir, PEG o polímeros relacionados que tienen uno o más grupos funcionales laterales con respecto al esqueleto de polímero), o PEG con enlaces degradables en él.
- 25 El esqueleto de polímero puede ser lineal o ramificado. Esqueletos de polímero ramificados son generalmente conocidos en la técnica. Normalmente, un polímero ramificado tiene un resto de núcleo de rama central y una pluralidad de cadenas de polímero lineal enlazadas al núcleo de rama central. Se usa PEG comúnmente en formas ramificadas que pueden prepararse mediante la adición de óxido de etileno a diversos polioles, tales como glicerol, pentaeritritol y sorbitol. El resto de rama central también puede derivarse de varios aminoácidos, tales como lisina. El poli(etilenglicol) ramificado puede representarse en la forma general como R(-PEG-OH)_m en la que R representa el resto de núcleo, tal como glicerol o pentaeritritol, y m representa el número de brazos. También pueden usarse moléculas de PEG de múltiples brazos, tales como aquellas descritas en la patente de EE.UU. nº 5.932.462, como el esqueleto de polímero.
- 30 Muchos otros polímeros también son adecuados para la invención. Esqueletos de polímero que son no peptídicos y solubles en agua, con de 2 a aproximadamente 300 extremos, son particularmente útiles en la invención. Ejemplos de polímeros adecuados incluyen, pero no se limitan a, otros poli(alquilenglicoles), tales como poli(propilenglicol) (“PPG”), copolímeros de etilenglicol y propilenglicol y similares, poli(poliol oxietilado), poli(alcohol olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxipropilmetacrilamida), poli(α-hidroxiácido), poli(alcohol vinílico), polifosfaceno, polioxazolina, poli(N-acrilolmorfolina), tal como se describen en la patente de EE.UU. Nº 5.629.384 y copolímeros, terpolímeros y mezclas de los mismos. Aunque el peso molecular de cada cadena del esqueleto de polímero puede variar, normalmente está en el intervalo de aproximadamente 100 Da a aproximadamente 100.000 Da, frecuentemente de aproximadamente 6.000 Da a aproximadamente 80.000 Da.
- 35 Una “disolución de alimentación” se refiere a cualquier disolución que contenga un compuesto que va a purificarse. Por ejemplo, puede usarse una mezcla de reacción como disolución de alimentación a partir de la que se purifica el producto de reacción deseado usando los métodos de la invención.
- 40 Si los grupos sustituyentes se especifican por sus fórmulas químicas convencionales, escritas de izquierda a derecha, igualmente engloban los sustituyentes químicamente idénticos, que resultarían de escribir la estructura de derecha a izquierda, por ejemplo, -CH₂O- pretende también indicar -OCH₂-.
- 45 El término “alquilo”, por sí mismo o como parte de otro sustituyente, significa, a menos que se establezca de otro modo, un radical de hidrocarburo de cadena lineal o ramificada, o cíclico (es decir, cicloalquilo), o combinación de los mismos, que puede estar completamente saturado, mono- o poliinsaturado, y puede incluir radicales divalentes (por ejemplo, alquileo) y multivalentes, que tiene el número de átomos de carbono designado (es decir, C₁-C₁₀ significa uno a diez carbonos). Ejemplos de radicales de hidrocarburo saturados incluyen, pero no se limitan a, grupos tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, t-butilo, isobutilo, sec-butilo, ciclohexilo, (ciclohexil)metilo, ciclopropilmetilo, homólogos e isómeros de, por ejemplo, n-pentilo, n-hexilo, n-heptilo, n-octilo y similares. Un grupo alquilo insaturado es uno que tiene uno o más dobles enlaces o triples enlaces. Ejemplos de grupos alquilo insaturado incluyen, pero no se limitan a, vinilo, 2-propenilo, crotilo, 2-isopentenilo, 2-(butadienilo),
- 50
- 55
- 60
- 65

2,4-pentadienilo, 3-(1,4-pentadienilo), etinilo, 1- y 3-propinilo, 3-butinilo, y los homólogos superiores e isómeros. El término "alquilo", a menos que se indique lo contrario, también pretende incluir aquellos derivados de alquilo definidos más abajo en más detalle, tales como "heteroalquilo". Grupos alquilo que están limitados a grupos de hidrocarburo se llaman "homoalquilo".

El término "alquileo", por sí mismo o como parte de otro sustituyente, significa un radical divalente derivado de un alcano, como se ejemplifica, pero no se limita, por $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, e incluye adicionalmente aquellos grupos descritos más adelante como "heteroalquileo". Normalmente, un grupo alquilo (o alquileo) tendrá de 1 a 24 átomos de carbono, siendo aquellos grupos que tienen 10 o menos átomos de carbono preferidos en la presente invención. Un "alquilo inferior" o "alquileo inferior" es un grupo alquilo o alquileo de cadena más corta, que generalmente tiene ocho o menos átomos de carbono.

Los términos "alcoxi", "alquilamino" y "alquiltio" (o tialcoxi) se usan en su sentido convencional, y se refieren a aquellos grupos alquilo unidos al resto de la molécula mediante un átomo de oxígeno, un grupo amino, o un átomo de azufre, respectivamente.

El término "heteroalquilo", por sí mismo o en combinación con otro término, significa, a menos que se establezca de otro modo, un radical de hidrocarburo estable de cadena lineal o ramificada, o cíclico, o combinaciones de los mismos, que consiste en el número establecido de átomos de carbono y al menos un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste en O, N, Si y S, y en el que los átomos de nitrógeno y de azufre pueden oxidarse opcionalmente y el heteroátomo de nitrógeno puede opcionalmente cuaternizarse. El (Los) heteroátomo(s) O, N y S y Si pueden disponerse en cualquier posición interior del grupo heteroalquilo o en la posición en la que el grupo alquilo está unida al resto de la molécula. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_3$, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{O}-\text{CH}_3$, $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{N}-\text{OCH}_3$ y $-\text{CH}=\text{CH}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$. Hasta dos heteroátomos pueden ser consecutivos, tales como, por ejemplo, $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{OCH}_3$ y $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$. Similarmente, el término "heteroalquileo", por sí mismo o como parte de otro sustituyente, significa un radical divalente derivado de heteroalquilo, como se ejemplifica, pero no se limita, por $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ y $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-$. Para grupos heteroalquileo, los heteroátomos también pueden ocupar cualquiera o ambos de los extremos de cadena (por ejemplo, alquilenoxi, alquilenodioxi, alquilenamino, alquilendiamino y similares). Todavía además, para grupos de enlace de alquileo y heteroalquileo, no se implica orientación del grupo de enlace por la dirección en la que se escribe la fórmula del grupo de enlace. Por ejemplo, la fórmula $-\text{CO}_2\text{R}'$ representa tanto $-\text{C}(\text{O})\text{OR}'$ como $-\text{OC}(\text{O})\text{R}'$.

Los términos "cicloalquilo" y "heterocicloalquilo", por sí mismos o en combinación con otros términos, representan, a menos que se establezca de otro modo, versiones cíclicas de "alquilo" y "heteroalquilo", respectivamente. Adicionalmente, para heterocicloalquilo, un heteroátomo puede ocupar la posición en la que el heterociclo está unido al resto de la molécula. Ejemplos de cicloalquilo incluyen, pero no se limitan a, ciclopentilo, ciclohexilo, 1-ciclohexenilo, 3-ciclohexenilo, cicloheptilo y similares. Ejemplos de heterocicloalquilo incluyen, pero no se limitan a, 1-(1,2,5,6-tetrahidropiridilo), 1-piperidinilo, 2-piperidinilo, 3-piperidinilo, 4-morfolinilo, 3-morfolinilo, tetrahidrofuran-2-ilo, tetrahidrofuran-3-ilo, tetrahidrotien-2-ilo, tetrahidrotien-3-ilo, 1-piperazinilo, 2-piperazinilo y similares.

Los términos "halo" o "halógeno", por sí mismos o como parte de otro sustituyente, significan, a menos que se establezca de otro modo, un átomo de flúor, cloro, bromo o de yodo. Adicionalmente, términos tales como "haloalquilo" se indican para incluir monohaloalquilo y polihaloalquilo. Por ejemplo, el término "haloalquilo (C₁-C₄)" pretende incluir, pero no se limita a, trifluorometilo, 2,2,2-trifluoroetilo, 4-clorobutilo, 3-bromopropilo y similares.

El término "arilo" significa, a menos que se establezca de otro modo, un sustituyente poliinsaturado, aromático, que puede ser un único anillo o múltiples anillos (preferentemente de 1 a 3 anillos), que están condensados juntos o enlazados covalentemente. El término "heteroarilo" se refiere a grupos arilo (o anillos) que contienen de uno a cuatro heteroátomos seleccionados de N, O, S, Si y B, en los que los átomos de nitrógeno y de azufre están opcionalmente oxidados y el (los) átomo(s) de nitrógeno está(n) opcionalmente cuaternizados. Un grupo heteroarilo puede unirse al resto de la molécula mediante un heteroátomo. Ejemplos no limitantes de grupos arilo y heteroarilo incluyen fenilo, 1-naftilo, 2-naftilo, 4-bifenilo, 1-pirrolilo, 2-pirrolilo, 3-pirrolilo, 3-pirazolilo, 2-imidazolilo, 4-imidazolilo, pirazinilo, 2-oxazolilo, 4-oxazolilo, 2-fenil-4-oxazolilo, 5-oxazolilo, 3-isoxazolilo, 4-isoxazolilo, 5-isoxazolilo, 2-tiazolilo, 4-tiazolilo, 5-tiazolilo, 2-furilo, 3-furilo, 2-tienilo, 3-tienilo, 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 2-pirimidilo, 4-pirimidilo, 5-benzotiazolilo, purinilo, 2-bencimidazolilo, 5-indolilo, 1-isoquinolilo, 5-isoquinolilo, 2-quinoxalinilo, 5-quinoxalinilo, 3-quinolilo y 6-quinolilo. Sustituyentes para cada uno de los sistemas de anillos de arilo y heteroarilo anteriormente indicados están seleccionados del grupo de sustituyentes aceptables descritos a continuación.

Por brevedad, el término "arilo", cuando se usa en combinación con otros términos (por ejemplo, ariloxi, ariltioxi, arilalquilo), incluye tanto anillos de arilo como de heteroarilo, como se ha definido anteriormente. Así, el término "arilalquilo" pretende incluir aquellos radicales en los que un grupo arilo está unido a un grupo alquilo (por ejemplo, bencilo, fenetilo, piridilmetilo y similares) que incluye aquellos grupos alquilo en los que un átomo de carbono (por ejemplo, un grupo metileno) se ha sustituido con, por ejemplo, un átomo de oxígeno (por ejemplo, fenoximetilo, 2-piridiloximetilo, 3-(1-naftiloxi)propilo y similares).

Se indica que cada uno de los términos anteriores (por ejemplo, "alquilo", "heteroalquilo", "arilo" y "heteroarilo") incluye tanto formas sustituidas como sin sustituir del radical indicado, a menos que se indique lo contrario. Sustituyentes preferidos para cada tipo de radical se proporcionan a continuación.

5 Sustituyentes para los radicales alquilo y heteroalquilo (incluyendo aquellos grupos frecuentemente denominados alquilenos, alquilenos, heteroalquilenos, heteroalquilenos, alquilenos, cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalquilenos y heterocicloalquilenos) se denominan genéricamente "sustituyentes de grupo alquilo", y pueden ser uno o más de varios grupos seleccionados de, pero no se limitan a: arilo sustituido o sin sustituir, heteroarilo sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir, -OR', =O, =NR', =N-OR', -NR'R'', -SR', - halógeno, -SiR'R''R''', -
 10 OC(O)R', -C(O)R', -CO₂R', -CONR'R'', -OC(O)NR'R'', -NR''C(O)R', -NR'-C(O)NR''R''', -NR''C(O)₂R', -NR-C(NR'R''R''')=NR''', -NR-C(NR'R'')=NR''', -S(O)R', -S(O)₂R', -S(O)₂NR'R'', -NRSO₂R', -CN y -NO₂ en un número que oscila de cero a (2m'+1), en la que m' es el número total de átomos de carbono en tal radical. R', R'', R''' y R'''' se refieren cada uno preferentemente independientemente a hidrógeno, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, por ejemplo, arilo sustituido con 1-3 halógenos, grupos alquilo, alcoxi o tioalcoxi sustituidos o sin sustituir, o grupos arilalquilo. Cuando un compuesto de la invención incluye más de un grupo R, por ejemplo, cada uno de los grupos R está seleccionado independientemente, ya que son cada uno grupos R', R'', R''' y R'''' cuando más de uno de estos grupos está presente. Cuando R' y R'' están unidos al mismo átomo de nitrógeno, pueden combinarse con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 5, 6 o 7 miembros. Por ejemplo, se indica que -NR'R'' excluye, pero no se limita a, 1-pirrolidinilo y 4-morfolinilo. A partir de la discusión anterior de
 20 sustituyentes, un experto en la materia entenderá que el término "alquilo" pretende incluir grupos que incluyen átomos de carbono unidos a grupos distintos de grupos hidrógeno, tales como haloalquilo (por ejemplo, -CF₃ y -CH₂CF₃) y acilo (por ejemplo, -C(O)CH₃, -C(O)CF₃, -C(O)CH₂OCH₃ y similares).

Similar a los sustituyentes descritos para el radical alquilo, sustituyentes para los grupos arilo y heteroarilo se denominan genéricamente "sustituyentes de grupo arilo". Los sustituyentes están seleccionados de, por ejemplo: alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, heteroarilo sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir, -OR', =O, =NR', =N-OR', -NR'R'', -SR', -halógeno, -SiR'R''R''', -
 25 -OC(O)R', -C(O)R', -CO₂R', -CONR'R'', -OC(O)NR'R'', -NR''C(O)R', -NR'-C(O)NR''R''', -NR''C(O)₂R', -NR-C(NR'R''R''')=NR''', -NR-C(NR'R'')=NR''', -S(O)R', -S(O)₂R', -S(O)₂NR'R'', -NRSO₂R', -CN y -NO₂, -R', -N₃, -CH(Ph)₂, fluoroalcoxi (C₁-C₄) y fluoroalquilo (C₁-C₄), en un número que oscila de cero al número total de valencias abiertas en el sistema de anillos aromáticos; y en las que R', R'', R''' y R'''' se seleccionan preferentemente independientemente de hidrógeno, alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir y heteroarilo sustituido o sin sustituir. Cuando un compuesto de la invención incluye más de un grupo R, por ejemplo, cada uno de los grupos R está seleccionado independientemente ya que son cada uno grupos R', R'', R''' y R'''' cuando más de uno de estos grupos está presente.
 35

Dos de los sustituyentes sobre átomos adyacentes del anillo de arilo o heteroarilo pueden sustituirse opcionalmente con un sustituyente de fórmula -T-C(O)-(CRR')_q-U-, en la que T y U son independientemente -NR-, -O-, -CRR'- o un enlace sencillo, y q es un número entero de 0 a 3. Alternativamente, dos de los sustituyentes sobre átomos adyacentes del anillo de arilo o heteroarilo pueden sustituirse opcionalmente con un sustituyente de fórmula -A-(CH₂)_r-B-, en la que A y B son independientemente -CRR'-, -O-, -NR-, -S-, -S(O)-, -S(O)₂-, -S(O)₂NR'- o un enlace sencillo y r es un número entero de 1 a 4. Uno de los enlaces sencillos del nuevo anillo así formado puede sustituirse opcionalmente con un doble enlace. Alternativamente, dos de los sustituyentes sobre átomos adyacentes del anillo de arilo o heteroarilo pueden sustituirse opcionalmente con un sustituyente de fórmula -(CRR')_s-X-(CR''R''')_d-, en la que s y d son independientemente números enteros de 0 a 3 y X es -O-, -NR'-, -S-, -S(O)-, -S(O)₂- o -S(O)₂NR'-. Los sustituyentes R', R'', R''' y R'''' se seleccionan preferentemente independientemente de hidrógeno o alquilo (C₁-C₆) sustituido o sin sustituir.
 40

Como se usa en el presente documento, el término "heteroátomo" incluye oxígeno (O), nitrógeno (N), azufre (S), silicio (Si) y boro (B).
 50

El símbolo "R" es una abreviatura general que representa un grupo sustituyente. Grupos sustituyentes a modo de ejemplo incluyen grupos alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, heteroarilo sustituido o sin sustituir y heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir.
 55

Todos los oligosacáridos descritos en el presente documento se describen con el nombre o abreviatura para el sacárido no reductor (es decir, Gal), seguido de la configuración del enlace glucosídico (α o β), el enlace de anillo (1 o 2), la posición de anillo del sacárido reductor que participa en el enlace (2, 3, 4, 6 o 8) y a continuación el nombre o abreviatura del sacárido reductor (es decir, GlcNAc). Cada sacárido es preferentemente una piranosa. Para una revisión de nomenclatura de glucobiología estándar véase Essentials of Glycobiology Varki et al. eds. CSHL Press (1999).
 60

Se considera que los oligosacáridos tienen un extremo reductor y un extremo no reductor, tanto si el sacárido en el extremo reductor es o no de hecho un azúcar reductor. Según la nomenclatura aceptada, los oligosacáridos se representan en el presente documento con el extremo no reductor a la izquierda y el extremo reductor a la derecha.
 65

Como se usa en el presente documento, el término “azúcar modificado” se refiere a un hidrato de carbono que existe o que no existe de forma natural que se añade enzimáticamente sobre un aminoácido o un residuo de glucosilo de un péptido en un proceso de la invención. El azúcar modificado está seleccionado de varios sustratos enzimáticos que incluyen, pero no se limitan a, nucleótidos de azúcar (mono-, di- y trifosfatos), azúcares activados (por ejemplo, haluros de glucosilo, mesilatos de glucosilo) y azúcares que no están activados ni son nucleótidos. El “azúcar modificado” está covalentemente funcionalizado con un “grupo modificador”. Grupos modificadores útiles incluyen, pero no se limitan a, restos de PEG, restos terapéuticos, restos de diagnóstico, biomoléculas y similares. El grupo modificador es preferentemente un hidrato de carbono que no existe de forma natural, o sin modificar. El sitio de funcionalización con el grupo modificador está seleccionado de forma que no prevenga que el “azúcar modificado” se añada enzimáticamente a un péptido.

El término “glucoconjugación”, como se usa en el presente documento, se refiere a la conjugación enzimáticamente mediada de una especie de azúcar modificado con un aminoácido o residuo de glucosilo de un polipéptido, por ejemplo, un péptido de eritropoyetina preparado por el método de la presente invención. Un subgénero de la “glucoconjugación” es la “gluco-PEGilación”, en la que el grupo modificador del azúcar modificado es poli(etilenglicol), un derivado de alquilo (por ejemplo, m-PEG) o derivado reactivo (por ejemplo, H₂N-PEG, HOOC-PEG) del mismo.

Los términos “a gran escala” y “a escala industrial” se usan indistintamente y se refieren a un ciclo de reacción o proceso que produce al menos aproximadamente 250 mg, al menos aproximadamente 500 mg, al menos aproximadamente 1 gramo, al menos aproximadamente 2 gramos, al menos aproximadamente 5 g, al menos aproximadamente 10 g, al menos aproximadamente 20 g, al menos aproximadamente 30 g, al menos aproximadamente 50 o al menos aproximadamente 100 g de azúcar de nucleótido al completarse un único ciclo. En una realización, la invención proporciona procesos a gran escala, que son adecuados para preparar azúcares de nucleótido con un alto grado de pureza a escala de kilogramo (por ejemplo, al menos aproximadamente 1 kg, al menos aproximadamente 1,5 kg, al menos aproximadamente 2 kg, o al menos aproximadamente 3 kg de nucleótido de azúcar purificado por serie de síntesis/purificación).

El término “aislado” o “purificado”, cuando se refiere a un azúcar de nucleótido o azúcar de nucleótido modificado de la invención, significa que tal material está esencialmente libre de componentes, que se usan para producir el material. “Aislado”, “puro” o “purificado” se usan indistintamente. La pureza puede determinarse por cualquier método de análisis reconocido en la técnica (por ejemplo, intensidad de bandas sobre un gel teñido con plata, electroforesis en gel de poli(acrilamida), RMN, HPLC, ELISA, o un medio similar). En un ejemplo, la pureza se determina como la relación entre la cantidad de azúcar de nucleótido deseado y la cantidad total de otros componentes presentes en una muestra (peso/peso). Por ejemplo, la concentración del azúcar de nucleótido en la muestra puede determinarse usando cromatografía analítica (por ejemplo, HPLC, RP-HPLC) en combinación con un patrón de azúcar de nucleótido.

Normalmente, los azúcares de nucleótido aislados usando un método de la invención tienen un nivel de pureza expresado como un intervalo. El extremo inferior del intervalo de pureza para el nucleótido de azúcar es aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 75 % o aproximadamente el 80 % y el extremo superior del intervalo de pureza es aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 75 % aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 95 % o superior a aproximadamente el 95 %.

Cuando el azúcar de nucleótido es superior a aproximadamente el 90 % de pureza, su pureza también se expresa preferentemente como un intervalo. El extremo inferior del intervalo de pureza es aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 96 % o aproximadamente el 98 %. El extremo superior del intervalo de pureza es aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 98 % o aproximadamente el 100 % de pureza (peso/peso).

La “recuperación de azúcar de nucleótido”, “rendimiento” o “rendimiento de la reacción” normalmente se expresa como el intervalo entre la cantidad de azúcar de nucleótido recuperada después de una etapa de proceso particular (o serie de etapas) y la cantidad de azúcar de nucleótido que entró en la etapa de proceso. Por ejemplo, la recuperación de azúcar de nucleótido para un método de la invención es aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 80 % o aproximadamente el 90 %. En otro ejemplo, la recuperación de azúcar de nucleótido para un método de la invención es aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 98 % o superior a aproximadamente el 98 %.

El término “tampón de carga” se refiere al tampón en el que el péptido que se purifica se aplica a un dispositivo de purificación, por ejemplo, una columna de cromatografía o un cartucho de filtro. Normalmente, el tampón de carga está seleccionado de manera que pueda llevarse a cabo la separación del péptido de interés de impurezas no deseadas. Por ejemplo, cuando se purifica el péptido sobre una columna de hidroxipatita (HA) o fluoroapatita, el pH del tampón de carga y la concentración de sales en el tampón de carga pueden seleccionarse de manera que el péptido se retenga inicialmente sobre la columna mientras que ciertas impurezas se encuentran en el flujo a través.

El término “tampón de elución”, también llamado “tampón límite”, se refiere al tampón que normalmente se usa para eliminar (eluir) el péptido del dispositivo de purificación (por ejemplo, una columna cromatográfica o cartucho de filtro) al que se aplicó antes. Normalmente, el tampón de carga está seleccionado de manera que pueda llevarse a cabo la separación del péptido de interés de impurezas no deseadas. Frecuentemente, la concentración de una sal particular (por ejemplo, NaCl) en el tampón de elución varía durante el procedimiento de elución (gradiente). El gradiente puede ser continuo o escalonado.

El término “temperatura ambiente” se refiere a una temperatura de al menos aproximadamente 10 °C, al menos aproximadamente 15 °C, al menos aproximadamente 20 °C o al menos aproximadamente 25 °C. Normalmente, la temperatura ambiente es entre aproximadamente 20 °C y aproximadamente 25 °C.

III. Métodos

La presente invención proporciona métodos (por ejemplo, procesos a gran escala) para la producción de azúcares de nucleótido modificados con un grupo modificador polimérico (azúcar de nucleótido modificado), en los que el grupo modificador polimérico incluye al menos un resto polimérico seleccionado de restos de poli(óxido de alquileo). Poli(óxidos de alquileo) a modo de ejemplo incluyen restos de poli(etilenglicol) (PEG) y de poli(propilenglicol) (PPG).

En un ejemplo, la invención proporciona un método de preparación de una composición que incluye un azúcar de nucleótido modificado. En el azúcar de nucleótido modificado, el resto de azúcar está enlazado covalentemente a un grupo modificador polimérico, en el que el grupo modificador polimérico incluye al menos un resto de poli(óxido de alquileo) lineal o ramificado. Un método a modo de ejemplo incluye: (i) poner en contacto una mezcla de reacción que comprende el azúcar de nucleótido modificado con un medio de intercambio aniónico; (ii) eluir el azúcar de nucleótido modificado del medio de intercambio aniónico formando así una fracción de eluato que contiene el azúcar de nucleótido modificado; y (iii) desalar la fracción de eluato. Inesperadamente, los inventores han descubierto que el proceso de la invención produce azúcares de nucleótido modificados con alta pureza y alto rendimiento global, incluso cuando el proceso no incluye ultrafiltración antes de la cromatografía de intercambio aniónico y la mezcla de reacción se procesa primero por cromatografía de intercambio aniónico (por ejemplo, después de acondicionar la mezcla de reacción eliminando disolvente y partículas). Así, el método no incluye ultrafiltración (por ejemplo, TFF) antes de la cromatografía de intercambio aniónico, es decir, la etapa (i).

En una realización a modo de ejemplo, el método anterior pueden incluir adicionalmente: (iv) reducir el volumen de la mezcla de reacción. En un ejemplo, el volumen de la mezcla de reacción se reduce mediante evaporación (por ejemplo, a presión reducida) de al menos parte del disolvente (por ejemplo, mediante evaporación rotatoria). En un ejemplo, la mezcla de reacción incluye un disolvente orgánico (por ejemplo, THF), que se elimina esencialmente o se elimina parcialmente mediante evaporación a presión reducida. El método anterior puede incluir además (por ejemplo, después de reducir el volumen de la mezcla de reacción): (v) filtrar la mezcla de reacción (por ejemplo, con el fin de eliminar las partículas). En un ejemplo típico, la mezcla de reacción se filtra a través de un filtro de 0,22 µm. El término “filtrar” en este contexto no incluye “ultrafiltración”. Otros filtros adecuados útiles para el preacondicionamiento de la mezcla de reacción para la cromatografía de intercambio aniónico se describen en el presente documento. En un ejemplo particular, el volumen de la mezcla de reacción se reduce primero y la mezcla resultante se somete a filtración antes de poner en contacto el filtrado con el medio de intercambio aniónico.

En un ejemplo, según cualquiera de las realizaciones anteriores, el método puede incluir adicionalmente, por ejemplo, después de la etapa (iii): (v) eliminar agua de la fracción de eluato. En un ejemplo, el agua se elimina sometiendo la fracción de eluato a liofilización o secado por pulverización. Normalmente, estos procedimientos producen un producto esencialmente seco, en el que el contenido de agua residual es, por ejemplo, menos de aproximadamente el 10 % (peso/peso), menos de aproximadamente el 5 % (peso/peso), menos de aproximadamente el 4 % (peso/peso), menos de aproximadamente el 3 % (peso/peso), menos de aproximadamente el 2 % (peso/peso) o menos de aproximadamente el 1 % (peso/peso).

En un ejemplo particular, la invención proporciona un método de preparación de una composición que incluye un azúcar de nucleótido modificado, en el que un grupo modificador polimérico está enlazado covalentemente al azúcar de nucleótido. En un ejemplo, el grupo modificador polimérico incluye al menos un resto de poli(óxido de alquileo) lineal o ramificado. El método incluye: (i) poner en contacto un derivado de azúcar de nucleótido que incluye un grupo amino primario, con un resto de poli(óxido de alquileo) activado que incorpora un resto de carbonato de *p*-nitrofenilo en condiciones suficientes para formar un enlace covalente entre el grupo amino del derivado de azúcar de nucleótido y el resto de poli(óxido de alquileo). La puesta en contacto se produce en presencia de un disolvente acuoso que tiene un pH entre aproximadamente 8,0 y aproximadamente 8,8. Por tanto, se forma una mezcla de reacción, que incluye el azúcar de nucleótido modificado. El método puede incluir adicionalmente: (ii) poner en contacto la mezcla de reacción con un medio de intercambio aniónico y (iii) eluir el azúcar de nucleótido modificado del medio de intercambio aniónico formando una fracción de eluato que contiene el azúcar de nucleótido modificado. El método puede incluir adicionalmente: (iv) desalar la fracción de eluato usando filtración en membrana; y (v) eliminar agua de la fracción de eluato (por ejemplo, mediante liofilización o secado por pulverización, opcionalmente en presencia de un aditivo). El método no incluye ultrafiltración antes de la etapa (i).

Grupos modificadores poliméricos a modo de ejemplo útiles en cualquiera de las realizaciones anteriores se desvelan en el presente documento a continuación. En un ejemplo, el grupo modificador polimérico incluye al menos un resto polimérico seleccionado de restos de poli(óxido de alquileno). Poli(óxidos de alquileno) a modo de ejemplo incluyen poli(etilenglicol) (PEG) y poli(propilenglicol) (PPG). En un ejemplo, el grupo modificador de PEG tiene un peso molecular entre aproximadamente 5 kDa y aproximadamente 600 kDa, entre aproximadamente 5 kDa y aproximadamente 500 kDa, entre aproximadamente 5 kDa y aproximadamente 400 kDa, entre aproximadamente 10 kDa y aproximadamente 400 kDa, entre aproximadamente 10 kDa y aproximadamente 300 kDa, entre aproximadamente 10 kDa y aproximadamente 200 kDa o entre aproximadamente 10 kDa y aproximadamente 100 kDa. En un ejemplo particular, el resto de PEG tiene un peso molecular entre aproximadamente 10 kDa y aproximadamente 80 kDa, entre aproximadamente 10 kDa y aproximadamente 60 kDa, o entre aproximadamente 10 kDa y aproximadamente 40 kDa. En un ejemplo, el grupo modificador polimérico está ramificado e incluye un esqueleto de glicerol enlazado covalentemente a al menos dos restos poliméricos (por ejemplo, dos restos de PEG).

Azúcar de nucleótido

El azúcar de nucleótido o azúcar de nucleótido modificado según cualquiera de las realizaciones anteriores incluye un resto de nucleósido enlazado covalentemente a un resto de fosfato (seleccionado de restos de monofosfato, difosfato, trifosfato y polifosfato) y un resto de azúcar adicional enlazado covalentemente al resto de fosfato. El resto de nucleósido del azúcar de nucleótido puede ser cualquier nucleósido o desoxinucleósido, que incluye adenosina, guanosina, 5-metiluridina, uridina, citidina, desoxiadenosina, desoxiguanosina, desoxitimidina, desoxiuridina y desoxicitidina. Restos de nucleósido adicionales se describen en el presente documento. Los métodos de la invención son útiles para producir azúcares de nucleótido, en los que el nucleótido está en diversos estados de fosforilación. Por consiguiente, nucleótidos a modo de ejemplo del azúcar de nucleótido incluyen CMP, CDP, CTP, AMP, cAMP, ADP, ATP, UMP, UDP, UTP, GMP, cGMP, GDP, GTP, TMP, TDP y TTP, además de las formas desoxi de estos y otros nucleótidos, que incluyen nucleótidos modificados.

El resto de azúcar del azúcar de nucleótido puede ser cualquier resto de glucosilo que incluye mono- y oligosacáridos. Restos de azúcar a modo de ejemplo incluyen ácido siálico, glucosa, GlcNAc, manosa, fucosa, galactosa, GalNAc y combinaciones de los mismos. El término "resto de glucosilo" o "resto de azúcar" incluye "restos miméticos de glucosilo".

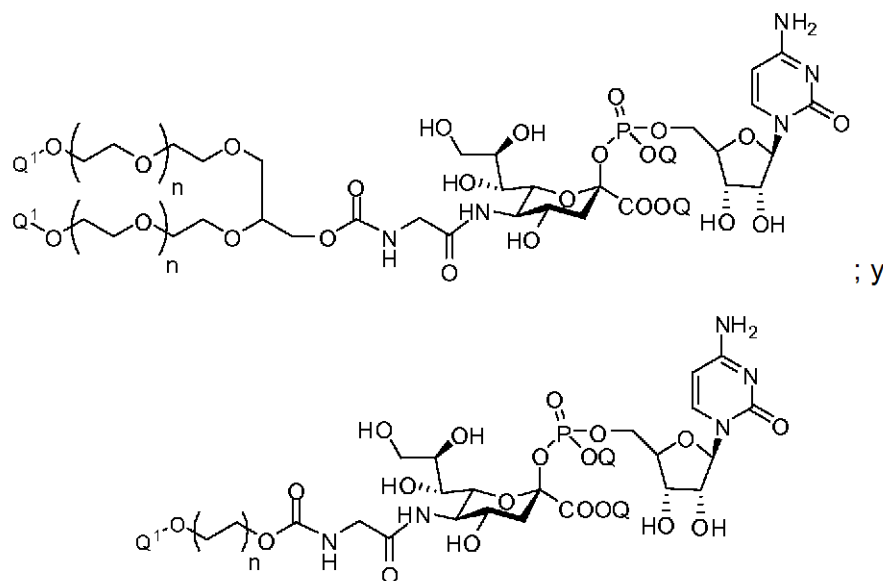
Azúcares de nucleótido a modo de ejemplo incluyen CMP-SA, CDP-SA, CTP-SA, AMP-SA, cAMP-SA, ADP-SA, ATP-SA, UMP-SA, UDP-SA, UTP-SA, GMP-SA, cGMP-SA, GDP-SA, GTP-SA, TMP-SA, TDP-SA y TTP-SA, CMP-GlcNAc, CDP-GlcNAc, CTP-GlcNAc, AMP-GlcNAc, cAMP-GlcNAc, ADP-GlcNAc, ATP-GlcNAc, UMP-GlcNAc, UDP-GlcNAc, UTP-GlcNAc, GMP-GlcNAc, cGMP-GlcNAc, GDP-GlcNAc, GTP-GlcNAc, TMP-GlcNAc, TDP-GlcNAc y TTP-GlcNAc, CMP-Gal, CDP-Gal, CTP-Gal, AMP-Gal, cAMP-Gal, ADP-Gal, ATP-Gal, UMP-Gal, UDP-Gal, UTP-Gal, GMP-Gal, cGMP-Gal, GDP-Gal, GTP-Gal, TMP-Gal, TDP-Gal y TTP-Gal, CMP-GalNAc, CDP-GalNAc, CTP-GalNAc, AMP-GalNAc, cAMP-GalNAc, ADP-GalNAc, ATP-GalNAc, UMP-GalNAc, UDP-GalNAc, UTP-GalNAc, GMP-GalNAc, cGMP-GalNAc, GDP-GalNAc, GTP-GalNAc, TMP-GalNAc, TDP-GalNAc y TTP-GalNAc, CMP-Glc, CDP-Glc, CTP-Glc, AMP-Glc, cAMP-Glc, ADP-Glc, ATP-Glc, UMP-Glc, UDP-Glc, UTP-Glc, GMP-Glc, cGMP-Glc, GDP-Glc, GTP-Glc, TMP-Glc, TDP-Glc y TTP-Glc, CMP-fucosa, CDP-fucosa, CTP-fucosa, AMP-fucosa, cAMP-fucosa, ADP-fucosa, ATP-fucosa, UMP-fucosa, UDP-fucosa, UTP-fucosa, GMP-fucosa, cGMP-fucosa, GDP-fucosa, GTP-fucosa, TMP-fucosa, TDP-fucosa y TTP-fucosa, CMP-Man, CDP-Man, CTP-Man, AMP-Man, cAMP-Man, ADP-Man, ATP-Man, UMP-Man, UDP-Man, UTP-Man, GMP-Man, cGMP-Man, GDP-Man, GTP-Man, TMP-Man, TDP-Man y TTP-Man y variantes desoxi de los mismos. Cualquiera de los azúcares de nucleótido anterior puede ser parte de un azúcar de nucleótido modificado producido por un método de la invención. En una realización preferida, el grupo modificador polimérico (por ejemplo, resto de PEG lineal o ramificado) en estos azúcares de nucleótido modificados está covalentemente unido al resto de azúcar del azúcar de nucleótido, opcionalmente mediante un resto conector.

Azúcares de nucleótido modificados a modo de ejemplo que pueden producirse usando los métodos de la invención incluyen CMP-SA-PEG, CDP-SA-PEG, CTP-SA-PEG, AMP-SA-PEG, cAMP-SA-PEG, ADP-SA-PEG, ATP-SA-PEG, UMP-SA-PEG, UDP-SA-PEG, UTP-SA-PEG, GMP-SA-PEG, cGMP-SA-PEG, GDP-SA-PEG, GTP-SA-PEG, TMP-SA-PEG, TDP-SA-PEG y TTP-SA-PEG, CMP-GlcNAc-PEG, CDP-GlcNAc-PEG, CTP-GlcNAc-PEG, AMP-GlcNAc-PEG, cAMP-GlcNAc-PEG, ADP-GlcNAc-PEG, ATP-GlcNAc-PEG, UMP-GlcNAc-PEG, UDP-GlcNAc-PEG, UTP-GlcNAc-PEG, GMP-GlcNAc-PEG, cGMP-GlcNAc-PEG, GDP-GlcNAc-PEG, GTP-GlcNAc-PEG, TMP-GlcNAc-PEG, TDP-GlcNAc-PEG y TTP-GlcNAc-PEG, CMP-Gal-PEG, CDP-Gal-PEG, CTP-Gal-PEG, AMP-Gal-PEG, cAMP-Gal-PEG, ADP-Gal-PEG, ATP-Gal-PEG, UMP-Gal-PEG, UDP-Gal-PEG, UTP-Gal-PEG, GMP-Gal-PEG, cGMP-Gal-PEG, GDP-Gal-PEG, GTP-Gal-PEG, TMP-Gal-PEG, TDP-Gal-PEG y TTP-Gal-PEG, CMP-GalNAc-PEG, CDP-GalNAc-PEG, CTP-GalNAc-PEG, AMP-GalNAc-PEG, cAMP-GalNAc-PEG, ADP-GalNAc-PEG, ATP-GalNAc-PEG, UMP-GalNAc-PEG, UDP-GalNAc-PEG, UTP-GalNAc-PEG, GMP-GalNAc-PEG, cGMP-GalNAc-PEG, GDP-GalNAc-PEG, GTP-GalNAc-PEG, TMP-GalNAc-PEG, TDP-GalNAc-PEG y TTP-GalNAc-PEG, CMP-Glc-PEG, CDP-Glc-PEG, CTP-Glc-PEG, AMP-Glc-PEG, cAMP-Glc-PEG, ADP-Glc-PEG, ATP-Glc-PEG, UMP-Glc-PEG, UDP-Glc-PEG, UTP-Glc-PEG, GMP-Glc-PEG, cGMP-Glc-PEG, GDP-Glc-PEG, GTP-Glc-PEG, TMP-Glc-PEG, TDP-Glc-PEG y TTP-Glc-PEG, CMP-fucosa-PEG, CDP-fucosa-PEG, CTP-fucosa-PEG, AMP-fucosa-PEG, cAMP-fucosa-PEG, ADP-fucosa-PEG, ATP-fucosa-PEG, UMP-fucosa-PEG, UDP-fucosa-PEG, UTP-fucosa-PEG, GMP-fucosa-PEG, cGMP-fucosa-PEG, GDP-fucosa-PEG, GTP-fucosa-PEG, TMP-fucosa-PEG, TDP-fucosa-PEG y TTP-fucosa-PEG, CMP-

Man-PEG, CDP-Man-PEG, CTP-Man-PEG, AMP-Man-PEG, cAMP-Man-PEG, ADP-Man-PEG, ATP-Man-PEG, UMP-Man-PEG, UDP-Man-PEG, UTP-Man-PEG, GMP-Man-PEG, cGMP-Man-PEG, GDP-Man-PEG, GTP-Man-PEG, TMP-Man-PEG, TDP-Man-PEG y TTP-Man-PEG y variantes desoxi de los mismos. Cualquiera de los restos de PE anteriores puede sustituirse con otro resto polimérico, tal como un resto de PPG.

5 En un ejemplo, el nucleótido de azúcar o nucleótido de azúcar modificado de la invención incluye citidina como nucleósido y ácido siálico como resto de azúcar. En un ejemplo particular, el nucleótido de azúcar o azúcar de nucleótido modificado incluye ácido citidina-monofosfo-siálico (CMP-SA). En otro ejemplo, el azúcar de nucleótido es CMP-SA. En otro ejemplo, el azúcar de nucleótido modificado es CMP-SA enlazado covalentemente con un resto de PEG lineal o ramificado (CMP-SA-PEG).

10 En un ejemplo, el azúcar de nucleótido según cualquiera de las realizaciones anteriores es un miembro seleccionado de:



15 en las que cada n es un número entero independientemente seleccionado de 1 a 2500. En un ejemplo, n está seleccionado de aproximadamente 100 a aproximadamente 1000, de aproximadamente 100 a aproximadamente 800, de aproximadamente 100 a aproximadamente 600, de aproximadamente 100 a aproximadamente 500. Cada Q es un miembro independientemente seleccionado de H, una carga negativa y un contraión salino (por ejemplo, Na, K). Cada Q^1 es un miembro independientemente seleccionado de H y alquilo C_{1-6} , tal como metilo, etilo, propilo (por ejemplo, *n*-propilo, *iso*-propilo), butilo (por ejemplo, *n*-butilo, *iso*-butilo), pentilo y hexilo.

20 En una realización a modo de ejemplo, según cualquiera de los métodos anteriores, el medio de intercambio aniónico está seleccionado de una resina de amonio cuaternario y una resina de dietilaminoetil (DEAE). En otro ejemplo, el medio de intercambio aniónico es una resina Sepharose (por ejemplo, Q-Sepharose). Medios de intercambio aniónico adicionales se describen en el presente documento, cada uno de los cuales es igualmente útil en los métodos de la invención. En un ejemplo, el medio de intercambio aniónico es una resina de amonio cuaternario, que incluye iones bicarbonato como contraiones. Por ejemplo, la resina de amonio cuaternario se trata con un tampón bicarbonato (por ejemplo, $NaHCO_3$) antes de uso.

25 En otro ejemplo, el azúcar de nucleótido se eluye del medio de intercambio aniónico usando un tampón bicarbonato. Por ejemplo, el azúcar de nucleótido se eluye usando un protocolo de elución escalonado o un gradiente, en el que la concentración de bicarbonato en el tampón de elución aumenta de bicarbonato aproximadamente 0 mM a aproximadamente 1 M (por ejemplo, $NaHCO_3$). Normalmente, el PEG-azúcar de nucleótido modificado (por ejemplo, CMP-SA-PEG) eluye próximo al azúcar modificado correspondiente (por ejemplo, SA-PEG), que es un producto secundario frecuente de la reacción de acoplamiento usada para formar el azúcar de nucleótido modificado. Inesperadamente, los inventores han descubierto que el azúcar de nucleótido puede separarse del azúcar modificado correspondiente usando bajas concentraciones de bicarbonato o gradientes lentos que implican entre aproximadamente 0,01 mM y aproximadamente 30 mM de bicarbonato. Así, en un ejemplo, el azúcar de nucleótido se eluye del medio de intercambio aniónico usando un tampón bicarbonato que incluye concentraciones de bicarbonato entre aproximadamente 0,01 mM y aproximadamente 50 mM, entre aproximadamente 0,01 mM y aproximadamente 30 mM, entre aproximadamente 0,01 mM y aproximadamente 20 mM o entre aproximadamente 0,01 mM y aproximadamente 10 mM. Otros contaminantes de la mezcla de reacción (por ejemplo, nucleósidos, azúcares de nucleótido no modificados) normalmente eluyen a concentraciones de bicarbonato superiores a

aproximadamente 30 o 50 mM.

En otra realización a modo de ejemplo, la mezcla de reacción (disolución de alimentación de intercambio aniónico), que se carga sobre la columna de intercambio aniónico (es decir, se pone en contacto con el medio de intercambio aniónico) tiene una conductividad salina inferior a aproximadamente 10 mS/cm, inferior a aproximadamente 8 mS/cm, inferior a aproximadamente 6 mS/cm, inferior a aproximadamente 5 mS/cm, inferior a aproximadamente 4 mS/cm, inferior a aproximadamente 3 mS/cm o inferior a aproximadamente 2 mS/cm. En un ejemplo, la mezcla de reacción, que se carga sobre la columna de intercambio aniónico, tiene una conductividad salina inferior a aproximadamente 1 mS/cm, inferior a aproximadamente 0,8, 0,6, 0,4 o 0,2 mS/cm. La conductividad salina de la mezcla de reacción puede ajustarse antes de la cromatografía de intercambio aniónico, por ejemplo, diluyendo la mezcla de reacción con agua.

En un ejemplo según cualquiera de las realizaciones anteriores, la desalación de la etapa (iii) se lleva a cabo usando filtración en membrana, tal como ultrafiltración. Por ejemplo, la desalación se lleva a cabo usando filtración de flujo tangencial (TFF). Se conocen en la técnica membranas de ultrafiltración útiles para la desalación. Membranas a modo de ejemplo se describen en el presente documento. En un ejemplo, la membrana de ultrafiltración tiene un MWCO que es más pequeño que el peso molecular del azúcar de nucleótido. Por tanto, el azúcar de nucleótido es retenido por la membrana mientras que los iones salinos pueden pasar a través del filtro de membrana. Por ejemplo, la membrana de ultrafiltración usada para la desalación de una disolución de azúcar de nucleótido tiene un corte de peso molecular inferior a aproximadamente 100 kDa, inferior a aproximadamente 80 kDa, inferior a aproximadamente 60 kDa, inferior a aproximadamente 40 kDa o inferior a aproximadamente 20 kDa. En un ejemplo particular, la membrana de ultrafiltración tiene un corte de peso molecular que es inferior a aproximadamente 10 kDa. Las membranas de ultrafiltración usadas para desalar los CMP-SA-PEG con restos de PEG entre aproximadamente 10 kDa y 60 kDa, normalmente tienen un corte de peso molecular entre aproximadamente 1 kDa y aproximadamente 5 kDa.

En un ejemplo, la etapa de desalación anterior (por ejemplo, que implica filtración en membrana, tal como ultrafiltración) produce conductividad salina reducida de la disolución de azúcar de nucleótido (por ejemplo, la fracción de eluato) en comparación con la conductividad salina antes de la filtración en membrana. Por ejemplo, la conductividad salina reducida de la fracción de eluato después de la filtración en membrana es entre aproximadamente 1 μ S/cm y aproximadamente 1000 μ S/cm. En un ejemplo particular, la conductividad salina de la fracción de eluato después de la filtración en membrana es entre aproximadamente 1 μ S/cm y aproximadamente 600 μ S/cm, entre aproximadamente 1 μ S/cm y aproximadamente 400 μ S/cm, entre aproximadamente 1 μ S/cm y aproximadamente 200 μ S/cm, entre aproximadamente 10 μ S/cm y aproximadamente 100 μ S/cm, entre aproximadamente 10 μ S/cm y aproximadamente 80 μ S/cm, entre aproximadamente 10 μ S/cm y aproximadamente 60 μ S/cm, entre aproximadamente 10 μ S/cm y aproximadamente 40 μ S/cm, entre aproximadamente 10 μ S/cm y aproximadamente 20 μ S/cm o entre aproximadamente 1 μ S/cm y aproximadamente 10 μ S/cm. En un ejemplo preferido, la conductividad salina durante la filtración en membrana se reduce a menos de aproximadamente 400 μ S/cm, menos de aproximadamente 300 μ S/cm, menos de aproximadamente 200 μ S/cm, menos de aproximadamente 100 μ S/cm, menos de aproximadamente 80 μ S/cm, menos de aproximadamente 60 μ S/cm, menos de aproximadamente 50 μ S/cm, menos de aproximadamente 40 μ S/cm, menos de aproximadamente 30 μ S/cm, menos de aproximadamente 20 μ S/cm, menos de aproximadamente 10 μ S/cm, menos de aproximadamente 8 μ S/cm, menos de aproximadamente 6 μ S/cm, menos de aproximadamente 4 μ S/cm, menos de aproximadamente 2 μ S/cm o menos de aproximadamente 1 μ S/cm.

En un ejemplo, se usa ultrafiltración (por ejemplo, TFF) para reducir el volumen final de la fracción de eluato o una disolución de azúcar de nucleótido modificado purificado.

En un ejemplo particular, la presente invención proporciona procesos para la producción de nucleótidos de citidina-monofosfato-ácido siálico (CMP-SA) modificados. Azúcares de nucleótido modificados a modo de ejemplo, que pueden producirse usando los métodos de la invención, incluyen CMP-SA-PEG-10 kDa, CMP-SA-PEG-20 kDa y CMP-SA-glicerol-PEG-40 kDa. Azúcares de nucleótido modificados a modo de ejemplo (CMP-SA-PEG) se muestran en la Figura 2.

En un ejemplo según cualquiera de las realizaciones anteriores, el azúcar de nucleótido producido por el método de la invención (por ejemplo, CMP-SA-PEG) tiene una pureza de al menos aproximadamente el 50 % (peso/peso), al menos aproximadamente el 60 % (peso/peso), al menos aproximadamente el 70 % (peso/peso), al menos aproximadamente el 80 % (peso/peso), al menos aproximadamente el 85 % (peso/peso), al menos aproximadamente el 90 % (peso/peso) o al menos aproximadamente el 95 % (peso/peso). En un ejemplo particular, el azúcar de nucleótido producido por un método de la invención tiene una pureza entre aproximadamente el 50 % y aproximadamente el 100 % (peso/peso), entre aproximadamente el 60 % y aproximadamente el 100 % (peso/peso), entre aproximadamente el 80 % y aproximadamente el 100 % (peso/peso) o entre aproximadamente el 90 % y aproximadamente el 100 % (peso/peso). En otro ejemplo, el azúcar de nucleótido producido por un método de la invención tiene una pureza entre aproximadamente el 96 % y aproximadamente el 100 % (peso/peso), entre aproximadamente el 97 % y aproximadamente el 100 % (peso/peso), entre aproximadamente el 98 % y aproximadamente el 100 % (peso/peso) o entre aproximadamente el 99 % y aproximadamente el 100 %

(peso/peso).

En una realización, el proceso de la invención se utiliza para purificar el azúcar de nucleótido de otros componentes de reacción. En el caso de CMP-SA-PEG, la mezcla de reacción puede contener, por ejemplo, mPEG-OH y *p*-nitrofenol (PNP), por ejemplo, formados durante la hidrólisis de mPEG-carbonato de *p*-nitrofenilo. La mezcla de reacción puede incluir adicionalmente CMP, por ejemplo, formado mediante hidrólisis de CMP-SA-glicina y/o CMP-SA-PEG. La mezcla de reacción puede incluir adicionalmente SA-PEG, por ejemplo, formado mediante hidrólisis de CMP-SA-PEG, además de sales (Figura 3).

En una realización, el método de la invención proporciona un producto de CMP-SA-PEG que incluye menos de aproximadamente el 10 %, menos de aproximadamente el 5 %, menos de aproximadamente el 4 %, menos de aproximadamente el 3 %, menos de aproximadamente el 2 % o menos de aproximadamente el 1 % de CMP (peso/peso) en comparación con CMP-SA-PEG. En otra realización, el método de la invención proporciona un CMP-SA-PEG que incluye menos de aproximadamente el 0,9 %, menos de aproximadamente el 0,8 %, menos de aproximadamente el 0,7 %, menos de aproximadamente el 0,6 %, menos de aproximadamente el 0,5 %, menos de aproximadamente el 0,4 %, menos de aproximadamente el 0,3 % o menos de aproximadamente el 0,2 % de CMP (peso/peso) en comparación con CMP-SA-PEG.

En otra realización, el método de la invención proporciona un producto de CMP-SA-PEG que incluye menos de aproximadamente el 10 %, menos de aproximadamente el 5 %, menos de aproximadamente el 4 %, menos de aproximadamente el 3 %, menos de aproximadamente el 2 % o menos de aproximadamente el 1 % de SA-PEG (peso/peso) en comparación con CMP-SA-PEG. En otra realización, el método de la invención proporciona un CMP-SA-PEG que incluye menos de aproximadamente el 0,9 %, menos de aproximadamente el 0,8 %, menos de aproximadamente el 0,7 %, menos de aproximadamente el 0,6 %, menos de aproximadamente el 0,5 %, menos de aproximadamente el 0,4 %, menos de aproximadamente el 0,3 % o menos de aproximadamente el 0,2 % de SA-PEG (peso/peso) en comparación con CMP-SA-PEG.

En otra realización, el método de la invención proporciona un producto de CMP-SA-PEG que incluye menos de aproximadamente el 10 %, menos de aproximadamente el 5 %, menos de aproximadamente el 4 %, menos de aproximadamente el 3 %, menos de aproximadamente el 2 % o menos de aproximadamente el 1 % de mPEG-OH (peso/peso) en comparación con CMP-SA-PEG. En otra realización, el método de la invención proporciona un CMP-SA-PEG que incluye menos de aproximadamente el 0,9 %, menos de aproximadamente el 0,8 %, menos de aproximadamente el 0,7 %, menos de aproximadamente el 0,6 %, menos de aproximadamente el 0,5 %, menos de aproximadamente el 0,4 %, menos de aproximadamente el 0,3 % o menos de aproximadamente el 0,2 % de mPEG-OH (peso/peso) en comparación con CMP-SA-PEG.

En otra realización, el método de la invención proporciona un producto de CMP-SA-PEG que incluye menos de aproximadamente el 10 %, menos de aproximadamente el 5 %, menos de aproximadamente el 4 %, menos de aproximadamente el 3 %, menos de aproximadamente el 2 % o menos de aproximadamente el 1 % de *p*-nitrofenol (peso/peso) en comparación con CMP-SA-PEG. En otra realización, el método de la invención proporciona un CMP-SA-PEG que incluye menos de aproximadamente el 0,9 %, menos de aproximadamente el 0,8 %, menos de aproximadamente el 0,7 %, menos de aproximadamente el 0,6 %, menos de aproximadamente el 0,5 %, menos de aproximadamente el 0,4 %, menos de aproximadamente el 0,3 % o menos de aproximadamente el 0,2 % de *p*-nitrofenol (peso/peso) en comparación con CMP-SA-PEG.

En otra realización, el método de la invención proporciona un producto de CMP-SA-PEG que incluye menos de aproximadamente el 10 %, menos de aproximadamente el 5 %, menos de aproximadamente el 4 %, menos de aproximadamente el 3 %, menos de aproximadamente el 2 % o menos de aproximadamente el 1 % de *p*-nitrofenol (peso/peso) en comparación con CMP-SA-PEG. En otra realización, el método de la invención proporciona un CMP-SA-PEG que incluye menos de aproximadamente el 0,9 %, menos de aproximadamente el 0,8 %, menos de aproximadamente el 0,7 %, menos de aproximadamente el 0,6 %, menos de aproximadamente el 0,5 %, menos de aproximadamente el 0,4 %, menos de aproximadamente el 0,3 % o menos de aproximadamente el 0,2 % de *p*-nitrofenol (peso/peso) en comparación con CMP-SA-PEG.

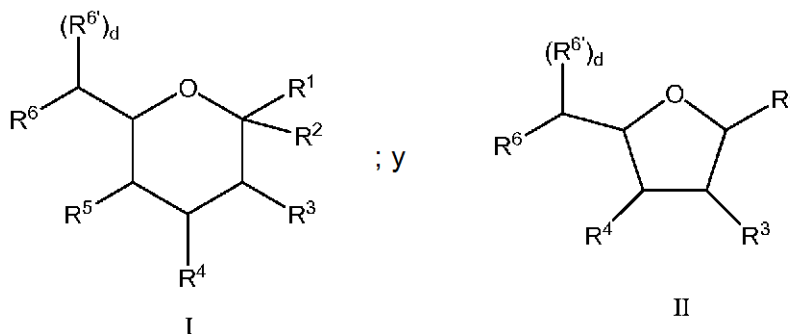
En otro ejemplo según cualquiera de las realizaciones anteriores, el azúcar de nucleótido producido por el método de la invención se obtiene con un rendimiento global de al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 90 % o al menos aproximadamente el 95 %. En un ejemplo particular, el azúcar de nucleótido producido por el método de la invención se obtiene con un rendimiento global entre aproximadamente el 50 % y aproximadamente el 100 %, entre aproximadamente el 60 % y aproximadamente el 95 %, entre aproximadamente el 80 % y aproximadamente el 95 % o entre aproximadamente el 90 % y aproximadamente el 95 %. En otro ejemplo, el azúcar de nucleótido producido por el método de la invención se obtiene con un rendimiento global entre aproximadamente el 40 % y aproximadamente el 90 %, entre aproximadamente el 50 % y aproximadamente el 90 %, entre aproximadamente el 60 % y aproximadamente el 90 %, entre aproximadamente el 70 % y aproximadamente el 90 %, entre aproximadamente el 80 % y aproximadamente el 90 %, entre aproximadamente el 85 % y aproximadamente el 90 % (peso/peso) o entre aproximadamente el 85 % y aproximadamente el 95 %.

En una realización a modo de ejemplo, el azúcar de nucleótido modificado purificado por un método de la invención incluye un azúcar, azúcar activado o azúcar de nucleótido que está conjugado con uno o más polímeros, por ejemplo, un polímero ramificado. Polímeros a modo de ejemplo incluyen tanto especies solubles en agua como insolubles en agua.

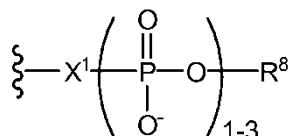
Se sustituyeron azúcares de nucleótido modificados a modo de ejemplo con el grupo modificador polimérico en cualquier posición dentro del resto de azúcar del azúcar de nucleótido. En una realización a modo de ejemplo, el azúcar está sustituido con un grupo conector o modificador polimérico unido mediante un conector en uno o más de C-1, C-2, C-3, C-4 o C-5. En otra realización, la invención proporciona una piranosa que está sustituida con un grupo conector o modificador unido al azúcar mediante un conector en uno o más de C-1, C-2, C-3, C-4, C-5 o C-6. Preferentemente, el grupo conector y/o modificador está unido directamente a un oxígeno, nitrógeno o azufre lateral del carbono del azúcar.

En una realización presentemente preferida, el grupo conector o modificador polimérico está unido a una posición que está seleccionada de forma que el conjugado resultante funciones como un sustrato para una enzima usada para enlazar el resto de azúcar modificado a otras especies, por ejemplo, péptido, glucopéptido, lípido, glicolípido, etc. Enzimas a modo de ejemplo se conocen en la técnica e incluyen glucosiltransferasas (sialiltransferasas, glucosiltransferasas, galactosiltransferasas, N-acetilglucosiltransferasas, N-acetilgalactosiltransferasas, manosiltransferasas, fucosiltransferasas, etc.). Conjugados de nucleótido de azúcar y de azúcar activado a modo de ejemplo de la invención también incluyen sustratos para glucosidasas mutantes y glucoceramididasas mutantes que se modifican para tener actividad sintética, en vez de hidrolítica.

En una realización a modo de ejemplo, el azúcar de nucleótido purificado por un método de la invención tiene una fórmula seleccionada de:



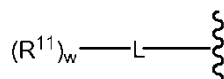
En las fórmulas I y II, R¹ es H, CH₂OR⁷, COOR⁷ o OR⁷, en las que R⁷ representa H, alquilo sustituido o sin sustituir o heteroalquilo sustituido o sin sustituir. R² es H, OH, NH o un resto que incluye un nucleótido. Un especie R² a modo de ejemplo según esta realización tiene la fórmula:



en la que X¹ representa O o NH y R⁸ es un nucleósido.

Los símbolos R³, R⁴, R⁵, R⁶ y R^{6'} representan independientemente H, alquilo sustituido o sin sustituir, OR⁹, NHC(O)R¹⁰. El índice d es 0 o 1. R⁹ y R¹⁰ están seleccionados independientemente de H, alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir o ácido siálico. Al menos uno de R³, R⁴, R⁵, R⁶ y R^{6'} incluye el grupo conector o modificador del conector, por ejemplo, PEG. En una realización a modo de ejemplo, R⁶ y R^{6'}, junto con el carbono al que están unidos, son componentes de la cadena lateral de ácido siálico. En todavía otra realización a modo de ejemplo, esta cadena lateral se modifica con el grupo conector o modificador del conector en uno o más de C-6, C-7 o C-9.

En una realización a modo de ejemplo, el brazo del conector tiene la siguiente estructura cuando w es 0 y cuando w es mayor que 0, un grupo modificador está unido al núcleo de azúcar mediante el conector:



en la que R¹¹ es el resto polimérico y L está seleccionado de un enlace y un grupo de enlace y w es un número entero de 1-6, preferentemente 1-3 y más preferentemente, 1-2.

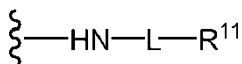
5 Si L es un enlace se forma entre un grupo funcional reactivo sobre un precursor de R¹¹ y un grupo funcional reactivo de reactividad complementaria sobre un precursor de L. Como se expone en el presente documento, la selección y preparación de precursores con grupos funcionales reactivos apropiados está dentro de la capacidad de aquellos expertos en la materia. Además, la combinación de los precursores prosigue por químicas que son muy entendidas en la materia.

10 En una realización a modo de ejemplo, L es un grupo de enlace que se forma a partir de un aminoácido, un mimético de aminoácido o péptido pequeño (por ejemplo, 1-4 residuos de aminoácidos) proporcionando un azúcar modificado. En otra realización, el grupo modificador está unido mediante el conector, por ejemplo, un resto modificador polimérico está unido mediante un conector de alquilo sustituido. El conector se forma mediante reacción de un resto de amina y ácido carboxílico (o un derivado reactivo, por ejemplo, éster activo, haluro de ácido, etc.) del aminoácido
15 con grupos de reactividad complementaria sobre los precursores para L y R¹¹. Los elementos del conjugado pueden conjugarse en esencialmente cualquier orden conveniente. Por ejemplo, el precursor para L puede estar en su sitio sobre el núcleo de sacárido antes de conjugarse los precursores de R¹¹ y L. Alternativamente, puede prepararse un casete de R¹¹-L, que lleva una funcionalidad reactiva sobre L y posteriormente enlazarse al sacárido mediante un grupo funcional reactivo de reactividad complementaria sobre esta especie.

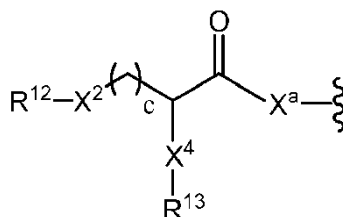
20 En una realización a modo de ejemplo, el conector y/o resto modificador es R³ y/o R⁶. En otra realización a modo de ejemplo, R³ y/o R⁶ incluyen tanto el resto modificador polimérico como un conector, L, uniéndose el resto polimérico con el resto de la molécula. En otra realización a modo de ejemplo, el resto modificador es R³. En otra realización a modo de ejemplo, R³ incluye tanto el grupo modificador como un conector, L, uniéndose el grupo modificador con el resto de la molécula. En otra realización más a modo de ejemplo en la que el azúcar es un ácido siálico, el grupo conector y/o modificador está en R⁵ o unido en una posición de la cadena lateral del ácido siálico, por ejemplo, C-9.

30 En una realización a modo de ejemplo, la presente invención proporciona un método de purificación de un azúcar o conjugado de azúcar activado o conjugado de azúcar de nucleótido que se forma entre un polímero lineal, tal como un polímero soluble en agua o insoluble en agua. En estos conjugados, el polímero está unido a un azúcar, azúcar activado o nucleótido de azúcar. Como se ha tratado en el presente documento, el polímero está enlazado al resto de azúcar, tanto directamente como mediante un conector.

35 Un compuesto a modo de ejemplo según esta realización tiene una estructura según las fórmulas (I) o (II), en la que al menos uno de R¹, R³, R⁴, R⁵ o R⁶ tiene la fórmula:

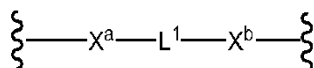


40 R¹¹ está presente o ausente. En esta realización, un conector a modo de ejemplo se deriva de un aminoácido natural o no natural, análogo de aminoácido o mimético de aminoácido, o un péptido pequeño formado de uno o más de tales especies. Por ejemplo, ciertos polímeros ramificados encontrados en los compuestos purificados por métodos de la invención tienen la fórmula:



45 X^a es un resto de enlace que se forma mediante la reacción de un grupo funcional reactivo en un precursor del resto modificador polimérico ramificado y el resto de azúcar, o un precursor con un conector. Por ejemplo, si X³ es un ácido carboxílico, puede activarse y unirse directamente a un grupo amina lateral de un amino-sacárido (por ejemplo, GalNH₂, GlcNH₂, ManNH₂, etc.), formando un X^a que es una amida. Grupos funcionales reactivos y precursores activados a modo de ejemplo adicionales se describen en el presente documento más adelante. El índice c representa un número entero de 1 a 10. Los otros símbolos tienen la misma identidad que aquellos tratados anteriormente.

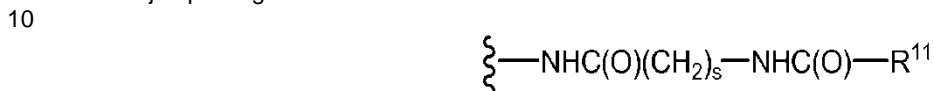
55 En otra realización a modo de ejemplo, X^a es un resto de enlace formado con otro conector:



en la que X^b es un resto de enlace y está seleccionado independientemente de aquellos grupos expuestos para X^a , y L^1 es un enlace, alquilo sustituido o sin sustituir o heteroalquilo sustituido o sin sustituir.

5 Especies a modo de ejemplo para X^a y X^b incluyen S, SC(O)NH, HNC(O)S, SC(O)O, O, NH, NHC(O), (O)CNH y NHC(O)O y OC(O)NH.

Otro ejemplo según esta realización tiene la fórmula:



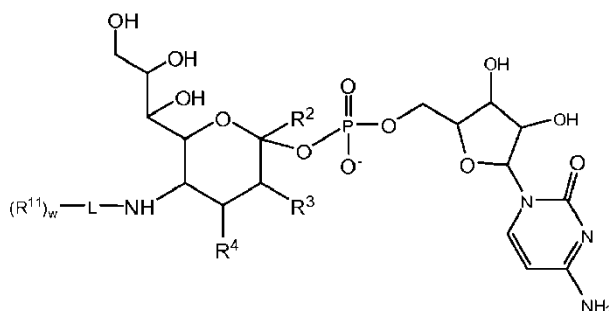
en la que s es un número entero de 0 a 20 y C(O)R¹¹ está presente o ausente y, cuando está presente, R¹¹ es un grupo modificador.

15 Cuando el grupo modificador es un resto de PEG, los restos de PEG pueden tener cualquier peso molecular, por ejemplo, 2 kDa, 5 kDa, 10 kDa, 20 kDa, 30 kDa y 40 kDa son de uso en la presente invención.

20 Nucleósidos a modo de ejemplo incluyen AMP, UMP, GMP, CMP, TMP, ADP, UDP, GDP, CDP, TDP, ATP, UTP, GTP, CTP, TTP, cAMP y cGMP.

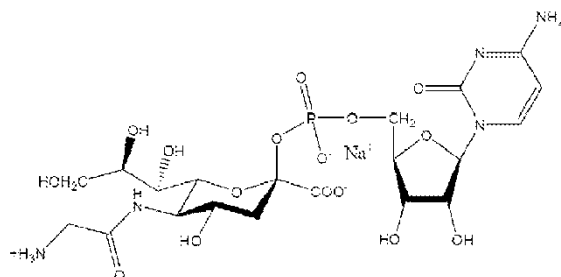
En una realización preferida, el azúcar purificado por el método de la invención incluye un ácido siálico modificado con un grupo conector. Sitios preferidos para tal modificación son R⁵, R⁶ o R^{6'}. Así, en una realización preferida, al menos uno de R¹ y R² incluye un conector. Un conector a modo de ejemplo es un conector de glucilo.

25 En otra realización preferida, el azúcar de nucleótido purificado por los métodos expuestos en el presente documento tiene la fórmula:



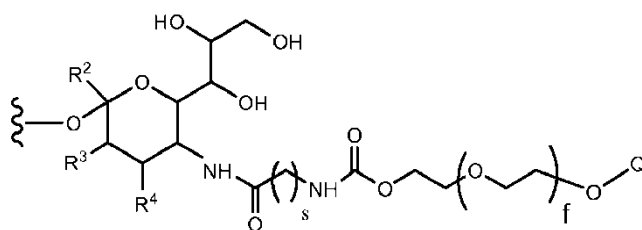
30 en la que los radicales son como se han tratado anteriormente y R¹¹ es un grupo modificador que está presente o ausente.

35 En una realización, el ácido siálico modificado (derivado de azúcar de nucleótido) tiene la siguiente estructura:

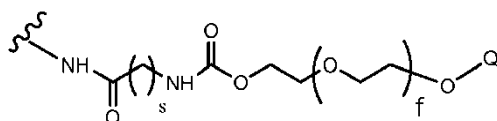


40 En otra realización más, un grupo modificador está unido al ácido siálico mediante el conector. Una especie a modo de ejemplo según esta descripción incluye un grupo modificador unido mediante el grupo amino primario del conector. Un grupo modificador a modo de ejemplo es un polímero soluble en agua, tal como poli(etilenglicol) y poli(propilenglicol).

En otra realización, el azúcar de nucleótido producido por un método de la invención tiene la fórmula:



en la que

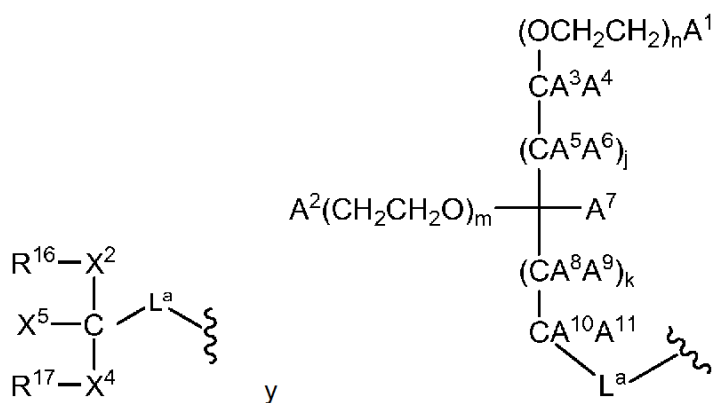


5

es un grupo modificador del conector. El índice s es un número entero seleccionado de 1 a 20. El índice f es un número entero seleccionado de 1 a 2500. Q es un miembro seleccionado de H y alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir.

10

Restos de PEG a modo de ejemplo incluidos como grupos modificadores en los azúcares de nucleótido modificados de la invención incluyen, pero no se limitan a:



15

en las que L^a es un conector seleccionado de un enlace, alquilo sustituido o sin sustituir y heteroalquilo sustituido o sin sustituir. Los símbolos X⁵, R¹⁶ y R¹⁷ representan independientemente restos poliméricos y grupos no reactivos. X² y X⁴ representan fragmentos de enlace independientemente seleccionados que unen los restos poliméricos R¹⁶ y R¹⁷ a C. Los índices m y n son números enteros independientemente seleccionados de 0 a 5000.

20

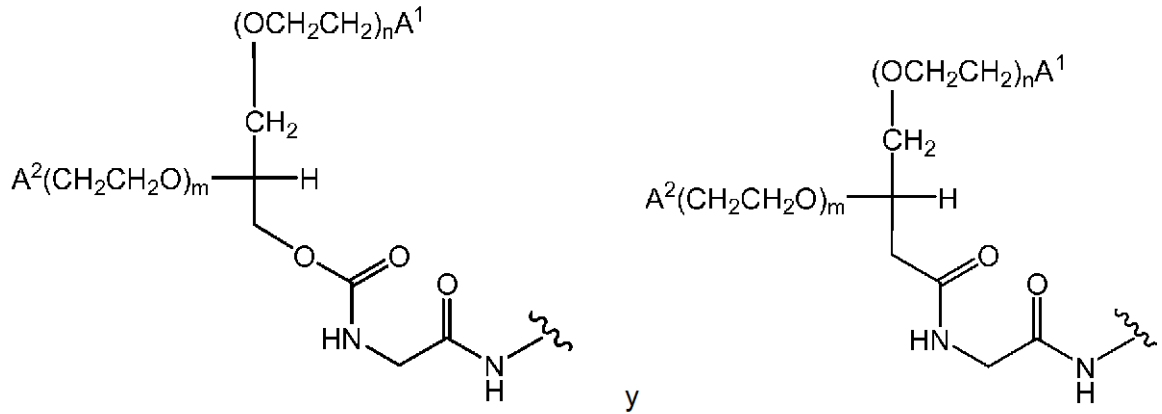
Los símbolos A¹, A², A³, A⁴, A⁵, A⁶, A⁷, A⁸, A⁹, A¹⁰ y A¹¹ representan independientemente H, alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, cicloalquilo sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, heteroarilo sustituido o sin sustituir, -NA¹²A¹³, -OA¹² o -SiA¹²A¹³. A¹² y A¹³ son miembros independientemente seleccionados de alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, cicloalquilo sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir y heteroarilo sustituido o sin sustituir.

25

Fragmentos de enlace a modo de ejemplo para X² y X⁴ incluyen CH₂, S, SC(O)NH, HNC(O)S, SC(O)O, O, NH, NHC(O), (O)CNH y NHC(O)O y OC(O)NH, CH₂S, CH₂O, CH₂CH₂O, CH₂CH₂S, (CH₂)_aO, (CH₂)_aS o (CH₂)_aY'-PEG o (CH₂)_aY'-PEG en las que Y' es S o O y a es un número entero de 1 a 50.

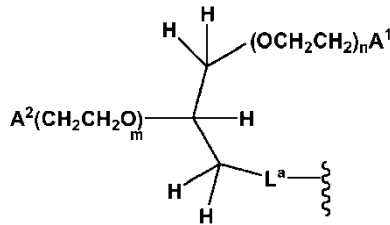
30

En una realización a modo de ejemplo, el grupo modificador polimérico tiene una estructura según las siguientes fórmulas:



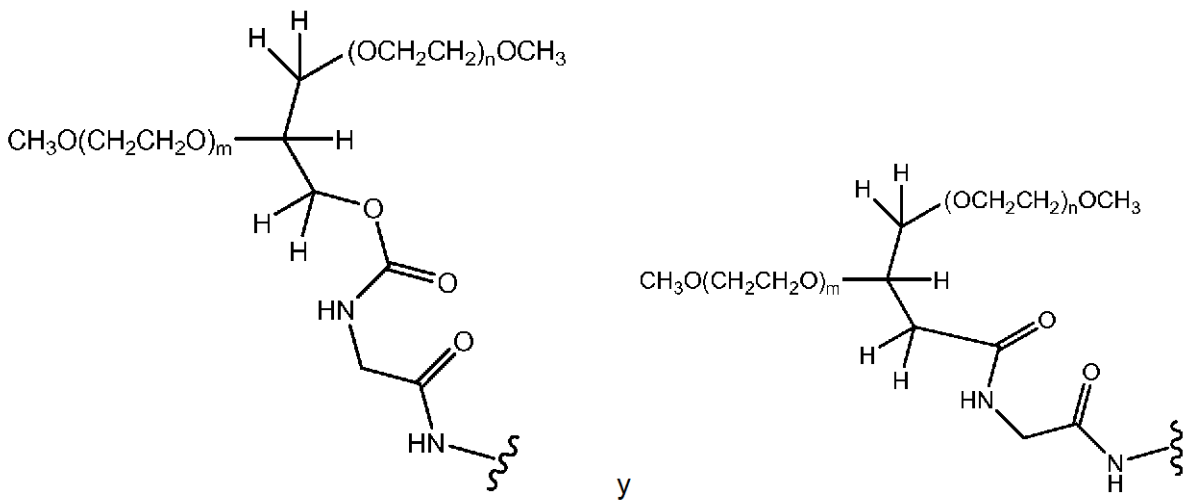
En otra realización a modo de ejemplo según la fórmula anterior, el grupo modificador polimérico tiene una estructura según la siguiente fórmula:

5

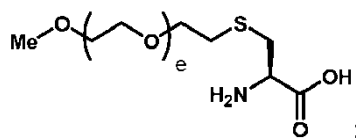


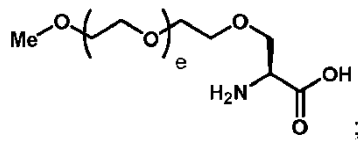
En una realización a modo de ejemplo, A¹ y A² son cada uno miembros seleccionados de -OH y -OCH₃.

10 Grupos modificadores poliméricos del conector a modo de ejemplo según esta realización incluyen:

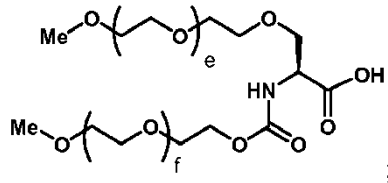


15 Realizaciones específicas adicionales de polímeros lineales y ramificados, por ejemplo, PEG, de uso en la invención incluyen:

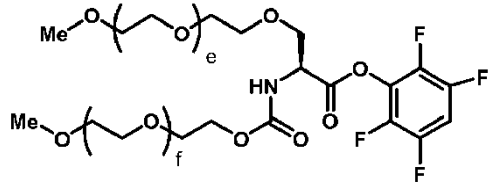




y

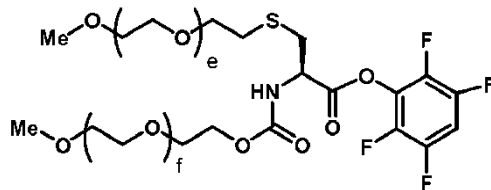


5 y carbonatos y ésteres activos de estas especies, tales como:



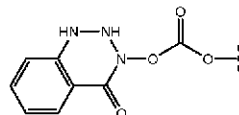
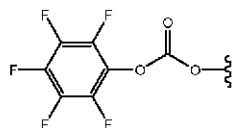
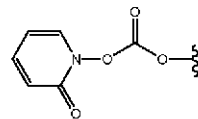
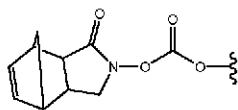
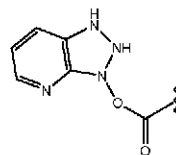
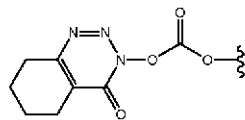
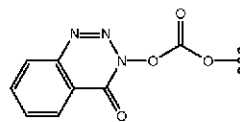
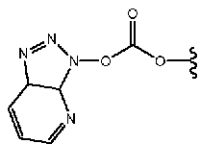
y

10



15 pueden usarse para formar las especies poliméricas lineales y ramificadas, conjugados de brazo conector de estas especies y conjugados entre estos compuestos y azúcares y azúcares de nucleótido.

Otros grupos activantes, o salientes, a modo de ejemplo apropiados para activar PEG lineales de uso en la preparación de los compuestos expuestos en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, las especies:



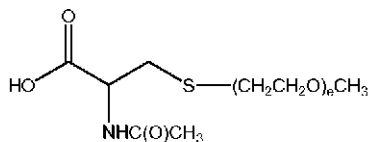
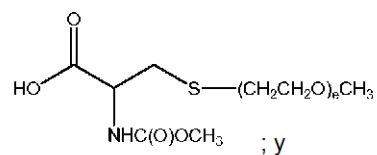
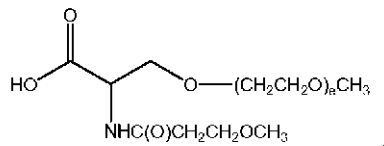
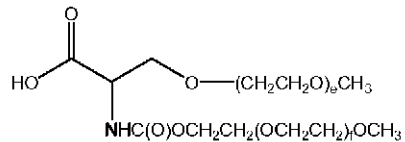
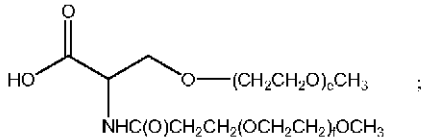
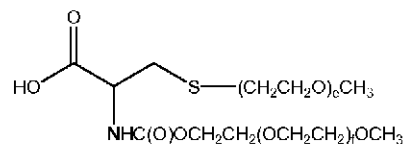
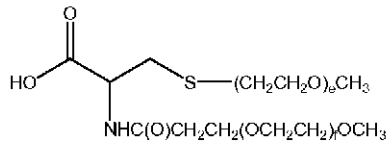
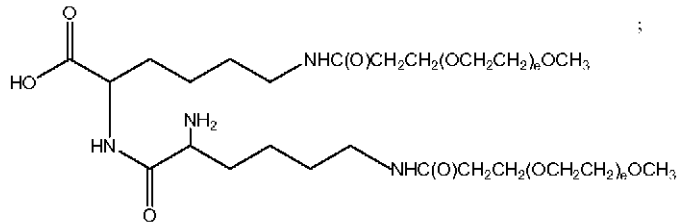
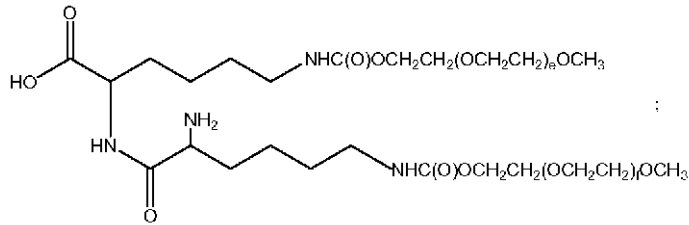
: y

Está perfectamente dentro de las capacidades de aquellos expertos en la materia seleccionar un grupo activante apropiado para un resto seleccionado sobre el precursor para el resto modificador polimérico.

5 Moléculas de PEG que se activan con estas y otras especies y métodos de preparación de los PEG activados PEG se exponen en el documento WO 04/083259.

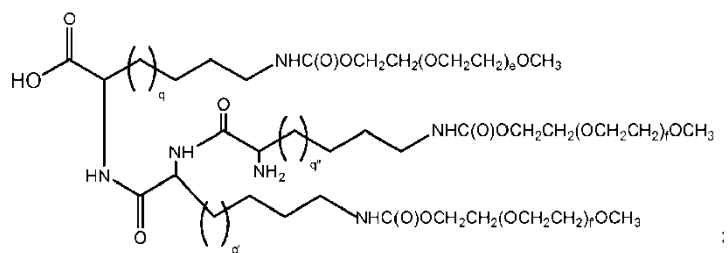
En realizaciones a modo de ejemplo, el polímero ramificado es un PEG basado en un núcleo de cisteína, serina, lisina, di- o tri-lisina. Así, PEG ramificados a modo de ejemplo adicionales incluyen:

10

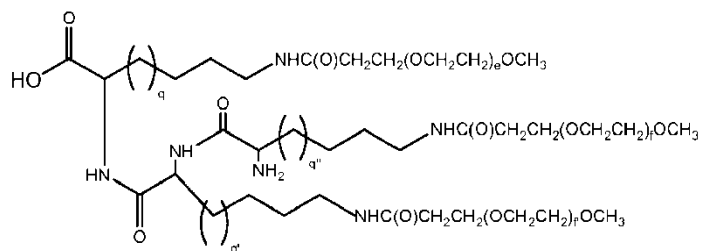


En otra realización más, el resto de PEG ramificado se basa en un péptido de tri-lisina. La tri-lisina puede estar mono-, di-, tri-, o tetra-PEG-ilada. Especies a modo de ejemplo según esta realización tienen las fórmulas:

15



y



5

en las que e, f y f' están seleccionados independientemente de número enteros de 1 a 2500; y q, q' y q'' están seleccionados independientemente de número enteros de 1 a 20.

10 En realizaciones a modo de ejemplo de la invención, el PEG es m-PEG (5 kD, 10 kD o 20 kD). Una especie de PEG ramificada a modo de ejemplo es una serina- o cisteína-(m-PEG)₂ en la que el m-PEG es un m-PEG de 20 kD.

15 Como será evidente para aquellos expertos, los polímeros ramificados de uso en la invención incluyen variaciones en los temas expuestos anteriormente. Por ejemplo, el conjugado de di-lisina-PEG mostrado anteriormente puede incluir tres subunidades poliméricas, la tercera unida a la α-amino mostrada como sin modificar en la estructura anterior. Similarmente, el uso de una tri-lisina funcionalizada con tres o cuatro subunidades poliméricas está dentro del alcance de la invención.

20 Aquellos expertos en la materia apreciarán que uno o más de los brazos de m-PEG del polímero ramificado pueden sustituirse con un resto de PEG con un extremo diferente, por ejemplo, OH, COOH, NH₂, alquilo C₂-C₁₀, etc. Además, las estructuras anteriores se modifican fácilmente insertando conectores de alquilo (o eliminando átomos de carbono) entre el átomo de carbono α y el grupo funcional de la cadena lateral. Así, derivados "homo" y homólogos superiores, además de homólogos inferiores, están dentro del alcance de los núcleos para PEG ramificados de uso en la presente invención.

25 En una realización a modo de ejemplo, L^a está unido a un resto de amina libre del brazo conector, por ejemplo, conector de glucilo, mediante un enlace amina, amida o uretano.

30 En otra realización a modo de ejemplo, el PEG es un PEG lineal. Similar a las especies de PEG ramificado, el PEG lineal puede unirse a un resto de amina del brazo de conector mediante un enlace de amina, amida o uretano.

35 En una realización presentemente preferida, los sacáridos descritos anteriormente se convierten en sus análogos de nucleósido, derivados que incluyen un brazo de conector, análogos en los que un grupo modificador está unido a un residuo de azúcar del sacárido directamente o a través de un conector y aductos de nucleótidos de cada uno de estos motivos.

Formación del azúcar de nucleótido modificado

40 En otro ejemplo según cualquiera de las realizaciones anteriores, el método incluye adicionalmente: (vi) formar el azúcar de nucleótido modificado. En un ejemplo, el azúcar de nucleótido modificado se forma poniendo en contacto un derivado de azúcar de nucleótido que incluye un grupo funcional reactivo (por ejemplo, un grupo amino primario) con un reactivo polimérico activado, por ejemplo, un reactivo de poli(óxido de alqueno) activado. El reactivo polimérico puede activarse incorporando un resto de éster activado (por ejemplo, éster de NHS), un grupo cloruro de ácido o un resto de carbonato activado (por ejemplo, carbonato de *p*-nitrofenilo). Reactivos poliméricos activados a modo de ejemplo incluyen un resto de *p*-nitrofenilo. Un experto en la materia apreciará que puede usarse cualquier reacción de acoplamiento adecuada para conjugar dos componentes de reacción para enlazar covalentemente el azúcar de nucleótido a un grupo modificador. El término "derivado de azúcar de nucleótido" es cualquier azúcar de nucleótido que incorpore un grupo funcional reactivo útil para formar un enlace covalente con otro grupo funcional reactivo sobre el grupo modificador polimérico. Grupos funcionales reactivos a modo de ejemplo incluyen grupos nucleófilos, tales como grupos amino, grupos hidroxilo y grupos sulfhidrilo. Grupos funcionales reactivos electrófilos

50

a modo de ejemplo incluyen ésteres activados, carbonatos de *p*-nitrofenilo, cloruros de ácido y similares.

En un ejemplo, el azúcar de nucleótido modificado se forma poniendo en contacto un derivado de azúcar de nucleótido que incluye un grupo amino primario con un resto de poli(óxido de alqueno) activado en condiciones
5 suficientes para formar un enlace covalente entre el grupo amino del derivado de azúcar de nucleótido y el resto de poli(óxido de alqueno). En un ejemplo, el derivado de azúcar de nucleótido es un azúcar de nucleótido enlazado covalentemente a un resto de glicina. En otro ejemplo, el derivado de azúcar de nucleótido está seleccionado de
10 CMP-SA-glicina, AMP-SA-glicina, UMP-SA-glicina, GMP-SA-glicina, CMP-SA-glicina, TMP-SA-glicina, ADP-SA-glicina, UDP-SA-glicina, GDP-SA-glicina, CDP-SA-glicina, TDP-SA-glicina, ATP-SA-glicina, UTP-SA-glicina, GTP-SA-glicina, CTP-SA-glicina, TTP-SA-glicina, cAMP-SA-glicina y cGMP-SA-glicina, en los que el resto de ácido siálico (SA) se sustituye opcionalmente con otro resto de azúcar (por ejemplo, Glc, GlcNAc, Gal, GalNAc, fucosa, manosa, xilosa) y/o el resto de glicina se sustituye opcionalmente con otro resto de conector que proporciona un grupo funcional reactivo.

15 En un ejemplo, el derivado de azúcar de nucleótido usado en los métodos de la invención se sintetiza enzimáticamente a partir de un nucleótido y un azúcar en presencia de una enzima, tal como una glucosiltransferasa (por ejemplo, sialiltransferasa). Métodos a modo de ejemplo para la síntesis y purificación de derivados de azúcar de nucleótido, además de enzimas a modo de ejemplo, se desvelan en el documento WO2007/056191, presentado el 3 de noviembre de 2007, cuya divulgación se incorpora en el presente documento en su totalidad.

20 En un ejemplo según cualquiera de las realizaciones anteriores, el derivado de azúcar de nucleótido, que incluye un grupo amino primario y el resto polimérico activado, que incluye un resto de carbonato de *p*-nitrofenilo (por ejemplo, poli(etilenglicol)-carbonato de *p*-nitrofenilo) se ponen en contacto en presencia de un disolvente acuoso que tiene un pH entre aproximadamente 8,0 y 9,0, entre 8,0 y aproximadamente 8,9 o entre aproximadamente 8,0 y aproximadamente 8,8.

Inesperadamente, los inventores han descubierto que un intervalo de pH entre aproximadamente 8,0 y aproximadamente 8,8 en un sistema de disolvente acuoso es crítico durante la reacción de acoplamiento entre un grupo modificador polimérico activado que incluye un resto de carbonato de *p*-nitrofenilo (pNP), tal como PEG-carbonatos de *p*-nitrofenilo (por ejemplo, mPEG-*p*-nitrofenilo), y el derivado de azúcar de nucleótido (por ejemplo, CMP-SA-glicina). El intervalo de pH optimizado (superior a pH 7,0) reduce en gran medida la formación de productos secundarios debido a la hidrólisis de los componentes de reacción y productos y así aumenta significativamente los rendimientos y las perezas para los productos finales. Por ejemplo, por debajo de pH 7,0, CMP-SA-glicina y CMP-SA-PEG se descompusieron debido a la hidrólisis para formar CMP, ácido siálico-glicina y ácido siálico-PEG.
30 Productos de descomposición a modo de ejemplo se muestran en la Figura 3. Un pH inicial entre aproximadamente 8,0 y aproximadamente 8,8 (por ejemplo, aproximadamente 8,6 a aproximadamente 8,7) de la mezcla de reacción fue crítico en lograr los mayores rendimientos de conversión. El intervalo de pH óptimo a lo largo del proceso estuvo entre aproximadamente 8,0 y aproximadamente 8,8. Cuando el pH disminuyó por debajo de 8,0, la reacción se ralentizó espectacularmente, produciendo malos rendimientos de conversión.

40 Por ejemplo, pueden prepararse CMP-SA-PEG (por ejemplo, CMP-SA-PEG-10 kDa, CMP-SA-PEG-20 kDa y CMP-SA-glicerol-PEG-40 kDa) haciendo reaccionar CMP-SA-glicina (GSC) con un reactivo de PEG que incorpora un resto de carbonato de *p*-nitrofenilo (por ejemplo, reactivos de PEG lineal o ramificado de 10 kDa, 20 kDa, 40 kDa, 60 kDa, 80 kDa, 100 kDa de peso molecular). Una ruta de síntesis a modo de ejemplo según esta realización se explica brevemente en la Figura 2. La presente invención proporciona métodos mejorados, en los que los CMP-SA-PEG se obtienen en mayor pureza y con mejores rendimientos globales que durante los procesos conocidos.

Cromatografía de intercambio aniónico

50 En una realización a modo de ejemplo, una muestra que contiene el azúcar de nucleótido de interés se carga sobre un intercambiador aniónico en un tampón de carga que comprende una concentración de sales por debajo de la concentración a la que el azúcar de nucleótido eluiría de la columna. En un ejemplo, el pH del tampón se selecciona de manera que el azúcar de nucleótido sea retenido sobre el medio de intercambio aniónico. El cambiar el pH del tampón altera la carga del azúcar de nucleótido y el reducir el valor de pH acorta el tiempo de retención con
55 intercambiadores aniónicos. Alternativamente, las condiciones de intercambio aniónico están seleccionadas para unirse preferencialmente a impurezas, mientras que el péptido purificado se encuentra en el flujo a través.

La columna puede lavarse con varios volúmenes de columna (VC) de tampón para eliminar sustancias sin unir y/o aquellas sustancias que se unen débilmente a la resina. Entonces se eluyeron fracciones de la columna usando, por
60 ejemplo, un gradiente de bicarbonato según métodos convencionales. La sal en la disolución compite con el azúcar de nucleótido en la unión a la columna y se libera el azúcar de nucleótido. Componentes con interacciones iónicas débiles eluyen a una menor concentración de sales que los componentes con una interacción iónica fuerte. Se recogen fracciones de muestra de la columna. Las fracciones que contienen altos niveles del azúcar de nucleótido deseado y bajos niveles de impurezas se reúnen o procesan por separado.

65

Los medios de intercambio aniónico son conocidos para aquellos expertos en la materia. Medios de intercambio aniónicos a modo de ejemplo se describen, por ejemplo, en Protein Purification Methods, A Practical Approach, Ed. Harris ELV, Angal S, IRL Press Oxford, England (1989); Protein Purification, Ed. Janson JC, Ryden L, VCH-Verlag, Weinheim, Germany (1989); Process Scale Bioseparations for the Biopharmaceutical Industry, Ed. Shukla AA, Etzel MR, Gadam S, CRC Press Taylor & Francis Group (2007), páginas 188-196; Protein Purification Handbook, GE Healthcare 2007 (18-1132-29) y Protein Purification, Principles, High Resolution Methods and Applications (2nd Edition 1998), Ed. Janson J-C and Ryden L. Un intercambiador aniónico a modo de ejemplo de la invención se selecciona de resinas de amonio cuaternario y resinas de DEAE. En una realización, el intercambiador aniónico es una resina de amonio cuaternario (por ejemplo, membrana de intercambio iónico Mustang Q, Pall Corporation). Otras resinas útiles incluyen resinas QXL, Capto y Big Beads. En un ejemplo, el intercambiador aniónico es Sartobind Q.

Medios de intercambio aniónico a modo de ejemplo y fabricantes a modo de ejemplo se resumen a continuación:

15 GE Healthcare:

- Q-Sepharose FF
- Q-Sepharose BB
- 20 Q-Sepharose XL
- Q-Sepharose HP
- Mini Q
- Mono Q
- Mono P
- 25 DEAE Sepharose FF
- Source 15Q
- Source 30Q
- Capto Q
- ANX Sepharose 4 FF (high sub)
- 30 Streamline DEAE
- Streamline QXL

Applied Biosystems:

- 35 Poros HQ 10 y 20um Self Pack
- Medios a granel Poros HQ 20 y 50um
- Poros PI 20 y 50um
- Poros D 50um

Tosohaas:

- 40 Toyopearl DEAE 650S, M y C
- Super Q 650
- QAE 550C

45 Pall Corporation:

- DEAE Hyper D
- Q Ceramic Hyper D
- 50 Absorbente de membrana Mustang Q

Merck KGaA:

- Fractogel DMAE
- FractoPrep DEAE
- 55 Fractoprep TMAE
- Fractogel EMD DEAE
- Fractogel EMD TMAE

Sartorius: Absorbente de membrana Sartobind Q

60 Los intercambiadores aniónicos usados en los métodos de la invención son opcionalmente adsorbentes de membrana en vez de resinas o soportes cromatográficos. El adsorbente de membrana es opcionalmente desechable.

65

Desalación

En una realización, la mezcla que contiene el azúcar de nucleótido de interés se desala posterior a la cromatografía de intercambio aniónico.

5 La desalación de disoluciones de azúcar de nucleótido se logra usando filtros de membrana en los que el filtro de membrana tiene un MWCO más pequeño que el azúcar de nucleótido de interés. El azúcar de nucleótido se encuentra en el retenido y se reconstituye en un tampón de elección (por ejemplo, agua). El MWCO de la membrana usada para desalar el azúcar de nucleótido debe ser relativamente pequeño con el fin de evitar la fuga del azúcar de nucleótido a través de los poros de la membrana. Por ejemplo, el MWCO de la membrana de ultrafiltración está entre aproximadamente 1 kDa y 10 kDa (por ejemplo, un tamaño de poro de aproximadamente 5 kDa).

15 En una realización, la desalación del azúcar de nucleótido se lleva a cabo usando cromatografía de exclusión por tamaño (por ejemplo, filtración en gel). La técnica separa moléculas basándose en el tamaño. Normalmente, los componentes de alto peso molecular pueden desplazarse a través de la columna más fácilmente que las moléculas más pequeñas, ya que su tamaño previene que entren en los poros de las perlas. Por consiguiente, los componentes de bajo peso molecular necesitan más tiempo para pasar a través de la columna. Así, materiales de bajo peso molecular, tales como sales no deseadas, puede separarse del azúcar de nucleótido de interés.

20 En una realización a modo de ejemplo, el material de columna está seleccionado de geles de dextrano, agarosa y poli(acrilamida), en el que los geles se caracterizan por diferentes tamaños de partícula. En otra realización a modo de ejemplo, el material está seleccionado de materiales de exclusión por tamaño compatibles con el agua rígidos. Una resina de filtración en gel a modo de ejemplo de la invención es la resina Sepharose G-25 (GE Healthcare).

25 En una realización a modo de ejemplo, la desalación se realiza posterior a la cromatografía de intercambio aniónico (por ejemplo, después de la cromatografía en Q-Sepharose).

30 Para purificar azúcares de nucleótido según los métodos de la invención, se selecciona una membrana que es apropiada para separar el hidrato de carbono deseado de los componentes no deseados (contaminantes) de la disolución de la que va a purificarse el hidrato de carbono. El objetivo en la selección de una membrana es optimizar para una aplicación particular el corte de peso molecular (MWCO), la composición de membrana, la permeabilidad y las características de rechazo, es decir, la capacidad total de la membrana para retener moléculas específicas mientras que se permite que otras especies, por ejemplo, sales y otras moléculas generalmente más pequeñas o de carga opuesta, pasen a través. El porcentaje de retención de un componente i (R_i) viene dado por la fórmula $R_i = (1 - C_{ip}/C_{ir}) \times 100 \%$, en la que C_{ip} es la concentración del componente i en el permeado y C_{ir} es la concentración del componente i en el retenido, ambas expresadas en porcentaje en peso. El porcentaje de retención de un componente también se llama la característica de retención o el coeficiente de rechazo de la membrana.

40 En una realización a modo de ejemplo, se elige una membrana que tiene una alta relación de rechazo para el azúcar de nucleótido de interés con respecto a la relación de rechazo para compuestos de los que se desea la separación. Si una membrana tiene una alta relación de rechazo para un primer compuesto con respecto a un segundo compuesto, la concentración del primer compuesto en la disolución de permeado que pasa a través de la membrana disminuye con respecto a la del segundo compuesto. En cambio, la concentración del primer compuesto aumenta con respecto a la concentración del segundo compuesto en el retenido. Si una membrana no rechaza un compuesto, la concentración del compuesto en tanto las porciones de permeado como de rechazo seguirá siendo esencialmente la misma que en la disolución de alimentación. También es posible que una membrana tenga una tasa de rechazo negativa para un compuesto si la concentración del compuesto en el permeado se vuelve superior a la concentración del compuesto en la disolución de alimentación. Una revisión general de la tecnología de membranas se encuentra en "Membranes and Membrane Separation Processes", en Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry (VCH, 1990); véase también Noble and Stern, Membrane Separations Technology: Principles and Applications (Elsevier, 1995).

55 Como punto de partida, generalmente se elegirá una membrana que tiene un corte de peso molecular (MWCO, que está frecuentemente relacionado con el tamaño de poro de la membrana) que se espera que retenga los compuestos deseados mientras que permite que un compuesto no deseado presente en la corriente de alimentación pase a través de la membrana. El MWCO deseado es generalmente inferior al peso molecular del compuesto que se purifica y normalmente es mayor que el peso molecular del contaminante no deseado que va a eliminarse de la disolución que contiene el compuesto que se purifica. Por ejemplo, para purificar un compuesto que tiene un peso molecular de 200 Da, se elegirá una membrana que tiene un MWCO de menos de aproximadamente 200 Da. Una membrana con un MWCO de 100 Da, por ejemplo, también sería un candidato adecuado. Las membranas que encuentran uso en la presente invención se clasifican en parte basándose en su MWCO como membranas de ultrafiltración (UF), membranas de nanofiltración (NF) o membranas de ósmosis inversa (RO), dependiendo de la separación deseada. Para los fines de la presente invención, las membranas de UF, NF y RO se clasifican como se define en *Pure Water Handbook*, Osmonics, Inc. (Minnnetonka MN). Las membranas de RO normalmente tienen un MWCO nominal de menos de aproximadamente 200 Da y rechazan la mayoría de los iones, las membranas de NF generalmente tienen un MWCO nominal de entre aproximadamente 150 Da y aproximadamente 5 kDa y las

membranas de UF generalmente tienen un MWCO nominal de entre aproximadamente 1 kDa y aproximadamente 300 kDa (estos intervalos de MWCO suponen una molécula tipo sacárido). Una membrana de ultrafiltración actualmente preferida de uso en la purificación de un conjugado de azúcar de nucleótido-PEG tiene un corte de peso molecular de 19 Kd.

5 Un segundo parámetro que se considera en la elección de una membrana apropiada para una separación particular es el tipo de polímero de la membrana. Membranas a modo de ejemplo de uso en la invención se preparan a partir de material de membrana convencional tanto inorgánico, orgánico, como inorgánico y orgánico mixto. Materiales inorgánicos típicos incluyen vidrios, cerámicas, cermets, metales y similares. Las membranas cerámicas, que se prefieren para la zona de UF, pueden prepararse, por ejemplo, como se describe en las patentes de EE.UU. N° 4.692.354 de Asaeda et al, 4.562.021 de Alary et al. y otras. Los materiales orgánicos que se prefieren para aplicaciones de NF y RO normalmente son polímeros, tanto isotrópicos como anisotrópicos, con una delgada capa o "piel" sobre tanto el lado de perforación como el lado de la vaina de las fibras. Materiales preferidos para fibras son poliamidas, polibenzamidas, polisulfonas (que incluyen polisulfona sulfonatada y poliétersulfona sulfonatada, entre otras), poliestirenos, que incluyen copolímeros que contienen estireno tales como copolímeros de acrílo-nitrilo-estireno, butadieno-estireno y estireno-haluro de vinilbencilo, policarbonatos, polímeros celulósicos que incluyen acetato de celulosa, polipropileno, poli(cloruro de vinilo), poli(tereftalato de etileno), poli(alcohol vinílico), fluorocarburos y similares, tales como los desvelados en las patentes de EE.UU. N° 4.230.463, 4.806.244 y 4.259.183. Las membranas de NF y RO frecuentemente consisten en un sustrato de soporte poroso, además de la capa de discriminación polimérica.

De particular importancia en la selección de una composición de membrana adecuada es la carga superficial de la membrana. Dentro del intervalo de MWCO requerido, se selecciona una membrana que tiene una carga superficial que es apropiada para la carga iónica del hidrato de carbono y la de los contaminantes. Aunque el MWCO para una membrana particular es generalmente invariable, el cambiar el pH de la disolución de alimentación puede afectar las propiedades de separación de una membrana, alterando la carga superficial de la membrana. Por ejemplo, una membrana que tiene una carga superficial negativa neta a pH neutro puede ajustarse para tener una carga neutra neta simplemente reduciendo el pH de la disolución. Un efecto adicional de ajustar el pH de la disolución es modular la carga iónica de los contaminantes y en el hidrato de carbono de interés. Por tanto, eligiendo un tipo de polímero de membrana adecuado y pH puede obtenerse un sistema en el que tanto el contaminante como la membrana son neutros, facilitándose el paso a través del contaminante. Si, por ejemplo, un contaminante está negativamente cargado a pH neutro, es frecuentemente deseable reducir el pH de la disolución de alimentación para protonar el contaminante. Por ejemplo, la eliminación de fosfato se facilita reduciendo el pH de la disolución a al menos aproximadamente 3, preferentemente a al menos aproximadamente 4, más preferentemente a al menos aproximadamente 5 y todavía más preferentemente a al menos aproximadamente 6, que protona el anión fosfato, permitiendo el paso a través de una membrana. Para la purificación de un hidrato de carbono aniónico, el pH estará generalmente entre aproximadamente pH 1 y aproximadamente pH 7, preferentemente entre aproximadamente 3 y aproximadamente 7 y más preferentemente de aproximadamente 4 a aproximadamente 6. En cambio, si el contaminante tiene una carga superficial positiva, el pH de la disolución de alimentación puede ajustarse a entre aproximadamente pH 7 y aproximadamente pH 14. Por ejemplo, el aumentar el pH de una disolución que contiene un contaminante que tiene un grupo amino ($-\text{NH}_3^+$) hará el grupo amino neutro, facilitando así su paso a través de la membrana. Así, un aspecto de la invención implica modular una separación ajustando el pH de una disolución en contacto con la membrana; esto puede cambiar la carga iónica de un contaminante y también puede afectar la carga superficial de la membrana, facilitando así la purificación del hidrato de carbono deseado. Por supuesto, deben seguirse las instrucciones del fabricante en cuanto al intervalo de pH aceptable para una membrana particular para evitar el daño a la membrana.

Para algunas aplicaciones, una mezcla se somete primero a nanofiltración u ósmosis inversa a un pH, después de lo cual el retenido que contiene el azúcar de nucleótido de interés se ajusta a un pH diferente y se somete a una ronda adicional de purificación en membrana. Por ejemplo, la filtración de una mezcla de reacción usada para sintetizar sialil-lactosa mediante una membrana Osmonics MX07 (una membrana de nanofiltración que tiene un MWCO de aproximadamente 500 Da) a pH 3, preferentemente al menos aproximadamente 4, más preferentemente al menos aproximadamente 5, y todavía más preferentemente al menos aproximadamente 6, retendrá la sialil-lactosa y eliminará la mayoría del fosfato, piruvato, sal y manganeso de la disolución, mientras que también eliminará algo de la GlcNAc, lactosa y ácido siálico. La recirculación adicional a través de la membrana MX07 después de ajustar el pH del retenido a aproximadamente 7, por ejemplo, 7,4, eliminará la mayoría del fosfato restante, todo el piruvato, toda la lactosa, algo del ácido siálico y cantidades sustanciales del manganeso restante.

Si un azúcar de nucleótido va a purificarse a partir de una mezcla que contiene proteínas, tales como enzimas usadas para sintetizar un oligosacárido o azúcar de nucleótido deseado, se desea frecuentemente eliminar las proteínas como una primera etapa del procedimiento de purificación. Para un azúcar de nucleótido que es más pequeño que las proteínas, esta separación se lleva a cabo eligiendo una membrana que tiene un MWCO que es inferior a la masa molecular de la proteína u otra macromolécula que va a eliminarse de la disolución, pero es mayor que la masa molecular del oligosacárido que se purifica (es decir, la relación de rechazo en este caso es mayor para la proteína que para el sacárido deseado). Proteínas y otras macromoléculas que tienen una masa molecular superior a MWCO serán así rechazadas por la membrana, mientras que el azúcar de nucleótido pasará a través de

la membrana. En cambio, si un oligosacárido o azúcar de nucleótido va a purificarse a partir de proteínas que son más pequeñas que el oligosacárido o azúcar de nucleótido, se usa una membrana que tiene un MWCO que es mayor que la masa molecular de la proteína, pero más pequeña que la del oligosacárido o azúcar de nucleótido. Generalmente, la separación de proteínas de hidratos de carbono empleará membranas que se denominan comúnmente membranas de ultrafiltración (UF). Las membranas de UF que son adecuadas para su uso en los métodos de la invención están disponibles de varios fabricantes comerciales, que incluyen Millipore Corp. (Bedford, MA), Osmonics, Inc. (Minnetonka, MN), Filmtec (Mineápolis, MN), UOP, Desalination Systems, Advanced Membrane Technologies y Nitto.

La invención también proporciona métodos para eliminar sales y otros componentes de bajo peso molecular de una mezcla que contiene un azúcar de nucleótido de interés usando una membrana de nanofiltración (NF) o de ósmosis inversa (RO). Las membranas de nanofiltración son una clase de membranas para las que la separación se basa tanto en el peso molecular como en la carga iónica. Estas membranas normalmente se encuentran entre las membranas de ósmosis inversa y de ultrafiltración en términos del tamaño de especies que pasarán a través de la membrana. Las membranas de nanofiltración normalmente tienen microporos o aberturas entre las cadenas en una red de polímero hinchado. Los cortes de peso molecular para moléculas no ionizadas normalmente están en el intervalo de 100-20.000 Daltons. Para iones del mismo peso molecular, los rechazos de membrana (retenciones) aumentarán progresivamente para las cargas iónicas de 0, 1, 2, 3 etc. para una membrana particular debido al aumento de la densidad de carga (véase, por ejemplo, "Nanofiltration Extends the Range of Membrane Filtration", Environmental Progress, 7: 58-59 (1988)). La nanofiltración también se describe en Chemical Engineering Progress, pp. 68-74 (March 1994), Rautenbach et al., Desalination 77: 73 (1990) y USPN 4.806.244). En una aplicación típica, los azúcares de nucleótido de interés serán retenidos por la membrana de nanofiltración y las sales contaminantes y otros componentes no deseados pasarán a través. Una membrana de nanofiltración útil en los métodos de la invención normalmente tendrá una característica de retención para el azúcar de nucleótido de interés de aproximadamente el 40 % a aproximadamente el 100 %, preferentemente de aproximadamente el 70 % a aproximadamente el 100 %, más preferentemente de aproximadamente el 90 % a aproximadamente el 100 %. Las membranas de nanofiltro usadas en la invención pueden ser una cualquiera de las membranas de nanofiltro convencionales, siendo las membranas de poliamida particularmente adecuadas. Varios fabricantes comerciales, que incluyen Millipore Corp. (Bedford, MA), Osmonics, Inc. (Minnetonka, MN), Filmtec, UOP, Advanced Membrane Technologies, Desalination Systems y Nitto, entre otros, distribuyen membranas de nanofiltración que son adecuadas para su uso en los métodos de la invención. Por ejemplo, membranas adecuadas incluyen las membranas MX07, YK, GH (G-10), GE (G-5) y HL de Osmonics, entre otras.

Las membranas de ósmosis inversa (RO) también permiten que varios solutos acuosos pasen a través de ellas mientras que retienen moléculas seleccionadas. Generalmente, la ósmosis se refiere a un proceso por el cual un líquido puro (normalmente agua) pasa a través de una membrana semipermeable a una disolución (normalmente azúcar o sal y agua) para diluir la disolución y lograr el equilibrio osmótico entre los dos líquidos. A diferencia, la ósmosis inversa es un proceso de membrana conducido por la presión en el que la aplicación de presión externa al sistema de membrana produce un flujo inverso con las moléculas de agua que pasan a través de un compartimento de solución salina o de disolución de azúcar en el compartimento de agua pura del sistema de membrana. Una membrana de RO, que es semipermeable y no porosa, requiere que se bombee una alimentación acuosa a ella a una presión por encima de la presión osmótica de las sustancias disueltas en el agua. Una membrana de RO puede eliminar eficazmente moléculas de bajo peso molecular (< 200 Daltons) y también iones del agua. Preferentemente, la membrana de ósmosis inversa tendrá una característica de retención para el azúcar de nucleótido de interés de aproximadamente el 40 % a aproximadamente el 100 %, preferentemente de aproximadamente el 70 % a aproximadamente el 100 % y más preferentemente de aproximadamente el 90 % a aproximadamente el 100 %. Membranas de RO adecuadas incluyen, pero no se limitan a, las membranas BW-30 de Filmtec, SW-30 de Filmtec, SW-30HR de Filmtec, de RO de UOP, de RO de Desal, membranas de RO de Osmonics, membranas de RO de Advanced Membrane Technologies y las membranas de RO de Nitto, entre otras. Un ejemplo de una membrana de RO adecuada es Millipore Cat. No. CDRN500 60 (Millipore Corp., Bedford MA).

Las membranas usadas en la invención pueden emplearse en cualquiera de las construcciones de membrana conocidas. Por ejemplo, las membranas pueden ser planas, de placa y marco, tubulares, enrolladas en espiral, de fibra hueca y similares. En una realización preferida, la membrana está enrollada en espiral. Las membranas pueden emplearse en cualquier configuración adecuada, que incluye tanto un flujo a través como una configuración profunda. En la filtración de "flujo cruzado", que se prefiere para purificaciones por ultrafiltración, nanofiltración y ósmosis inversa según la invención, la "alimentación" o disolución de la que va a purificarse el hidrato de carbono de interés circula a través de canales de membrana, tanto en paralelo como tangenciales a la superficie de la membrana y se separa en una corriente de retenido (también llamado reciclo o concentrado) y una corriente de permeado. Para mantener una membrana eficaz, la corriente de alimentación debe circular, a una velocidad suficientemente alta, paralela a la superficie de la membrana para crear fuerzas de cizallamiento y/o turbulencia para barrer partículas que se acumulan rechazadas por la membrana. Así, la filtración de flujo a través implica el flujo de tres corrientes -- alimentación, permeado y retenido. A diferencia, un "extremo muerto" o filtro "profundo" tiene solo dos corrientes -- alimentación y filtrado (o permeado). La corriente de reciclo o retenido, que retiene todas las partículas y moléculas grandes rechazadas por la membrana, puede recircularse enteramente al módulo de membrana en el que se genera la corriente de reciclo, o puede eliminarse parcialmente del sistema. Cuando los

métodos de la invención se usan para purificar azúcares de nucleótido de componentes de menor peso molecular, por ejemplo, los azúcares de nucleótido deseados están contenidos en la corriente de retenido (o corriente de alimentación, para un filtro profundo), mientras que la corriente de permeado contiene los contaminantes eliminados.

5 Los métodos de purificación de la invención pueden optimizarse adicionalmente ajustando la presión, velocidad de flujo y temperatura a la que se lleva a cabo la filtración. UF, NF y RO generalmente requieren presiones cada vez mayores por encima de la ambiental para vencer la presión osmótica de la disolución que se pasa a través de la membrana. Pueden seguirse las instrucciones de los fabricantes de membranas en cuanto a las presiones de operación máximas y recomendadas, con optimización adicional posible por la preparación de ajustes incrementales. Por ejemplo, la presión recomendada para UF estará generalmente entre aproximadamente 25 y 10 aproximadamente 100 psi, para NF entre aproximadamente 50 psi y aproximadamente 1500 psi y para RO entre aproximadamente 100 y aproximadamente 1500 psi. Las velocidades de flujo de tanto el concentrado (disolución de alimentación) como el permeado también pueden ajustarse para optimizar la purificación deseada. De nuevo, las recomendaciones del fabricante para una membrana particular sirven de punto de partida del que empezar para el proceso de optimización por la preparación de ajustes incrementales. Velocidades de flujo típicas para el concentrado (P_c) estarán entre aproximadamente 1 y aproximadamente 15 galones por minuto (GPM) y más preferentemente entre aproximadamente 3 y aproximadamente 7 GPM. Para el permeado, las velocidades de flujo (P_f) de entre aproximadamente 0,05 GPM y aproximadamente 10 GPM son típicas, prefiriéndose velocidades de flujo entre aproximadamente 0,2 y aproximadamente 1 GPM. La temperatura a la que la purificación se lleva a cabo también puede influir en la eficiencia y velocidad de la purificación. Temperaturas de entre aproximadamente 0 y aproximadamente 100 °C son típicas, siendo las temperaturas entre aproximadamente 20 y 40 °C preferidas para la mayoría de las aplicaciones. Las mayores temperaturas pueden producir, para algunas membranas, un aumento en el tamaño de poro de la membrana, proporcionando así un parámetro adicional que puede ajustarse para optimizar una purificación.

25 En una realización preferida, la filtración se realiza en una máquina de purificación en membrana que proporciona un medio para automatizar el control de la velocidad de flujo, presión, temperatura y otros parámetros que pueden afectar la purificación. Por ejemplo, la máquina de purificación en membrana Osmonics 213T es adecuada para su uso en los métodos de la invención, ya que son máquinas fabricadas por otras empresas enumeradas anteriormente.

Las membranas pueden limpiarse fácilmente tanto después de uso como después de disminuir la permeabilidad de la membrana. La limpieza puede efectuarse a una temperatura ligeramente elevada si así se desea, aclarando con agua o una disolución cáustica. Si las corrientes contienen pequeñas cantidades de enzima, es útil el aclarado en presencia de pequeñas cantidades de tensioactivo, por ejemplo, ULTRASIL. Por tanto, pueden usarse prefiltros (100-200 μm) para proteger las membranas de nanofiltración más caras. Pueden usarse otros agentes de limpieza, si se desea. La elección del método de limpieza dependerá de la membrana que se limpie y deben consultarse las instrucciones del fabricante de la membrana. La limpieza puede llevarse a cabo con un lavado hacia delante o un lavado hacia atrás.

40 Los métodos de purificación de la invención pueden usarse solos o en combinación con otros métodos para purificar hidratos de carbono. Por ejemplo, puede usarse una resina de intercambio iónico para eliminar iones particulares de una mezcla que contiene un azúcar de nucleótido de interés, tanto antes como después de la nanofiltración/ósmosis inversa, o tanto antes como después de la filtración. El intercambio iónico es particularmente deseable si se desea eliminar iones tales como fosfato y nucleótidos que quedan después de una primera ronda de nanofiltración u ósmosis inversa. En el caso de la síntesis de sialil-lactosa como se trata anteriormente, esto puede llevarse a cabo, por ejemplo, añadiendo una resina de intercambio iónico tal como AG1X-8 (forma de acetato, BioRad; véase, por ejemplo, el catalogo de BioRad para otras resinas de intercambio iónico) a un retenido que está a aproximadamente pH 3 o inferior hasta que la concentración de fosfato se reduzca según se desee. En este proceso se libera ácido acético, de manera que puede desearse seguir el intercambio iónico con una purificación adicional mediante el sistema de nanofiltración o de ósmosis inversa. Por ejemplo, puede hacerse circular disolución a pH 3 o inferior a través de una membrana Osmonics MX07 o similar hasta que la conductividad del permeado sea baja y se estabilice. El pH de la disolución puede entonces elevarse a aproximadamente 7, por ejemplo, 7,4, con NaOH y recircularse la disolución a través de la misma membrana para eliminar el acetato sódico y la sal restantes. Los cationes pueden eliminarse de una manera similar; por ejemplo, para eliminar Mn^{2+} , puede usarse una resina de intercambio iónico ácida, tal como AG50WX8 (H^+) (BioRad).

Filtración

60 En una realización, tras la síntesis, un disolución de azúcar de nucleótido se clarifica opcionalmente por filtración. La disolución de azúcar de nucleótido pasa a través de un filtro de membrana (por ejemplo, un filtro de bolsa) en el que las sales contaminantes y otros contaminantes no deseados se separan por filtración de la disolución de azúcar de nucleótido. La etapa de clarificación puede incorporarse en cualquier etapa del proceso. En una realización preferida, la disolución de azúcar de nucleótido se clarifica después de la síntesis del azúcar de nucleótido. La disolución de azúcar de nucleótido puede clarificarse una o más veces.

En un ejemplo, la disolución de azúcar de nucleótido se purifica usando filtración en fibra hueca. La filtración en fibra hueca elimina, por ejemplo, proteínas introducidas por la preparación de enzima del azúcar de nucleótido. La membrana de fibra hueca retiene proteínas de la preparación de enzima mientras que permite el paso de la disolución de azúcar de nucleótido a través de la membrana. En una realización a modo de ejemplo, la membrana de fibra hueca comprende una membrana de fibra hueca con un bastidor de filtración tangencial. La etapa de filtración en fibra hueca puede incorporarse en cualquier etapa del proceso. En una realización, la disolución de azúcar de nucleótido pasa por la filtración en fibra hueca después de la clarificación. En otra realización, la disolución de azúcar de nucleótido pasa por la filtración en fibra hueca después de la síntesis del azúcar de nucleótido. La disolución de azúcar de nucleótido puede filtrarse una o más veces usando filtración en fibra hueca.

En otra realización, la disolución de azúcar de nucleótido se purifica usando nanofiltración. La nanofiltración elimina sales y otros componentes de bajo peso molecular de una mezcla. Las membranas de nanofiltración separan moléculas basándose en el peso molecular y la carga iónica. Los cortes de peso molecular para moléculas no ionizadas normalmente están en el intervalo de 100-20.000 daltons. En una aplicación a modo de ejemplo, los sacáridos de interés serán retenidos por la membrana de nanofiltración y las sales contaminantes y otros componentes no deseados pasarán a través. La etapa de nanofiltración puede incorporarse en cualquier etapa del proceso. En una realización, la disolución de azúcar de nucleótido pasa por filtración en fibra hueca primero y luego nanofiltración. En otra realización, la disolución de azúcar de nucleótido pasa por nanofiltración primero y luego filtración en fibra hueca. Alternativamente, la disolución de azúcar de nucleótido puede purificarse usando tanto filtración en fibra hueca como nanofiltración. En otra realización, la disolución de azúcar de nucleótido pasa por nanofiltración después de la clarificación. En otra realización más, la disolución de azúcar de nucleótido pasa por nanofiltración después de la síntesis del azúcar de nucleótido. La disolución de azúcar de nucleótido puede filtrarse una o más veces usando nanofiltración. Después de la nanofiltración, la disolución de azúcar de nucleótido purificada puede generalmente almacenarse o puede someterse a más purificación.

En otra realización, la disolución de azúcar de nucleótido puede opcionalmente decolorarse (por ejemplo, pasando la disolución sobre carbono activo). En una realización preferida, la decoloración implica pasar la disolución de azúcar de nucleótido sobre una columna de carbono activo previamente rellena unida a un sistema de cromatografía. La decoloración puede incorporarse en cualquier etapa del proceso. En una realización, la disolución de azúcar de nucleótido se decolora después de la nanofiltración. En otra realización, la disolución de azúcar de nucleótido se decolora después de la filtración en fibra hueca. En otra realización más, la disolución de azúcar de nucleótido se decolora después de la clarificación. La disolución de azúcar de nucleótido puede decolorarse una o más veces.

En otra realización, la disolución de azúcar de nucleótido se purifica usando un filtro de medio profundo cargado. El filtro de medio profundo cargado elimina, por ejemplo, endotoxinas de la disolución de azúcar de nucleótido. Las endotoxinas son compuestos naturales tóxicos tales como lipopolisacáridos encontrados dentro de patógenos sobre la pared celular externa de bacterias. La purificación por un filtro de medio profundo cargado puede incorporarse en cualquier etapa del proceso. En una realización, la disolución de azúcar de nucleótido se filtra después de la decoloración. En otra realización, la disolución de azúcar de nucleótido se purifica por un filtro de medio profundo cargado después de la nanofiltración. En otra realización más, la disolución de azúcar de nucleótido se purifica por un filtro de medio profundo cargado después de la filtración en fibra hueca. En otra realización, la disolución de azúcar de nucleótido se purifica por un filtro de medio profundo cargado después de la clarificación. En otra realización, la disolución de azúcar de nucleótido se purifica por un filtro de medio profundo cargado después de la síntesis del azúcar de nucleótido. La disolución de azúcar de nucleótido puede filtrarse una o más veces usando un filtro de medio profundo cargado.

En otra realización, la disolución de azúcar de nucleótido se purifica usando un filtro estéril. El filtro estéril elimina sales contaminantes y otros contaminantes no deseados de la disolución de azúcar de nucleótido. En una realización más preferida, el filtro estéril está previamente cargado y esterilizado con un sistema de colectores de bolsa para la filtración y almacenamiento final. La purificación por un filtro estéril puede incorporarse en cualquier etapa del proceso. En una realización, la disolución de azúcar de nucleótido se filtra por un filtro estéril después de la purificación por un filtro de medio profundo cargado. En otra realización, la disolución de azúcar de nucleótido se purifica por un filtro estéril después de la decoloración. En otra realización más, la disolución de azúcar de nucleótido se purifica por un filtro estéril después de la nanofiltración. En otra realización, la disolución de azúcar de nucleótido se purifica por un filtro estéril después de la filtración en fibra hueca. En otra realización, la disolución de azúcar de nucleótido se purifica por un filtro estéril después de la clarificación. En otra realización, la disolución de azúcar de nucleótido se purifica por un filtro estéril después de la síntesis del azúcar de nucleótido. La disolución de azúcar de nucleótido puede filtrarse una o más veces usando un filtro estéril.

Los siguientes ejemplos se ofrecen únicamente para los fines de ilustración y no está previsto ni que limiten ni que definan la invención. Los siguientes ejemplos describen procesos para la producción de CMP-SA-PEG. Este enfoque es para claridad de ilustración y no debe interpretarse como limitante del proceso. Un experto en la materia apreciará que los procesos descritos se aplican igualmente a azúcares de nucleótido modificados que incluyen nucleótidos y restos de azúcar distintos de CMP y ácido siálico, respectivamente.

Ejemplos

General:

5 Procesos de fabricación previos para la producción de CMP-SA-PEG (por ejemplo, CMP-SA-PEG-10 kDa, CMP-SA-PEG-20 kDa y CMP-SA-glicerol-PEG-40 kDa) utilizaron cromatografía de fase inversa (por ejemplo, resinas C-4). Un proceso conocido a modo de ejemplo incluye hidrólisis básica, seguido de TFF, seguido de neutralización del pH, seguido de cromatografía de fase inversa, seguido de desalación, seguido de eliminación del disolvente (por ejemplo, evaporación rotatoria) y liofilización. Se encontró que este proceso no era adecuado para aplicaciones a gran escala (producción de cantidades de kg) debido en gran parte a las limitaciones asociadas a la etapa de cromatografía de fase inversa (por ejemplo, alto coste de la resina, la disponibilidad de columnas de C-4 a escala comercial previamente rellenas, requisito de usar disolventes orgánicos), además de la incapacidad de este enfoque para separar completamente todos los contaminantes de reacción. Por tanto, se desarrolló un proceso de producción simplificado alternativo para tratar los inconvenientes anteriormente descritos y, particularmente, para reducir el número de operaciones unitarias.

Un proceso mejorado a modo de ejemplo se representa en la Figura 1. En una realización, el proceso mejorado incorpora solo cinco operaciones unitarias. Éstas incluyen la reacción de acoplamiento (PEGilación) para formar CMP-SA-PEG, evaporación rotatoria para eliminar esencialmente el THF, cromatografía de intercambio aniónico (etapa de purificación), desalación/concentración/diafiltración usando TFF y liofilización para formar un producto sólido. Cada etapa, excepto la liofilización, se optimizó para mejorar el rendimiento del proceso, que proporciona CMP-SA-PEG con alta pureza.

Los rendimientos de conversión para la reacción de acoplamiento oscilaron del 67-99 % dependiendo del tamaño del PEG. El rendimiento de la etapa para la cromatografía AEX osciló del 95-99 % y la etapa de TFF del 90-95 % y esencialmente elimina todos los contaminantes que se originaron de la reacción de acoplamiento, que incluye SA-PEG. Las recuperaciones de producto global para las operaciones unitarias de reacción combinada, rotoevaporación, intercambio iónico, TFF y liofilización estuvieron entre aproximadamente el 65 y el 77 %. Los CMP-SA-PEG producidos por el nuevo proceso tuvieron purezas de entre aproximadamente el 90 y el 95 %, los análisis de RMN ¹H de los productos finales no mostraron evidencia de impurezas de SA-PEG. El análisis de ICP indicó que el producto estaba en la forma de sal de sodio y no contuvo sales de sodio adicionales.

Métodos y materiales

35 Se obtuvieron Q Sepharose Big Beads de GE Healthcare. Se obtuvo la sal de sodio de CMP-SA-glicina de AMRI. Se obtuvo mPEG-carbonato de *p*-nitrofenilo de 10 kDa de Dow Chemical Company. mPEG-carbonato de *p*-nitrofenilo de 40 kDa se obtuvo de NOF.

40 Generalmente se usó el siguiente equipo: Bomba peristáltica (motor estándar digital Masterflex L/S, de Cole-Palmer, cabezal de la bomba easy-load II); bomba peristáltica (motor de consola Masterflex, de Cole-Palmer, cabezal de la bomba easy-load I); FPLC (GE Healthcare, ÅKTA FPLC); bomba A y B de HPLC (Dynamax, SD-1); detector de HPLC (Dynamax, UV-C); detector de HPLC (Varian, ProStar modelo 340); detector de ELS (S.E.D.E.R.E. France, Sedex 55), liofilizador (VirTis, 6K Benchtop); columna de intercambio iónico (4 l) (Sepracor SA, 285530, 180 x 300 mm); columna de intercambio iónico (12 ml) (Biovalve, Inc., Omnifit, 006CC-10-50-AF, 10 x 250 mm); columna de intercambio iónico (2 l) (GE Healthcare, columna BPG 100/500, 18-1103-01); columna de intercambio iónico (100 ml) (GE Healthcare, XK 26/40, 18-8768-01); medidor de conductividad (Fisher Thermo Electron Corporation, Accumet Basic AB30, Orion 4 star); pH-metro (Orion modelo 250A0); bomba de desplazamiento positivo (Teknoflow Inc., Labtop (300/350)); membrana Pellicon 2 Standard 1K, celulosa regenerada (Millipore, P2PLACV01; membrana de celulosa regenerada de 1 kDa; 0,1 m²; tamiz en V); membrana Pellicon 2 Standard 3K, celulosa regenerada (Millipore, P2PLBCV01; membrana de celulosa regenerada de 3 kDa; 0,1 m²; tamiz en V); membrana Pellicon 2 Standard 5K, celulosa regenerada (Millipore, P2C005C01; membrana de celulosa regenerada de 5 kDa; 0,1 m²; tamiz en C); membrana Pellicon 2 Standard 1K, celulosa regenerada (Millipore, P2PLACC01; membrana de celulosa regenerada de 1 kDa; 0,1 m²; tamiz en C); membrana Pellicon 2 Standard 1K, celulosa regenerada (Millipore, P2PLACV05; membrana de celulosa regenerada de 1 kDa; 0,5 m²; tamiz en V).

55 NWP = permeabilidad al agua normalizada; GSC = CMP-SA-glicina; PSC = CMP-SA-PEG-20 kDa

Se registraron los espectros de RMN ¹H (500 MHz, 800 MHz) en D₂O. Los desplazamientos químicos se expresan en partes por millón con respecto al pico de agua.

60 Las mezclas que contienen CMP-SA-PEG se analizaron usando HPLC de fase inversa (por ejemplo, determinaciones de pureza y de recuperación). A continuación se describe un método a modo de ejemplo: Se unió una columna Chromolith Performance RP18 (VWR o Phenomenex) a un sistema de HPLC de Beckman. Las muestras se inyectaron mediante inyector automático (10 °C) sobre la columna mantenida a 35 °C. La columna se eluyó a una velocidad de flujo de 5,0 ml/min, bajo las siguientes condiciones en gradiente (eluyente A: fosfato de potasio 20 mM, TABHS 1 mM, pH=6,2; eluyente B: 100 % de acetonitrilo): 0,5 % de B durante 2 minutos, seguido

de una serie de gradientes lineales al 20 % de B durante 2 minutos y al 40 % de B durante 8 minutos y una elución isocrática final al 40 % de B durante 7 minutos. La columna se re-equilibró al 0,5 % de B durante 3 minutos proporcionando un tiempo de análisis total de 22 minutos. Los picos eluidos se detectaron a 271 nm. Se usaron GSC y CMP-SA-PEG-10 kDa (AMRI) como tiempo de retención y patrones de calibración. Se usaron patrones de GSC (AMRI) para determinar una curva patrón, para calcular concentraciones de CMP-SA-PEG-10 kDa. La pureza de estos patrones se determinó por análisis de RMN cuantitativa.

Se determinó el contenido de sodio de muestras purificadas y desaladas de CMP-SA-PEG por análisis de plasma inductivamente acoplado (ICP).

Ejemplo 1:

Preparación de CMP-SA-PEG

1.1. Preparación de CMP-SA-PEG-10 kDa

Se disolvió sal de disodio del ácido citidina-5'-monofosfo-N-glucilsiálico (CMP-SA-glicina) (1,23 g, 73,5 % en peso puro, 1,34 mmoles) en agua Milli Q (80 ml) en un matraz redondo de una sola boca de 1 l. El pH de la disolución incolora fue 10,48. Se añadió THF anhidro (320 ml) y el pH se ajustó a 8,6 por la adición gota a gota de 5,5 ml de disolución 500 mM de monofosfato de sodio (pH 4,6). Entonces se añadió mPEG-carbonato de *p*-nitrofenilo de 10 kDa (20 g, 2,0 mmoles, 1,5 eq.) en una porción a la disolución de reacción. Después de disolverse el reactivo de PEG, el pH de la disolución fue 8,7. La disolución amarilla se agitó a 20 °C durante 21 h. A continuación, el pH de la mezcla de reacción se ajustó de 7,8 a 8,5 mediante la adición de NaOH 0,1 M (4,0 ml). La mezcla de reacción se agitó 3 horas adicionales y el THF se eliminó mediante evaporación a presión reducida a 30 °C usando un evaporador rotatorio. La evaporación se detuvo cuando el volumen del líquido recogido fue superior a 320 ml. La disolución amarilla resultante se diluyó con agua Milli Q (400 ml) y la disolución se filtró a través de una unidad de filtro Nalgene de 1 l de 0,22 micrómetros usando un vacío para eliminar cualquier material insoluble. El volumen final del filtrado amarillo fue 684 ml y tuvo una conductividad de 0,97 mS/cm. El rendimiento de la conversión como se determinó por HPLC fue del 82 % (Tabla 1, lote 9).

1.2. Preparación de CMP-SA-PEG-20 kDa

Se disolvió sal de disodio del ácido citidina-5'-monofosfo-N-glucilsiálico (CMP-SA-glicina) (0,61 g, 73,5 % en peso, 0,656 mmoles) en agua Milli Q (40 ml) en un matraz redondo de una sola boca de 500 ml. El pH de la disolución incolora fue 10,5. Se añadió THF anhidro (160 ml) a la disolución con agitación y el pH se ajustó a 8,5 (desde 11,2) por la adición gota a gota de 2,0 ml de disolución 500 mM de monofosfato de sodio (pH 4,6). Se añadió el mPEG-carbonato de *p*-nitrofenilo de 20 kDa (20,0 g, 1,0 mmol, 1,5 eq.) en una porción a la disolución de reacción. Después de disolverse el PEG, el pH de la disolución fue 8,6. La mezcla amarilla se agitó a 20 °C durante 21 horas. El pH de la mezcla de reacción se ajustó con NaOH (1,0 N, 2,0 ml) a 8,5 y la mezcla de reacción se agitó durante 18 horas adicionales. El THF se eliminó mediante evaporación rotatoria usando presión reducida a 35 °C en un evaporador rotatorio. La evaporación se detuvo cuando el volumen del líquido recogido fue superior a 160 ml. La disolución amarilla resultante se diluyó con agua Milli Q (300 ml) y la disolución se filtró a través de una unidad de filtro de Nalgene de 1 l de 0,22 micrómetros usando vacío para eliminar cualquier material insoluble. El volumen final de la disolución amarilla fue 476 ml y tuvo una conductividad de 0,725 mS/cm a pH 7,21. El rendimiento de la conversión como se determinó por HPLC fue del 87 % (Tabla 5, Ejemplo 2).

1.3. Preparación de CMP-SA-glicerol-PEG-40 kDa

Se disolvió sal de disodio del ácido citidina-5'-monofosfo-N-glucilsiálico (CMP-SA-glicina) (368 mg, 73,5 % en peso puro, 0,40 mmoles) en 40 ml de agua Milli Q en un matraz redondo de una sola boca de 500 ml. Se añadió THF anhidro (160 ml) a la disolución con agitación. El pH de la mezcla se ajustó cuidadosamente de 11,5 a 8,6 mediante la adición gota a gota de 2,0 ml de disolución 500 mM de monofosfato de sodio (pH 4,6). Se añadió el mPEG-carbonato de *p*-nitrofenilo de 40 kDa (20,96 g, 90 % de activación, 0,44 mmoles, 1,1 eq.) a la mezcla de reacción en una porción. Después de 20 horas, el pH de la mezcla de reacción se ajustó de 8,31 a 8,82 mediante la adición de 1,4 ml de disolución 0,1 N de NaOH. Después de 22 horas adicionales, se añadieron aproximadamente 0,8 ml de NaOH 0,1 N para llevar el pH de la mezcla de 8,52 a 8,89. Después de otras 24 horas (tiempo total de reacción 66 horas), el THF se eliminó usando un evaporador rotatorio a presión reducida usando una temperatura del baño de agua inferior a 35 °C. La evaporación se detuvo cuando el volumen del líquido recogido fue superior a 160 ml. La disolución amarilla resultante se diluyó con 600 ml de agua Milli Q y se filtró a través de un filtro Nalgene de 1 l de 0,22 micrómetros con una bomba de vacío. El filtro se aclaró con aproximadamente 50 ml de agua Milli Q. El volumen final de la disolución de filtrado amarilla fue 678 ml y tuvo una conductividad de 0,40 mS/cm con un pH de 7,25. El rendimiento de la conversión fue del 57 % por HPLC (Tabla 6, Ejemplo 5). La mezcla de reacción se fraccionó en dos porciones iguales de 335 ml. Una porción se purificó como se describe más adelante.

Ejemplo 2:**Cromatografía de intercambio aniónico de CMP-SA-PEG****5 2.1. Procedimiento de relleno de la columna para resina Q-Sepharose Big Beads (escala de 2 l)**

Las columnas se prepararon según instrucciones del fabricante. A continuación se describe un procedimiento representativo:

10 Se inspeccionó una columna de cromatografía GE BPG 100/500 vacía para limpieza e integridad estructural. La frita inferior se humedeció con agua. Se taponó la salida de la columna y se vertieron 1-2 cm de agua en el fondo de la columna. Se resuspendió suspensión de resina Q-Sepharose Big Beads en 20 % de etanol (aproximadamente 3,2 l, 65 %) para asegurar la homogeneidad. La suspensión de resina se vertió lentamente hacia abajo dentro de la columna para prevenir el atrapamiento de aire. Después de transferirse la suspensión de resina a la columna, el interior de la columna se aclaró usando un frasco lavador que contenía 20 % de etanol. La resina se dejó sedimentar durante aproximadamente 30 minutos, asegurándose de que la altura de la resina fuera aproximadamente 3-5 cm superior a la altura deseada de 25 cm (añadir más resina si fuera necesario). El adaptador de flujo se llenó con agua y se dispuso en la columna. Se tuvo cuidado para asegurarse que no quedara atrapado aire entre el adaptador de flujo y el líquido. Se abrió la salida de la columna y el adaptador de flujo se ajustó descendientemente para descansar suavemente sobre el lecho. La entrada se conectó a la bomba de HPLC Dynamax SD-1. Se puso en marcha la bomba y se aumentó lentamente hasta la velocidad de flujo objetivo de 200 ml/min (la velocidad de flujo puede aumentarse en varios cambios incrementales con tiempo de mantenimiento de 2 min). Después de consolidarse completamente el lecho, la bomba se apagó. El adaptador de flujo se ajustó descendientemente sobre el lecho hasta que la resistencia fue tal que el adaptador ya no pudo seguir funcionando. Se cerró la salida de la columna. Se marcó la altura de la resina (25,4 cm). Lista para su uso, la columna se lavó primero con 4 l de agua de RO desgasificada para eliminar el 20 % de etanol de la suspensión de resina. Se cargó con NaOH (2 VC, a 100 ml/min, tiempo de residencia de 40 min) para desinfectar la columna y generar la forma de hidróxido de la resina, se lavó con agua de RO (2 VC, a 200 ml/min) y a continuación se cargó con bicarbonato sódico 1 M (3 VC, 200 ml/min) para generar la forma de contraión de bicarbonato como se ha descrito anteriormente.

30 2.2. Purificación en Q-Sepharose Big Beads de CMP-SA-PEG-10 kDa

En una columna BPG 100/500, se rellenaron 2,0 l de resina de intercambio aniónico Q-Sepharose Big Beads (forma de cloruro; 10 cm de DI x 26 cm) como se ha descrito anteriormente y se conectó a un sistema de HPLC Dynamax SD-1 equipado con un detector de UV que puede leer tanto a 214 como a 271 nm. La columna se lavó con 2 VC (4 l) de agua desgasificada a 100 ml/min (76 cm/h) para eliminar el 20 % de la disolución de relleno de etanol. A continuación, la columna se desinfectó lavando con NaOH 1 M (2 VC, 4 l, 100 ml/min, 76 cm/h) y a continuación se convirtió en la forma de sal de bicarbonato lavando entonces con agua de RO (2 VC, 4 l, 200 ml/min, 130 cm/h) seguido de NaHCO₃ 1 M (3 VC, 6 l, 200 ml/min, 130 cm/h) y finalmente con agua de RO (3 VC, 6 l, 200 ml/min, 130 cm/h). La conductividad del efluente de la columna fue ≤10 microS/cm (pH 4,5-6) cuando se completó.

La mezcla de reacción acuosa de CMP-SA-PEG-10 kDa según el Ejemplo 1.1 (684 ml, pH 7,27, conductividad 0,97 mS/cm) se cargó sobre la columna a una velocidad de flujo de 65 ml/min (50 cm/h). Después de completarse la carga, la columna se lavó con 4 l (2 VC) de agua de RO a una velocidad de flujo de 130 ml/min (100 cm/h) hasta que todas las impurezas de no unión se habían lavado de la columna y la señal de UV (271 y 214 nm) volvió al nivel inicial. Se usó una elución en etapas para obtener el producto. La impureza SA-PEG eluyó primero (tiempo de retención de 55 min) de la columna usando 1,2 l (0,6 VC) de NaHCO₃ 5 mM a una velocidad de flujo de 130 ml/min (100 cm/h) como se muestra en la Figura 4. A continuación, se aumentó la concentración del tampón de elución y el producto se eluyó (tiempo de retención de 63 min) con 6 l (3 VC) de NaHCO₃ 30 mM a una velocidad de flujo de 100 cm/h. A continuación se eluyeron el exceso de CMP-SA-glicina y otros subproductos de reacción de la columna usando 14 l (7 VC) de NaHCO₃ 1 M antes de la regeneración de la columna. La elución de la columna se monitorizó usando UV a tanto 214 nm como a 271 nm y las fracciones apropiadas se recogieron manualmente (Figura 4). La fracción de producto empezó cuando la lectura de UV271 subió por encima de la línea de base tras la elución del pico de impurezas de SA-PEG y terminó en aproximadamente el 5 % del máximo del pico en el lado trasero del pico de producto. La fracción que contenía producto (fracción 1, 2,0 l) se fraccionó en dos porciones. Se usaron aproximadamente 500 ml para optimizar la etapa de filtración de flujo tangencial (TFF) mientras que los 1,5 l restantes se procesaron por el procedimiento de TFF optimizado como se describe más adelante.

60 2.3. Purificación en Q-Sepharose Big Beads de CMP-SA-PEG-20 kDa

En una columna BPG 100/500, se rellenaron 2,0 l de resina de intercambio aniónico Q-Sepharose Big Beads (forma de cloruro; 10 cm de DI x 26 cm) como se ha descrito anteriormente y se conectó a un sistema de HPLC Dynamax SD-1 equipado con un detector de UV que puede leer tanto a 214 como a 271 nm. La columna se lavó con 2 VC (4 l) de agua desgasificada a 100 ml/min (76 cm/h) para eliminar el 20 % de la disolución de relleno de etanol. A continuación, la columna se desinfectó lavando con NaOH 1 M (2 VC, 4 l, 100 ml/min, 76 cm/h) y a continuación se convirtió en la forma de bicarbonato lavando entonces con agua de RO (2 VC, 4 l, 200 ml/min, 153 cm/h) seguido de

NaHCO₃ 1 M (3 VC, 6 l, 200 ml/min, 153 cm/h) y agua de RO (3 VC, 6 l, 200 ml/min, 153 cm/h). La conductividad del efluente de la columna fue ≤10 microS/cm (pH 4,5-6) cuando se completó.

Se cargó la mezcla de reacción de CMP-SA-PEG-20 kDa según el Ejemplo 1.2 (476 ml, pH 7,21, conductividad 0,725 mS/cm) sobre la columna preparada a una velocidad de flujo de 65 ml/min (50 cm/h). Después de completarse la carga, la columna se lavó con 4 l (2 VC) de agua de RO a una velocidad de flujo de 130 ml/min (100 cm/h) hasta que todas las impurezas de no unión se habían lavado de la columna y la señal de UV (217 y 271 nm) volvió al nivel inicial. El producto se eluyó usando una elución en etapas. La impureza SA-PEG se eluyó primero (tiempo de retención de 55 min) de la columna usando 2,0 l (1,0 VC) de NaHCO₃ 2 mM a una velocidad de flujo de 130 ml/min (100 cm/h) como se muestra en la Figura 6. A continuación se aumentó la concentración del tampón de elución y el producto se eluyó (tiempo de retención de 75 min) con 6 l (3 VC) de NaHCO₃ 30 mM a una velocidad de flujo de 130 ml/min (100 cm/h). A continuación se eluyeron el exceso de CMP-SA-glicina y otros subproductos de reacción de la columna usando 14 l (7 VC) de NaHCO₃ 1 M antes de la regeneración de la columna. La elución de la columna se monitorizó por absorción UV a tanto 214 nm como a 271 nm y se recogieron las fracciones apropiadas (Figura 6). La fracción de producto empezó cuando la lectura de UV271 subió por encima de la línea de base tras la elución del pico de impurezas de SA-PEG y terminó en aproximadamente el 5 % del máximo del pico en el lado trasero del pico de producto. La fracción que contenía producto (fracción 1, 2,0 l) se usó para la siguiente etapa.

2.4. Purificación en Q-Sepharose Big Beads de CMP-SA-glicerol-PEG-40 kDa

En una columna BPG 100/500, se rellenaron 2,0 l de resina de intercambio aniónico Q-Sepharose Big Beads (forma de cloruro; 10 cm de DI x 26 cm) como se ha descrito anteriormente y se conectó a un sistema de HPLC Dynamax SD-1 equipado con un detector de UV que puede leer tanto a 214 como a 271 nm. La columna se lavó con 2 VC (4 l) de agua desgasificada a 100 ml/min (76 cm/h) para eliminar el 20 % de la disolución de relleno de etanol. A continuación, la columna se desinfectó lavando con NaOH 1 M (2 VC, 4 l, 100 ml/min, 76 cm/h) y a continuación se convirtió en la forma de bicarbonato lavando entonces con agua de RO (2 VC, 4 l, 200 ml/min, 153 cm/h) seguido de NaHCO₃ 1 M (3 VC, 6 l, 200 ml/min, 153 cm/h) y agua de RO (3 VC, 6 l, 200 ml/min, 153 cm/h). La conductividad del efluente de la columna fue ≤10 microS/cm (pH 4,5-6) cuando se completó.

Se cargó la mezcla de reacción según el Ejemplo 1.3 (335 ml, pH 7,25, conductividad 0,40 mS/cm) sobre la columna preparada a una velocidad de flujo de 40 ml/min (30,6 cm/h). Después de completarse la carga, el recipiente se aclaró con aproximadamente 500 ml de agua y la disolución se cargó sobre la columna. A continuación, la columna se lavó con 4 l (2 VC) de agua de RO a una velocidad de flujo de 200 ml/min (153 cm/h) hasta que todas las impurezas de no unión se habían lavado de la columna y la señal de UV volvió al nivel inicial (217 y 271 nm). El producto se eluyó usando una elución en etapas. La impureza de SA-PEG se eluyó primero (tiempo de retención de 44 min) de la columna usando 2,0 l (1,0 VC) de NaHCO₃ 2 mM a una velocidad de flujo de 200 ml/min (153 cm/h) como se muestra en la Figura 7. A continuación se aumentó la concentración del tampón de elución y el producto se eluyó (tiempo de retención de 47 min) con 6 l (3 VC) de NaHCO₃ 20 mM a una velocidad de flujo de 200 ml/min (153 cm/h). La elución de la columna se monitorizó por absorción UV a tanto 214 nm como a 271 nm y se recogieron las fracciones apropiadas (Figura 7). La fracción de producto empezó cuando la lectura de UV271 subió al 20 % de la absorbancia máx del pico de producto (permitiendo la eliminación del hombro de la impureza SA-PEG) y terminó en aproximadamente el 5 % del máximo del pico en el lado trasero del pico de producto principal. Las fracciones que contenían producto se reunieron (4,05 l, pH=7,4, 1218 microS/cm) y se usaron para la siguiente etapa.

Ejemplo 3:

Desalación usando ultrafiltración

3.1. Filtración de flujo tangencial del grupo de productos de CMP-SA-glicerol-PEG-10 kDa

Se desalaron 1,5 l de grupos de producto en Q Sepharose Big Beads según el Ejemplo 2.2 por filtración de flujo tangencial (TFF) usando los parámetros de proceso resumidos en la Tabla 1, a continuación. Se conectó una bomba peristáltica Masterflex L/S con tubos flexibles de silicona (L/S 24) a un mini-soporte Pellicon-2 de Millipore equipado con tres "MINI" filtros Pellicon 2 de 1 kDa de Millipore (membrana de celulosa regenerada de 1 kDa PLAC-V; tipo de tamiz: V; 0,1 m²). Se transfirieron aproximadamente 500 ml de la disolución acuosa de producto a una botella de PETG de 500 ml, que se sumergió en un baño de hielo. La disolución se agitó usando una barra de agitación magnética y la temperatura se monitorizó y se mantuvo a 14-16 °C durante todo el proceso. Tanto la línea de alimentación como la línea de retenido se dispusieron dentro de la botella de PETG sobre el sistema de TFF. El 1 l restante de disolución, también enfriado usando un baño de hielo, se alimentó en la botella de PETG mediante otro tubo flexible de silicona (L/S 25) usando una segunda bomba peristáltica Masterflex. La velocidad de flujo de transferencia de la segunda bomba se estableció igual a la velocidad de flujo del permeado del proceso de TFF con el fin de mantener un volumen constante en la botella de PETG. La disolución de permeado se recogió como fracciones en una probeta graduada a 250 ml y cada 250 ml de disolución recogida se transfirieron a botellas de almacenamiento. La velocidad de flujo inicial de la bomba peristáltica se estableció a 1200 ml/min y la válvula de retenido se ajustó para mantener una TMP constante (~22 psi) durante todo el proceso. La disolución de permeado se muestreó cada 250 ml de volumen y se registraron el pH y la conductividad. La velocidad de flujo del permeado

también se registró manualmente. Una vez se habían concentrado los 1,5 l originales de la disolución de producto a un volumen total de aproximadamente 500 ml, se añadió agua de RO enfrida en la botella de retenido de PETG para mantener un volumen constante. La disolución de permeado se muestreó continuamente cada 500 ml. Una vez el volumen de permeado había alcanzado ~2000 ml y la conductividad de la disolución de permeado disminuyó a 47 microS/cm, se detuvo la bomba de transferencia. A continuación, la disolución de retenido se transfirió a otra botella de PETG (1 l). Entonces se añadió agua de RO (150 ml) a la botella de PETG de retenido y se re-circuló durante 5 min mediante el sistema de TFF. Éste eliminó el producto restante en el sistema. Entonces se combinaron la disolución de retenido original y la disolución de retenido de lavado. La recuperación de la etapa de TFF global de CMP-SA-PEG-10 kDa fue del 90 % basado en el análisis de HPLC (Tabla 2). La disolución de retenido combinada (488 ml, pH=7,31, 138 microS/cm) se liofilizó, proporcionando 7,15 g (rendimiento del proceso global 66 %) de un sólido blanco que era el 87 % puro por el presente método de análisis (Tabla 3). El producto liofilizado se analizó por RMN ¹H.

Tabla 1:

Parámetros de proceso optimizados para la operación unitaria de filtración de flujo tangencial (TFF) para CMP-SA-PEG (10 y 20 kDa)	
Membrana	Tres "MINI" filtros Millipore 1K Pellicon 2 de 0,1 m ² (membrana de celulosa regenerada PLAC 1K, tamiz de tipo V)
Área de la membrana, m ²	0,3
TMP	22 ± 1 psig
Flujo	3,7 LMH
Volumen de retenido (l)	500 ml (después de la concentración y durante toda la diafiltración)
Tampón de equilibrio/diafiltración	Agua de RO
Criterios de diafiltración	4 volúmenes de DF (2000 ml totales)
Tiempo de procesamiento total	aproximadamente 3 horas
Temperatura (°C)	≤ 16 °C (preferentemente 4-8 °C)
Condiciones de almacenamiento de la membrana	NaOH 0,1 M o 20 % de etanol

15

Tabla 2:

Resultados experimentales para la operación unitaria de filtración de flujo tangencial (TFF) para CMP-SA-PEG (10 kDa y 20 kDa)							
PEG	Área de la membrana (m ²)	NWP (l/h/psig/m ²)	Volumen de retenido (l)	Temp inicial/ final del retenido (°C)	pH del retenido	Conductividad (mcS/cm)	Recuperación (%)
10 kDa	0,1	0,20	0,15	21/23	6,6	112	96 %
10 kDa	0,3	0,17	0,5	16/15	7,3	138	90 %
20 kDa	0,3	0,17	0,5	14/16	7,8	110	112 %

20

25

En la Tabla 2, el volumen de retenido se midió después de la concentración y desalación de la disolución de alimentación inicial. La temperatura del retenido es la temperatura del retenido inicial medida al principio de la etapa de concentración y la temperatura del retenido final al final de la etapa de diafiltración. Se midió el pH del retenido después de la combinación del primer retenido (después de la concentración y diafiltración) con el retenido de lavado del sistema. La conductividad del retenido se midió después de la combinación del primer retenido (después de la concentración y diafiltración) y el retenido de lavado del sistema. La recuperación de producto global se determinó basándose en la cantidad total de producto en la disolución de alimentación del sistema en comparación con la cantidad de producto en los retenidos combinados finales (después de la concentración, diafiltración y el lavado del sistema).

Tabla 3:

Recuperaciones del proceso globales para CMP-SA-PEG (10 kDa y 20 kDa)			
Lote de proceso	Peso seco (g)	Pureza (%)	Recuperación global
CMP-SA-PEG-10 kDa	2,53	85,9 %	70 %
CMP-SA-PEG-10 kDa	7,15	87,0 %	64 %
CMP-SA-PEG-20 kDa	10,52	95,7 %	77 %

30

En la Tabla 3, el peso seco es el peso del sólido después de la liofilización. La pureza se determinó dividiendo la cantidad de producto en el producto liofilizado como se ha determinado por RP-HPLC entre la cantidad total de sólido en la muestra liofilizada (supuesta como la masa de producto de 10.600 Dalton para CMP-SA-PEG-10 kDa o 20.600 Dalton para CMP-SA-PEG-20 kDa). Se calcularon las recuperaciones globales para el proceso de producción (las etapas de reacción, evaporación de disolvente, purificación en AEX, concentración/diafiltración y liofilización) basándose en la relación de moles de producto obtenida dividida entre los moles del reactivo limitante (CMP-SA-Glu) usado en la reacción de acoplamiento multiplicado por la fracción del grupo de productos procesado x 100 %.

3.2. Filtración de flujo tangencial del grupo de productos de CMP-SA-glicerol-PEG-20 kDa

Se desaló el grupo de productos en Q Sepharose Big Beads según el Ejemplo 2.3 (2,0 l) por filtración de flujo tangencial usando los parámetros de proceso resumidos en la Tabla 1, anteriormente. Se conectó una bomba peristáltica Masterflex L/S con tubo flexible de silicona (L/S 24) a un mini-soporte Pellicon-2 de Millipore equipado con tres "MINI" filtros Pellicon 2 de 1 kDa de Millipore (membrana de celulosa regenerada de 1 kDa PLAC-V; tipo de tamiz: V; 0,1 m²). Se transfirieron aproximadamente 500 ml de la disolución acuosa de producto a una botella de PETG de 500 ml, que se sumergió en un baño de hielo. La disolución se agitó usando una barra de agitación magnética y la temperatura se monitorizó y se mantuvo a 4 °C durante todo el proceso. Tanto la línea de alimentación como la línea de retenido se dispusieron dentro de la botella de PETG sobre el sistema de TFF. Los 1,5 l restantes de disolución, también enfriados usando un baño de hielo, se alimentaron en la botella de PETG mediante otro tubo flexible de silicona (L/S 25) usando una segunda bomba peristáltica Masterflex. La velocidad de flujo de transferencia de la segunda bomba se estableció igual a la velocidad de flujo del permeado del proceso de TFF con el fin de mantener un volumen constante en la botella de PETG de alimentación. La disolución de permeado se recogió como fracciones de 500 ml usando una probeta graduada de 500 ml y se transfirieron a botellas de almacenamiento. La velocidad de flujo inicial de la bomba peristáltica se estableció a 1200 ml/min, entonces la válvula de retenido se ajustó para mantener una TMP constante (~22 psi) durante todo el proceso. Durante el procesamiento, la disolución de permeado se muestreó después de cada recogida de 500 ml y se registraron el pH y la conductividad. También se registró manualmente la velocidad de flujo del permeado. Una vez se había concentrado el volumen original de la disolución de producto en la alimentación (2,0 l) a un volumen total de aproximadamente 500 ml, entonces se diafiltró la disolución de retenido. Se añadió agua de RO enfriada (4 °C) a la botella de retenido de PETG conectada al sistema de TFF a una tasa para mantener un volumen constante durante la diafiltración. La disolución de permeado se muestreó continuamente cada 500 ml y se registraron la conductividad y el pH. Una vez el volumen de permeado había alcanzado ~2000 ml y la conductividad de la disolución de permeado disminuyó a 56 microS/cm, se detuvo la bomba de transferencia. A continuación, la disolución de retenido se transfirió a otra botella de PETG (1 l). Se añadió agua de RO (150 ml) a la botella de PETG de alimentación y se recirculó mediante el sistema de TFF durante 5 min. Entonces se combinaron la disolución de retenido original y la disolución de retenido de lavado. La recuperación de la etapa de TFF global en CMP-SA-PEG-20 kDa fue del 112 % como se ha determinado por análisis de HPLC (Tabla 3). La disolución de retenido combinada (530 ml, pH=7,81, 110 microS/cm) se liofilizó dando 0,52 g (rendimiento del proceso global del 77 %) como un sólido blanco que fue el 96 % puro por el presente método de análisis (Tabla 3). El producto liofilizado se analizó por RMN ¹H.

3.3. Filtración de flujo tangencial del grupo de productos de CMP-SA-glicerol-PEG-40 kDa

Se desaló el grupo de productos en Q Sepharose Big Beads según el Ejemplo 2.4 (4,05 l) por filtración de flujo tangencial (TFF) usando los parámetros de proceso resumidos en la Tabla 4, a continuación. Se conectó una bomba peristáltica Masterflex L/S (bomba de TFF) mediante tubo flexible de silicona (L/S 35) a un soporte Pellicon-2 de Millipore equipado con dos membranas de celulosa regeneradas Pellicon 2 de 1 kDa de Millipore; tipo de tamiz: V; 0,5 m². Se transfirió aproximadamente 1 l de la disolución acuosa de producto a una botella de PETG de 1 l que se sumergió en un baño de hielo. La disolución se agitó con una barra de agitación magnética y la temperatura se monitorizó durante el proceso entero. La disolución de producto restante se enfrió en un baño de hielo y la disolución se alimentó en la botella de PETG mediante tubo flexible de silicona (L/S 25) por una segunda bomba peristáltica Masterflex. La velocidad de transferencia de la segunda bomba se estableció igual a la velocidad de flujo del permeado con el fin de mantener un volumen constante en la botella de PETG. Tanto la línea de alimentación como la línea de retenido se dispusieron dentro de la botella de PETG sobre el sistema de TFF. La disolución de permeado se recogió como fracciones de 1,0 l en una probeta graduada de 1,0 l y se transfirió a botellas de almacenamiento. La velocidad de flujo inicial de la bomba peristáltica de TFF se estableció a 2,4 l/min, y la válvula de retenido se ajustó para mantener una TMP constante (~20 psi) durante todo el proceso. La disolución de permeado se muestreó después de cada recogida de 1,0 l de disolución, y se registraron el pH y la conductividad. También se registró manualmente la velocidad de flujo del permeado. Una vez se habían concentrado los 4,0 l originales de la disolución de producto a un volumen total de aproximadamente 1,0 l, se diafiltró el retenido. Se añadió agua de RO enfriada (4 °C) a la botella de retenido de PETG a una tasa para mantener un volumen constante durante la diafiltración. La disolución de permeado se muestreó continuamente cada 1,0 l. Una vez el volumen total de la disolución de permeado había alcanzado ~4,0 l y la conductividad de la disolución de permeado había disminuido a 56 microS/cm, se detuvo la bomba de transferencia. A continuación, la disolución de retenido se transfirió a otra botella de PETG (2 l). Se añadió agua de RO (350 ml) a la botella de retenido de PETG y se re-

5 circuló en el sistema de TFF durante 5 min. A continuación se combinaron la disolución de retenido original y la disolución de retenido de lavado. La recuperación de la etapa de TFF global de CMP-SA-glicerol-PEG-40 kDa fue del 93 % basado en el análisis de HPLC del grupo de retenido final y el grupo de intercambio iónico original (Tabla 5, proceso nº 1). La disolución de producto de TFF final (1060 ml, pH 7,60, 66 microS/cm) se liofilizó proporcionando 5,82 g (rendimiento del progreso global del 67 %) de un sólido blanco con una pureza del 92 % por HPLC (Tabla 6, proceso 1). El producto liofilizado se analizó por RMN ¹H.

Tabla 4:

Parámetros de proceso para la operación unitaria de filtración de flujo tangencial (TFF) para CMP-SA-glicerol-PEG-40 kDa	
Membrana	Dos membranas de celulosa regenerada Millipore 1K Pellicon 2 de 0,5 m ² , tamiz de tipo V
Área de la membrana, m ²	1,0
TMP	20 ± 1 psig
Flujo	3 LMH
Volumen de retenido (l)	1 l (después de la concentración y durante toda la diafiltración)
Tampón de equilibrio/diafiltración	Agua de RO
Criterios de diafiltración	≥ 3 volúmenes de DF (3000 ml totales)
Tiempo de procesamiento total	Aproximadamente 3 horas
Temperatura (°C)	≤ 15 °C (temperatura óptima de 4-8 °C)
Condiciones de CIP	NaOH 0,1 M, mantenimiento 30 minutos
Condición de almacenamiento de la membrana	NaOH 0,1 M o 20 % de etanol

Tabla 5:

Resultados de la operación unitaria de filtración de flujo tangencial para CMP-SA-glicerol-PEG-40 kDa							
	Área de la membrana (m ²)	NWP l/h/psig/m ²	Volumen de retenido (l)	Temp inicial/final (°C)	pH del retenido	Conductividad del retenido (mcS/cm)	Recuperación
Lote 1	1,0	0,15	1	15-12	7,6	66	93 %
Lote 2	1,0	0,15	1	13-10	7,0	45	86 %

10 En la Tabla 5, el volumen de retenido se determinó después de la concentración y desalación de la disolución de alimentación inicial. La temperatura del retenido inicial en el sistema se midió al principio de la etapa de concentración. La temperatura del retenido final se determinó al final de la etapa de diafiltración. El pH del retenido se determinó después de la combinación del primer retenido (después de la concentración y diafiltración) con el retenido de lavado del sistema. La conductividad del retenido se midió después de la combinación del primer retenido (después de la concentración y diafiltración) y el retenido de lavado del sistema. La recuperación de producto se calculó de la relación del producto en el conjunto de retenido de TFF final (concentración de RP-HPLC x volumen) con respecto a la del conjunto de IEX de partida (concentración de RP-HPLC x volumen).

Tabla 6:

Resultados resumen del proceso para la producción de CMP-SA-glicerol-PEG-40 kDa				
	Peso seco (g)	Cantidad (g)	Pureza	Recuperación global
Lote 1	5,82	5,14	92,0 %	67 %
Lote 2	5,36	4,81	93,1 %	62 %

25 En la Tabla 6, se calculó la masa de producto a partir del valor de concentración de RP-HPLC y el volumen del grupo de retenido de TFF. La pureza se determinó usando RP-HPLC y se calculó usando el peso molecular de mPEG del certificado de análisis del fabricante (NOF) para la masa de CMP-SA-glicerol-PEG-40 kDa (43.347 Daltons). Se calcularon recuperaciones globales para la reacción combinada, cromatografía y procesos de TFF basándose en la relación de moles de producto obtenido (a partir del peso seco) dividida entre los moles de reactivo limitante en la reacción multiplicado por la fracción del conjunto de productos procesado x 100 %.

Ejemplo 4:

Experimentos de desalación adicionales usando ultrafiltración

4.1. Desalación de CMP-SA-glicerol-PEG-40 kDa usando una membrana de 5 kDa

35 Se conectó una bomba peristáltica Masterflex L/S mediante tubo flexible de silicona (L/S 15, nº 96400-15) a un mini-soporte Pellicon-2 de Millipore equipado con un filtro "MINI" Pellicon 2 de 5 kDa de Millipore (membrana de celulosa regenerada de 5 kDa PLCC; tipo de tamiz: C, 0,1 m²). El sistema se lavó con 2 l de agua a 1000 ml/min. A

5 continuación se recirculó agua (2 l) en el sistema a 1000 ml/min, y se recogieron aproximadamente 500 ml de permeado con una TMP de 20 psi. La conductividad del retenido se midió como 3 microS/cm. La permeabilidad del agua normalizada (NWP) se midió como $\sim 1,4$ l/h/m²/psi. Se disolvió el CMP-SA-glicerol-PEG-40 kDa (4,0 g) en 200 ml de agua Milli Q enfriada en una botella de plástico de 500 ml, que se sumergió en un baño de hielo. La disolución se agitó con una barra de agitación magnética. Tanto la línea de alimentación como la línea de retenido se dispusieron dentro de la botella. La disolución se recirculó a través del sistema durante 5 min a 500 ml/min. A continuación se aumentó la velocidad de la bomba a 1000 ml/min y la presión del retenido se ajustó a 13 psi, que proporcionó una presión de alimentación de 25 psi y TMP de 19 psi. La TMP se mantuvo constante durante el proceso. El permeado se recogió en fracciones de 100 ml, se registraron el tiempo correspondiente para cada fracción y la temperatura del retenido. Se usó una segunda peristáltica para transferir agua Milli Q enfriada para mantener un volumen constante en la botella de retenido. La etapa de diálisis se completó cuando se recogieron 600 ml del permeado. La conductividad de la fracción de 100 ml final fue 12 microS/cm. La temperatura del retenido estuvo entre 15-16 °C durante el proceso. La velocidad de flujo del permeado promedio fue 28,6 ml/min con un flujo calculado de 17,2 l/h/m². La tasa de permeado normalizada fue 0,90 l/h/m²/psi. El retenido se transfirió a una botella separada, y el sistema se recirculó con 100 ml de agua durante 5 min. A continuación se combinaron la disolución de retenido original y la disolución de retenido de lavado. Se liofilizaron las disoluciones de retenido combinadas finales (~ 350 ml, pH 6,6, 33 microS/cm) para proporcionar 3,92 g de un sólido blanco con una recuperación del 98 % (Tabla 7).

20 **4.2. Desalación de CMP-SA-glicerol-PEG-40 kDa usando una membrana de 3 kDa**

Se conectó una bomba peristáltica Masterflex L/S mediante tubo flexible de silicona (L/S 15, n° 96400-15) a un mini-soporte Pellicon-2 de Millipore equipado con un filtro "MINI" Pellicon 2 de 3 kDa de Millipore (membrana de celulosa regenerada de 3 kDa PLCC; tipo de tamiz: C, 0,1 m²). El sistema se lavó con 2 l de agua a 1000 ml/min. A continuación se recirculó con 2 l de agua a 1000 ml/min y se recogieron aproximadamente 500 ml de permeado con una TMP a 20 psi. La conductividad del retenido se midió como 5 microS/cm. La permeabilidad del agua normalizada (NWP) se midió como $\sim 0,75$ l/h/m²/psi. Se disolvió CMP-SA-glicerol-PEG-40 kDa (4,0 g) en 200 ml de agua Milli Q enfriada en una botella de plástico de 500 ml, que se sumergió en un baño de hielo. La disolución se agitó con una barra de agitación magnética. Tanto la línea de alimentación como la línea de retenido se dispusieron dentro de la botella. La disolución se recirculó a través del sistema durante 5 min a 500 ml/min. A continuación se aumentó la velocidad de la bomba a 1000 ml/min y la presión del retenido se ajustó a 20 psi proporcionando una presión de alimentación de 20 psi y una TMP de 20 psi. La TMP se mantuvo constante durante el proceso. El permeado se recogió en fracciones de 100 ml, se registraron el tiempo correspondiente para cada fracción y la temperatura del retenido. Se usó una segunda peristáltica para transferir agua Milli Q enfriada para mantener un volumen constante en la botella de retenido. La etapa de diálisis se completó cuando se recogieron 600 ml del permeado. La conductividad de la fracción de 100 ml final fue 34 microS/cm. La temperatura del retenido estuvo entre 13-15 °C durante el proceso. La velocidad de flujo del permeado promedio es 16,7 ml/min, y el flujo calculado fue 10,0 l/h/m² y la tasa de permeado normalizada fue 0,50 l/h/m²/psi. El retenido se transfirió a una botella separada y el sistema se recirculó con 100 ml de agua durante 5 min. A continuación se combinaron la disolución de retenido original y la disolución de retenido de lavado. Se liofilizaron las disoluciones de retenido combinadas (~ 300 ml, pH 7,4, 56 microS/cm) proporcionando 3,86 g de un sólido blanco con una recuperación del 95 % (Tabla 7).

Tabla 7:

Filtración de flujo tangencial de CMP-SA-glicerol-PEG-40 kDa usando membranas de celulosa regenerada (3 kDa y 5 kDa)										
Tipo de membrana	Area de la membrana (m ²)	Conc. inicial de retenido (mg/ml)	TMP (psi)	Temp (°C)	Flujo del permeado (l/h/m ²)	NWP l/h/m ² /psi	Conductividad (microS/cm)	Recuperación		
5 kDa	0,1	20	19	15-16	10,0	0,90	33	98%		
3 kDa	0,1	20	20	13-15	7,6	0,50	56	95%		

En la Tabla 7, la temperatura es el intervalo de temperatura del retenido en el sistema durante todo el proceso de diafiltración. La conductividad se midió en el retenido después de la combinación del primer retenido (después de la diafiltración) y el retenido de lavado del sistema. Se calculó la recuperación de producto a partir de la relación de la masa del producto de TFF liofilizado con respecto a la de CMP-SA-glicerol-PEG usada para preparar la disolución original para TFF (4 g).

Ejemplo 5:

Optimización de la reacción de acoplamiento (PEGilación)

Se optimizó la reacción de acoplamiento usada para formar CMP-SA-PEG-10 kDa para mejorar los rendimientos de conversión y simplificar las manipulaciones de proceso durante la reacción (Tabla 8). Se requirió un ligero exceso molar de reactivo de mPEG-pNP (1,2-1,5 eq. molares) para obtener los mayores rendimientos de conversión. Las reacciones se realizaron en THF/agua (4/1) a concentraciones de CMP-SA-glicina entre 3,4 - 3,7 mM y concentraciones de mPEG-pNP entre 50-55 mg/ml.

Tabla 8:
Resultados de la reacción de acoplamiento para CMP-SA-PEG-10 kDa

Nº de reacción	PEG-pNP de 10 kDa (mmoles)	GSC (mmoles)	THF (ml)	Agua (ml)	Tampon (mcl)	Intervalo de pH	Tiempo de reacción (h)	Volumen final (ml)	Relación PSC/ GSC	Conc. de CMP-SA-PEG (mg/ml)	Rendimiento
1	0,09	0,073	16	4	0,4	8,2-7,8	42	25	N/A	3,9	12%
2	0,90	0,73	160	40	4,0	8,2-7,8	88	200	N/A	14	36%
3	0,09	0,073	16	4	0,3	8,6-7,9	64	25	6,8/1	46,5	149%
4	0,11	0,073	16	4	0,3	8,6-7,8	64	25	15,8/1	45,5	146%
5	1,10	0,735	160	40	2,9	8,7-7,9	26	250	15,0/1	32,7	104%
6	2,75	1,838	400	100	7,0	8,7-8,1	40	660	44,2/1	33,8	113%
7	5,50	3,675	800	200	14,0	8,7-8,1	45	1285	77,9/1	32	105%
8	2,75	1,838	400	100	7,0	8,6-8,1	46	675	2,5/1	22,4	77%
9	2,00	1,342	320	80	5,5	8,6-7,8	19	684	7,1/1	17,1	81%

En la Tabla 8, PEG-pNP es PEG-pNP de 10 kDa (MW supuesto: 10.000 Dalton, supuesto el 100 % de activación), tampón es la cantidad de tampón fosfato (0,5 M) añadida para mantener el pH de la reacción y pH es el intervalo de pH observado durante la reacción de acoplamiento. La relación de las cantidades de PSC con respecto a GSC después de completarse la reacción de acoplamiento se midió usando HPLC. Todos los cálculos incorporan una pureza en peso seco del 73,5 % de pureza para GSC (CMP-SA-glicina) como sal de disodio (MW = 673) y suponen un peso molecular de 10.000 Daltons para mPEG-pNP de 10 kDa y 10.700 Daltons para CMP-SA-PEG-10 kDa. Todas las reacciones se realizaron entre aproximadamente 19 y aproximadamente 20 °C. La masa y los moles de GSC añadido a cada reacción se corrigieron para la pureza del reactivo real. Tiempo de reacción es el tiempo de reacción total. La concentración de PSC después de la reacción estuvo completa como se ha determinado por HPLC. El rendimiento de conversión se basó en la relación de cantidades de PSC (HPLC) con respecto a GSC (cantidad usada). Las reacciones 1 a 4 se analizaron por RP-HPLC usando CMP-SA-PEG-10 kDa como patrón de calibración. Las reacciones 5 a 10 usaron CMP-SA-glicina como patrón de calibración.

Los datos indican que un pH inicial de 8,6-8,7 de la mezcla de reacción era crítico en lograr los rendimientos de conversión más altos (Tabla 8). El intervalo de pH óptimo durante todo el proceso estuvo entre aproximadamente 8,0 y 8,8. Cuando el pH disminuyó por debajo de 8,0, la reacción se ralentizó espectacularmente, produciendo malos rendimientos de conversión. Se tuvo cuidado en no permitir que el pH disminuyera por debajo de 7,0, ya que CMP-SA-glicina y CMP-SA-PEG se descomponen bajo estas condiciones debido a la hidrólisis para formar CMP, ácido siálico-glicina y ácido siálico-PEG (Figura 3). A un pH superior a 8,8, el reactivo de mPEG-pNP de 10 kDa se hidrolizó rápidamente conduciendo a bajos rendimientos de conversión (Figura 1, Tabla 8: reacciones 1 y 2). Ciertos reactivos de CMP-SA-glicina contuvieron NaOH residual (para asegurar la forma de sal de sodio de este reactivo), que creó disoluciones con un pH >10 cuando se disolvió en agua. Por tanto, las primeras etapas en establecer la reacción de acoplamiento que implicaron disolver CMP-SA-glicina en agua requirieron la adición de tampón (fosfato de sodio, pH 4,6) para reducir el pH a aproximadamente 8,6 antes de la adición de mPEG-pNP. Después del ajuste del pH, se añadió mPEG-pNP a la mezcla de reacción y las mezclas de reacción se mantuvieron a temperatura ambiente (aproximadamente 19-20 °C). A medida que avanzaron las reacciones, el tampón fosfato añadido previno que el pH disminuyera por debajo de 8,0 a medida que se formó la especie ácida *p*-nitrofenol. Sin embargo, si el pH disminuyó a 8,0, se usó hidróxido sódico (0,1 N) para aumentar el pH a 8,6.

Fue ocasionalmente difícil lograr una lectura de pH estable debido a la viscosidad de la mezcla de reacción, especialmente para las reacciones que implican los mayores PEG. Se usaron mayores concentraciones de mPEG-pNP para los mayores PEG (20 kDa y glicerol-40 kDa) para aumentar los rendimientos. Se usaron concentraciones de 100 mg de mPEG-pNP/ml de mezclas de reacción con concentraciones de CMP-SA-glicina de 3.3 (Tablas 9 y 10). Los rendimientos de conversión aumentaron aproximadamente el 10 % cuando se usaron mayores concentraciones de PEG (Tabla 10, reacciones 1-4).

Las reacciones de acoplamiento requirieron entre aproximadamente 24 y aproximadamente 72 h hasta completarse. Las reacciones se monitorizaron usando RP-HPLC. Se requirieron tiempos de reacción tan largos de aproximadamente 48 a aproximadamente 72 h para algunas condiciones de reacción, especialmente aquellas que implican moléculas de PEG mayores.

No se observó diferencia significativa en los rendimientos de conversión cuando se usaron diferentes relaciones de reactivos de acoplamiento (GSC y glicerol-mPEG-carbonato de *p*-nitrofenilo de 40 kDa). La Tabla 10 muestra que una reacción con 1,4 eq. en moles de GSC/1 eq. en moles de PEG activado tuvo el mismo resultado que una reacción que contiene 1,1 eq. en moles de PEG activado/eq. en moles de GSC bajo condiciones de otro modo idénticas (reacciones 2 y 3). Aunque puede ser posible aumentar el rendimiento de la conversión usando un exceso mucho mayor de glicerol-mPEG-carbonato de *p*-nitrofenilo de 40 kDa, la economía del proceso sería mucho menos favorable.

La reacción de PEGilación para producir CMP-SA-PEG-20 kDa y CMP-SA-glicerol-PEG-40 kDa también se realizó en 100 % de agua (sin THF) (Tabla 9). Se supuso inicialmente que en ausencia de THF, el proceso de reacción podría avanzar más rápidamente y el propio proceso ya no requeriría evaporación rotatoria como operación unitaria. Los resultados indican que es posible una reacción acuosa. Sin embargo, para la reacción de 20 kDa, se requirió amplia monitorización y ajuste del pH con NaOH 0,1 N, especialmente durante las horas iniciales de la reacción. Como resultado, no se observaron ahorros de tiempo significativos. Además, cuando se usó 100 % de agua para producir CMP-SA-glicerol-PEG-40 kDa, el glicerol-mPEG-carbonato de *p*-nitrofenilo no se disolvió fácilmente. Esto afectó la tasa y el rendimiento de conversión de la reacción. También se examinaron diferentes tampones como parte del proceso de optimización de la PEGilación usando solo agua como disolvente. Sin embargo, tanto el tampón bicarbonato sódico (10 mM, pH 8,1) como el tampón borato de sodio (10 mM, pH 8,6) produjeron menores rendimientos de conversión (Tabla 10).

Tabla 9:

Resultados de la reacción de acoplamiento para CMP-SA-PEG-20 kDa ¹											
Nº de reacción	PEG-pNP de 10 kDa (mmoles)	GSC (mmoles)	THF (ml)	Agua (ml)	Tampón (mcl)	Intervalo de pH	Tiempo de reacción (h)	Volumen final (ml)	Relación PSC/ GSC	Conc. de CMP-SA-PEG (mg/ml)	Rendimiento
1	0,50	0,327	80	20	1200	8,7-8,3	29	200	22,7	31,8	96%
2	1,0	0,656	160	40	2000	8,6-8,2	39	476	21	25,1	87%
3	0,11	0,073	0	30	120	8,7-7,8	25	45	20	29,4	84%
4	0,55	0,365	0	100	800	8,4-8,0	24	220	20	29,4	84%

5 En la Tabla 9, GSC es CMP-SA-glicina y PSC es CMP-SA-PEG-20 kDa. Todos los cálculos incorporan una pureza en peso seco del 73,5 % de pureza (HPLC) para GSC como sal de disodio (673 Daltons) y suponen un peso molecular de 20.000 Daltons y 100 % de activación para mPEG-pNP de 20 kDa y un peso molecular de 20.700 Daltons para CMP-SA-PEG-20 kDa. La masa y los moles de GSC añadidos a cada reacción se corrigieron para la pureza del reactivo real. "Tampón" indica la cantidad de tampón fosfato (0,5 M) añadida para mantener el pH de la reacción. "Intervalo de pH" indica el intervalo de pH observado durante la reacción de acoplamiento. "Tiempo de reacción" es el tiempo de reacción total. La relación de las cantidades de PSC con respecto a GSC se determinó después de completarse la reacción de acoplamiento por HPLC. La concentración de PSC después de la reacción estuvo completa como se ha determinado por HPLC. Los rendimientos de conversión se basan en la relación de cantidades de PSC con respecto a GSC como se ha determinado por HPLC.

10

Tabla 10:
Resultados de la reacción de acoplamiento para CMP-SA-glicerol-PEG-40 kDa

Nº de reacción	PEG-pNP de 10 kDa (mmoles)	GSC (mmoles)	THF (ml)	Agua (ml)	Tampón (mcl)	Intervalo de pH	Tiempo de reacción (h)	Volumen final (ml)	Relación PSC/ GSC	Conc. de CMP-SA-PEG (mg/ml)	Rendimiento
1	0,083	0,066	32	8	250	8,7-8,4	21	60	2,54	30,08	67%
2	0,022	0,020	16	4	90	8,7-8,4	75	25	1,38	17,36	53%
3	0,020	0,024	16	4	120	8,7-8,4	75	35	0,77	12,56	54%
4	0,11	0,10	40	10	500	8,7-8,1	68	165	3,57	17,92	73%
5	0,44	0,40	160	40	2000	8,9-8,3	66	678	2,73	13,72	57%
6	0,010	0,012	0	10	50	~8,2	20	10	0,68	15,5	38%
7	0,015	0,010	0	10	40	~8,2	22	10	1,23	19,16	47%
8	0,010	0,012	0	0 ¹⁰	0	~8,6	20	10	0,46	17,18	42%
9	0,015	0,010	0	0 ¹⁰	0	~8,6	22	10	0,95	17,09	42%

En la Tabla 10, GSC es CMP-SA-glicina y PSC es CMP-SA-PEG-40 kDa. Todos los cálculos incorporan una pureza en peso seco del 73,5 % de pureza para GSC como sal de sodio (673 Daltons) y suponen un peso molecular de 42.843 Daltons para mPEG-pNP de 40 kDa (90 % de activación) y un peso molecular de 40.700 Daltons para CMP-SA-glicerol-PEG-40 kDa. La masa y los moles de GSC añadidos a cada reacción se corrigieron para la pureza del reactivo real. "Tampón" indica la cantidad de tampón fosfato (0,5 M) añadida para mantener el pH de la reacción. "Intervalo de pH" indica el intervalo de pH observado durante la reacción de acoplamiento. "Tiempo de reacción" es el tiempo de reacción total. La relación de las cantidades de PSC con respecto a GSC se determinó después de completarse la reacción de acoplamiento por HPLC. La concentración de PSC después de la reacción estuvo completa como se ha determinado por HPLC. Los rendimientos de conversión se basan en la relación de cantidades de PSC con respecto a GSC como se ha determinado por HPLC. Las reacciones 8 y 9 se realizaron usando 10 ml de tampón borato de Na 10 mM, pH 8,6 como sustitución para el tampón fosfato de sodio.

Ejemplo 6:

Procesos a modo de ejemplo para la producción de CMP-SA-PEG

6.1. Proceso a modo de ejemplo para la producción de CMP-SA-PEG-10 kDa

Se disolvió CMP-SA-glicina en agua y THF (1 parte con respecto a 4 partes) a una concentración de 3,4 mM. La disolución se ajustó a pH 8,6 con fosfato de sodio y a continuación se añadió reactivo de mPEG-pNP de 10 kDa (1,5 equivalentes en moles con respecto a los moles reales de CMP-SA-glicina). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 20-48 horas mientras que se mantenía el pH a 8,6. La reacción se monitorizó por RP-HPLC y cuando se completó, la mezcla de reacción se concentró mediante evaporación rotatoria para eliminar el THF. La mezcla de reacción acuosa concentrada se diluyó con agua (400 ml) a un volumen final que era 1,7 veces el volumen de reacción original. Se midió la conductividad y fue inferior a 1 mS/cm. La disolución de producto diluida se cargó sobre una columna de Q-Sepharose Big Beads (10 g de reactivo de PEG por litro de resina con al menos una altura del lecho de resina de 10 cm) a una velocidad de flujo de 50 cm/h. El material de no unión se lavó de la columna con 2 VC de agua. La impureza de SA-PEG-10 kDa se eluyó de la columna con NaHCO₃ 5 mM (0,6 VC) a una velocidad de flujo de 100 cm/h. El producto puro, CMP-SA-PEG-10 kDa, se eluyó con NaHCO₃ 30 mM (3 VC) también a una velocidad de flujo de 100 cm/h. La fracción de producto empezó cuando la lectura de UV271 subió por encima de la línea de base tras el pico de impureza de SA-PEG y terminó en aproximadamente el 5 % del máximo del pico en el lado trasero del pico de producto como se muestra en la Figura 4. El producto reunido se enfrió a 4 °C y se concentró 3 veces (a una concentración de producto de aproximadamente 14 g/l) usando un sistema de filtración de flujo tangencial que usó membranas de celulosa regeneradas de 1 kDa. Se usó diafiltración del retenido con agua a 4 °C (4 volúmenes de retenido) para eliminar la sal y continuó hasta que la conductividad del permeado se aproximó a la del agua de alimentación. A continuación, la disolución de CMP-SA-PEG-10 kDa purificada se congeló y se liofilizó a sequedad.

6.2. Proceso a modo de ejemplo para la producción de CMP-SA-PEG-20 kDa

Se disolvió CMP-SA-glicina en agua y THF (1 parte con respecto a 4 partes) a una concentración de 3,3 mM. La disolución se ajustó a pH 8,6 con fosfato de sodio y se añadió el reactivo de mPEG-pNP de 20 kDa (1,5 equivalentes en moles con respecto a los moles reales de CMP-SA-glicina). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 20-48 horas mientras que se mantenía el pH a 8,6. La reacción se monitorizó por RP-HPLC y cuando la reacción se completó, la mezcla de reacción se concentró mediante evaporación rotatoria para eliminar el THF. La mezcla de reacción acuosa concentrada se diluyó con agua (300 ml) a un volumen final que era 2,4 veces superior al volumen de reacción original total. Se midió la conductividad y se verificó que era inferior a 0,8 mS/cm. La disolución de producto diluida se cargó sobre una columna de Q-Sepharose Big Beads (10 g de reactivo de PEG por litro de resina con al menos una altura del lecho de resina de 10 cm) a una velocidad de flujo de 50 cm/h. El material de no unión se lavó de la columna con 2 VC de agua. La impureza de SA-PEG-10 kDa se eluyó de la columna con NaHCO₃ 2 mM (1 VC) a una velocidad de flujo de 100 cm/h. El producto puro se eluyó con NaHCO₃ 30 mM (3 VC) también a 100 cm/h (Figura 6). La fracción de producto que se recogió empezó cuando la lectura de UV271 subió por encima de la línea de base tras el pico de impureza de SA-PEG, y terminó en aproximadamente el 5 % del pico de producto máximo en el lado trasero de ese pico. El producto reunido se enfrió a 4 °C y se concentró 4 veces (a una concentración de producto de aproximadamente 21 g/l) usando un sistema de filtración de flujo tangencial que contuvo membranas de celulosa regeneradas de 1 kDa. Se usó diafiltración del retenido con agua a 4 °C (4 volúmenes de retenido) para eliminar la sal y continuó hasta que la conductividad del permeado se aproximó a la del agua de alimentación. La disolución de CMP-SA-PEG-20 kDa purificada se congeló y se liofilizó a sequedad.

6.3. Proceso a modo de ejemplo para la producción de CMP-SA-glicerol-PEG-40 kDa

Se disolvió CMP-SA-glicina en agua y THF (1 parte con respecto a 4 partes) a una concentración de 2 mM. La disolución se ajustó a pH 8,6 con fosfato de sodio y se añadió el reactivo de mPEG-pNP de 40 kDa (1,1 equivalentes en moles con respecto a los moles reales de CMP-SA-glicina). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 60-66 horas mientras que se mantenía el pH a 8,6. La reacción se monitorizó por RP-HPLC y cuando la reacción se completó, la mezcla de reacción se concentró mediante evaporación rotatoria para eliminar el THF. La mezcla de

reacción acuosa concentrada se diluyó con agua (600 ml) para ajustar el volumen a 3,4 veces el volumen de reacción original total y la conductividad a menos de 0,5 mS/cm. La disolución de producto diluida se cargó sobre una columna de Q-Sepharose Big Beads (5 g de reactivo de PEG por litro de resina con al menos una altura del lecho de resina de 10 cm) a una velocidad de flujo de 30 cm/h. El material de no unión se lavó de la columna con 2 VC de agua. La impureza de SA-PEG-10 kDa se eluyó de la columna con NaHCO₃ 2 mM (1 VC) a una velocidad de flujo de 150 cm/h. CMP-SA-glicerol-PEG-40 kDa puro se eluyó con NaHCO₃ 30 mM (3 VC) también a 150 cm/h (Figura 7). La fracción de producto empezó cuando la lectura de UV271 subió por encima del 20 % de la absorbancia máxima del pico de producto (permitiendo la eliminación del hombro de impureza de SA-PEG) y terminó en aproximadamente el 5 % del máximo del pico en el lado trasero del pico de producto (Figura 7). El producto reunido se enfrió a 4 °C y se concentró 4 veces usando un sistema de filtración de flujo tangencial que contuvo membranas de celulosa regeneradas de 1 kDa (a una concentración de producto de aproximadamente 6 g/l). La concentración adicional estuvo limitada por el gran volumen de trabajo requerido por el sistema. Se usó diafiltración del retenido con agua a 4 °C (4 volúmenes de retenido) para eliminar la sal y continuó hasta que la conductividad del permeado se aproximó a la del agua de alimentación. La disolución de CMP-SA-glicerol-PEG-40 kDa purificada se congeló y se liofilizó a sequedad.

Ejemplo 7:

Optimización de las condiciones de intercambio aniónico

Se seleccionó resina Q-Sepharose Big Beads de GE Healthcare como la resina de elección para la purificación de CMP-SA-PEG debido a que las resinas tienen bajo coste, alta capacidad de unión, altas velocidades de flujo lineales y funcionalidad de unión a iones de amina cuaternaria. Se examinaron diferentes formas de contraíón de la resina para su capacidad para unirse a CMP-SA-PEG, que incluyeron iones cloruro, hidróxido, fosfato y bicarbonato. Se observó que CMP-SA-PEG tuvo una baja avidéz de unión por esta resina, lo más probablemente debido a los grandes restos de PEG sobre el reactivo que interfieren con las interacciones iónicas de reactivo-resina. Como resultado, las conductividades de las disoluciones de carga se eligieron para ser inferiores a 1 mS/cm.

CMP-SA-PEG no se unieron a la forma de cloruro de la resina, pero se unieron a las formas de hidróxido, fosfato y bicarbonato (Tabla 11). La forma de hidróxido de la resina no pudo usarse en el procesamiento, ya que cuando CMP-SA-PEG se eluyó usando cloruro sódico, no pudo lograrse resolución de SA-PEG y el pH de la disolución se volvió muy básico. El aumento en pH provocó la descomposición de CMP-SA-PEG (Tabla 11). La elución del producto de la forma de fosfato de la resina usando fosfato de sodio (pH 7,5 o pH 8,0) proporcionó mala resolución de los contaminantes (Tabla 11).

Solo la elución del producto de la forma de bicarbonato de la resina Q-Sepharose Big Beads con bicarbonato sódico como tampón de elución proporcionó la separación de muchos de los contaminantes relacionados en la disolución de alimentación que incluye CMP, SA-PEG y CMP-SA-glicina (Figura 5). Fue necesario un estrecho gradiente de NaHCO₃ o método de elución en pequeñas etapas para eluir selectivamente CMP-SA-PEG de SA-PEG, que puede formarse durante la reacción o proceso de producción. Solo se requirió un aumento de etapa muy pequeño en la conductividad para eluir SA-PEG y CMP-SA-PEG (NaHCO₃ < 30 mM, < 2,7 mS/cm). Sin embargo, los otros componentes de la reacción de unión (CMP, CMP-SA-glicina, *p*-nitrofenol) se eluyeron todos solo cuando se usaron concentraciones de NaHCO₃ mucho mayores.

Tabla 11:

Purificación de CMP-SA-PEG-10 kDa con una columna de Q-Sepharose Big Beads usando diversas condiciones de elución			
Resina	Sal de elución	Método de elución	Resolución
Hidróxido	NaCl	Gradiente lineal (sin tampón en el cloruro sódico 1 M) Nota: El pH de elución de la columna fue > 11, produciendo la descomposición del CMP-SA-PEG	Mala resolución de CMP y GSC; ninguna resolución de SA-PEG
Fosfato	fosfato de sodio (pH 7,5)	Gradientes lineales; fosfato de Na 0-15 mM, pH 7,5 en 6 VC; luego, fosfato de Na 15-140 mM, pH 7,5 en 5 VC; y luego fosfato de Na 0,5 M, pH 7,5.	Mala resolución de CMP y GSC; ninguna resolución de SA-PEG
Fosfato	fosfato de sodio (pH 7,5)	Gradientes lineales; fosfato de Na 0-30 mM, en 6 VC, fosfato de Na 30-280 mM en 5 VC, fosfato de Na 0,5 M.	Mala resolución de CMP y GSC; ninguna resolución de SA-PEG
Bicarbonato	NaCl	Gradiente lineal; NaCl 0-0,5 M (sin tampón) en 5 VC	Mala resolución de CMP y GSC; ninguna resolución de SA-PEG
Bicarbonato	NaCl	Gradiente lineal; NaCl 0-0,3 M (sin tampón) durante 6 VC	Resolución parcial de CMP y GSC; ninguna resolución de SA-PEG

Bicarbonato	NaCl	Elución en etapas de NaCl 0 a 30 mM (sin tampón); luego gradiente lineal NaCl 30-250 mM durante 5 VC	Separación de CMP y GSC; ninguna resolución de SA-PEG
Bicarbonato	fosfato de sodio (pH 8,0)	Gradiente lineal; fosfato de Na 0-30 mM, pH 8 durante 6 VC, luego fosfato de Na 30-280 mM en 5 VC	Buena resolución de CMP y GSC; ninguna separación de SA-PEG
Bicarbonato	bicarbonato sódico	Etapas del 0 al 0,01 % de NaHCO ₃ durante 1,5 VC; luego una etapa al 0,1 % de NaHCO ₃ durante 1,5 VC; luego un gradiente lineal de NaHCO ₃ 30 mM - 280 mM durante 5 VC	Buena resolución de CMP y GSC; ninguna resolución de SA-PEG
Bicarbonato	bicarbonato sódico	Gradiente lineal; NaHCO ₃ 0-30 mM en 3 VC, luego NaHCO ₃ 30 mM durante 2 VC, luego gradiente lineal de NaHCO ₃ 30-280 mM durante 5 VC	Excelente resolución de CMP y GSC; resolución parcial de SA-PEG
Bicarbonato	bicarbonato sódico	Elución en etapas; NaHCO ₃ 0-5 mM durante 0,6 VC, luego etapa a NaHCO ₃ 30 mM y mantenimiento durante 3 VC, luego etapa a NaHCO ₃ o NaOH 1 M	Excelente resolución de todos los contaminantes incluyendo SA-PEG
Cloruro	--	CMP-SA-PEG no se une	-

En la Tabla 11, la conductividad de la disolución de la mezcla de reacción diluida y de acoplamiento fue <1,0 mS/cm. Resolución significa separación del producto CMP-SA-PEG-10 kDa de otros contaminantes relacionados (por ejemplo, CMP, GSC, SA-PEG, PEG y p-nitrofenol). PEG y p-nitrofenol se separaron fácilmente del producto por todos los métodos, excepto cuando la resina estuvo en la forma de ión cloruro. También se examinó el tampón fosfato a pH 8,0 por los mismos métodos de elución. Se observaron resultados similares como se observa para el tampón fosfato a pH 7,5.

Optimización de la elución en etapas.

Usando la forma de HCO₃⁻ de la resina Q Sepharose Big Beads, se optimizaron cuidadosamente las condiciones de elución en etapas con tampón NaHCO₃ para cada producto de CMP-SA-PEG. Se maximizó la resolución entre el pico de la impureza SA-PEG que eluye pronto y el producto. Se investigaron pequeñas etapas de agua a bajas concentraciones de NaHCO₃ (30 mM, 10 mM, 5 mM) para CMP-SA-PEG-10 kDa como se describe en la Tabla 12. Se logró la resolución del nivel inicial entre SA-PEG-10 kDa y el producto con una etapa inicial a NaHCO₃ 5 mM. Aunque el producto también eluyó a concentración 5 mM de NaHCO₃, el perfil de elución del pico de producto fue muy ancho. Por tanto, después de 0,6 VC a 5 mM, el gradiente se escalonó inmediatamente a NaHCO₃ 30 mM. CMP-SA-PEG-10 kDa puro se recogió muy eficazmente en aproximadamente 1,5 VC a pH 8,3-8,6 como se muestra en la Figura 3. Las impurezas CMP, CMP-SA-Glu y p-nitrofenol más estrechamente unidas se eluyeron con una elución en etapas a NaHCO₃ 1 M. También se recogió el pico de SA-PEG-10 kDa, se desaló (sobre una columna de G-25, no descrita) y se liofilizó. El análisis del sólido por RMN ¹H verificó su estructura.

Con el fin de lograr la misma separación del nivel inicial entre el producto SA-PEG-20 kDa y CMP-SA-PEG-20 kDa, se requirió una elución en etapas inicial a NaHCO₃ 2 mM (Figura 6). El producto también empezó a eluir a NaHCO₃ 2 mM. Para evitar un pico de producto de elución muy ancho, el gradiente se escalonó a NaHCO₃ 30 mM después de solo 1 VC a bicarbonato sódico 2 mM. El producto puro se recogió en aproximadamente 1,5 VC a pH 7,8 (Figura 5). También se recogió el pico de SA-PEG-20 kDa, se desaló (sobre una columna G-25, no descrita) y se liofilizó. El análisis del sólido por RMN ¹H verificó su estructura.

Tabla 12:

Optimización de las condiciones de elución en Q-Sepharose Big Beads para CMP-SA-PEG-10 kDa					
	Carga de PEG* (gramos de PEG/l de resina)	Velocidad de flujo volumétrica Carga/lavado/elución (ml/min)	Velocidad de flujo lineal Carga/elución (cm/h)	Gradiente	Comentarios
1	11 g de PEG / l de resina	1,7/3,4/3,4	19,2 / 38,4	Lavado con agua 3,2 VC, NaHCO ₃ 10 mM durante 2,5 VC, NaHCO ₃ 10-30 mM durante 1,5 VC, NaHCO ₃ 30 mM durante 1 VC, NaHCO ₃ 30-280 mM en 5 VC, NaHCO ₃ 1 M durante 2 VC.	Alguna resolución de SA-PEG y CMP-SA-PEG, pero la elución de producto empieza a NaHCO ₃ 10 mM.

2	11 g de PEG / l de resina	1,7/3,4/3,4	19,2 / 38,4	Lavado con agua 3,2 VC, NaHCO ₃ 5 mM durante 2 VC, NaHCO ₃ 10 mM durante 2 VC, NaHCO ₃ 20 mM durante 2 VC, NaHCO ₃ 30 mM durante 2 VC, NaHCO ₃ 30-280 mM durante 1 VC, NaHCO ₃ 280 mM-1 M durante 1 VC, NaHCO ₃ 1 M durante 2 VC.	Buena resolución de SA-PEG y CMP-SA-PEG. La elución de producto empieza a NaHCO ₃ 10 mM.
3	11 g de PEG / l de resina	1,7/3,4/8,9	19,2 / 100	Lavado con agua 2,2 VC, NaHCO ₃ 30 mM durante 3 VC, NaHCO ₃ 30-280 mM durante 1 VC, NaHCO ₃ 280 mM-1 M durante 1 VC, NaHCO ₃ 1 M durante 2 VC.	Mala resolución de SA-PEG y CMP-SA-PEG.
4	22 g de PEG / l de resina	1,7/3,4/3,4	19,2 / 38,4	Lavado con agua 2,2 VC, NaHCO ₃ 30 mM durante 3 VC, NaHCO ₃ 30-280 mM durante 1 VC, NaHCO ₃ 280 mM-1 M durante 1 VC, NaHCO ₃ 1 M durante 2 VC.	Ninguna resolución de SA-PEG y CMP-SA-PEG.
5	11 g de PEG / l de resina	1,7/8,9/8,9	19,2 / 100	Lavado con agua 2,2 VC, NaHCO ₃ 5 mM durante 0,6 VC, NaHCO ₃ 30 mM durante 3 VC, NaHCO ₃ 1 M durante 7 VC.	Mejor separación de SA-PEG y CMP-SA-PEG.
6	8,2 g de PEG / l de resina	1,7/8,9/8,9	19,2 / 100	Lavado con agua 2,2 VC, NaHCO ₃ 5 mM durante 0,6 VC, NaHCO ₃ 30 mM durante 3 VC, NaHCO ₃ 30-280 mM durante 1 VC, NaHCO ₃ 280 mM-1 M durante 1 VC, NaHCO ₃ 1 M durante 7 VC.	Mejor separación de SA-PEG y CMP-SA-PEG. Carga baja involuntaria de la columna. Identidad recogida y confirmada de todos los picos por RP-HPLC.
7	10 g de PEG / l de resina	65 / 130	50 / 100	Lavado con agua 2,2 VC, NaHCO ₃ 5 mM durante 0,6 VC, NaHCO ₃ 30 mM durante 3 VC, NaHCO ₃ 1 M durante 7 VC.	Mejor separación de SA-PEG y CMP-SA-PEG. Figura 3.

En la Tabla 12, la columna de Q Big Beads es GE XK-26 (2,6 cm x 18,8 cm, 100 ml), forma de ión bicarbonato para los experimentos 1-6 y columna GE BPG 100/500 (10 cm x 26 cm, 2 l), forma de bicarbonato para el experimento 7. La carga de PEG se calculó a partir de la masa de 10 kDa-mPEG-pNP en gramos usada en la reacción fuente multiplicada por la fracción del volumen de reacción final que se cargó sobre la columna dividido entre el volumen de la columna en litros.

CMP-SA-glicerol-PEG-40 kDa se unió muy débilmente a la resina Q-Sepharose Big Beads. El producto y el subproducto SA-PEG se eluyeron ambos usando una elución en etapas a NaHCO₃ 2 mM. La impureza SA-PEG-40 kDa se resolvió parcialmente como un hombro muy pequeño en el borde delantero del pico de producto (Figura 8). Cuando se recogió CMP-SA-glicerol-PEG-40 kDa usando bicarbonato sódico 2 mM, se recogió un amplio pico de elución (3 VC). El pH de este pico de elución fue solo 6,5, que causó descomposición del producto.

Por tanto, SA-PEG-40 kDa eluyó usando una elución en etapas con bicarbonato sódico 2 mM (1 VC). El producto se eluyó entonces aumentando la elución en etapas con NaHCO₃ 30 mM para eluir rápidamente el producto como se muestra en la Figura 7. Usando estas condiciones, el producto CMP-SA-glicerol-PEG-40 kDa se recogió de la columna en 2 VC con un pH de 7,4. No fue necesario ajuste adicional del pH. La forma de pico poco usual observada en la Figura 5 podría prevenirse acortando la etapa de NaHCO₃ 2 mM de 1 volumen de columna (VC) completo de elución a 0,5 VC, como se hizo con el producto de 10 kDa (Figura 4). Se encontró rutinariamente que las recuperaciones de la etapa de proceso para esta operación unitaria eran superiores al 95 como se ha determinado por RP-HPLC (Figuras 7). También se recogió el pico de SA-PEG-40 kDa y se liofilizó. El análisis del sólido por RMN ¹H verificó su estructura.

Parámetros de proceso. Las mezclas de reacción evaporadas en rotovapor de los productos de CMP-SA-PEG-10 kDa y 20 kDa se diluyeron preferentemente hasta que las conductividades se redujeron a menos de 1 y 0,8 mS/cm, respectivamente. Además, el pH de la disolución estuvo preferentemente entre 7,1 - 7,6 para garantizar la captura completa del producto. Las disoluciones diluidas se cargaron sobre la columna de AEX a concentraciones que se correspondieron con 10 g de reactivo de partida de mPEG-pNP activado usado para la reacción por litro de resina de AEX. Podrían usarse mayores cargas por columna de producto para el producto de CMP-SA-PEG-10 kDa (22 g de

mPEG-pNP/l de resina), pero se perdía la resolución entre SA-PEG y CMP-SA-PEG-10 kDa (Tabla 11).

La conductividad de las mezclas de reacción evaporadas en rotovapor de CMP-SA-glicerol-PEG-40 kDa se redujo preferentemente a por debajo de 0,5 mS/cm por dilución con agua. Además, el pH de la disolución estuvo preferentemente entre 7,1 - 7,6 para asegurar la captura completa del producto. Un estudio de carga a pequeña escala indicó que se requiere aproximadamente 1 litro de resina Q-Sepharose Big Beads por cada 5 gramos de reactivo de partida de mPEG-pNP de 40 kDa usado en la reacción. Así, una columna de 4 l debe ser suficiente para capturar el producto de reacción de CMP-SA-glicerol-PEG-40 kDa que empezó con 20 g de mPEG-pNP de 40 kDa. Esto es aproximadamente el 70 % de la capacidad de carga máxima para la resina de AEX usando estas condiciones de elución. No se observaron diferencias en el rendimiento de la cromatografía con alturas del lecho de la columna entre 15 y 28 cm.

Las mezclas de reacción concentradas, diluidas, se cargaron sobre la columna de AEX a velocidades de flujo lineales de 15-50 cm/hora (correspondientes a 20-65 ml/min sobre una columna de 2 l). En todos los casos, el tiempo de residencia de la disolución de carga sobre la columna fue aproximadamente 15 minutos. Usando una columna de AEX de 2 l, se usaron velocidades de flujo de lavado y de elución de 100-150 cm/h (130 - 200 ml/min para la columna de 2 l) para los tres productos de CMP-SA-PEG. Por tanto, el tiempo de operación unitaria total que incluye la carga de la mezcla de reacción y la elución de producto fue inferior a 1,5 h (Figuras 3, 5 y 7). Se usaron mayores velocidades de flujo de elución, hasta 200 cm/h, sin pérdida observada en la resolución entre el producto de SA-PEG-20 kDa y de CMP-SA-PEG-20 kDa.

Ejemplo 8:

Optimización de la etapa de desalación por ultrafiltración/diafiltración (TFF)

Se concentraron los grupos de elución por intercambio iónico de CMP-SA-PEG y se desalaron usando ultrafiltración/diafiltración (TFF). El sistema de TFF usó membranas de hoja plana Pellicon-2 de Millipore (MWCO de 1 kDa; membranas de celulosa regenerada) para desalar la disolución de alimentación y retener los productos.

Proceso de filtración de flujo tangencial a modo de ejemplo

El grupo de productos de intercambio iónico de CMP-SA-PEG-10 kDa (1500 ml, Figura 4) y el grupo de productos de intercambio iónico de CMP-SA-PEG-20 kDa (Figura 6) se desalaron ambos usando el sistema Pellicon 2 "MINI" con membranas de 3 x 0,1 m² (Tabla 1) usando una bomba peristáltica. Se usaron presiones transmembrana de aproximadamente 22 psi que crearon un flujo de aproximadamente 3,7 LMH.

Debido a los grandes volúmenes de elución de los grupos de elución de AEX para CMP-SA-glicerol-PEG-40 kDa (Figuras 7), los grupos de elución se desalaron usando membranas de 2 x 0,5 m² (Tabla 4). Se usó una bomba peristáltica para este sistema, que creó una velocidad de flujo de 3 LMH con una TMP de 20 psi. El grupo de productos de elución de Q-Sepharose Big Beads se enfrió en un baño de hielo durante el procesamiento para prevenir la descomposición de CMP-SA-glicerol-PEG-40 kDa como resultado del calor creado de la bomba.

Las disoluciones de retenido procesadas sobre el sistema MINI se concentraron a 500 ml (3 veces para CMP-SA-PEG-10 kDa, 4 veces para CMP-SA-PEG-20 kDa) correspondiente a las concentraciones de producto de 14,3 g/l y 21 g/l, respectivamente. No se observó descomposición de producto en ninguna de las muestras de permeado (RP-HPLC). Debido al gran volumen de retención del sistema del sistema de 0,5 m² (aproximadamente 400 ml para 2 cartuchos de membrana), el volumen mínimo de retenido que pudo lograrse fue solo de 1 l (concentración de 4-6 veces). La concentración de producto resultante estuvo bastante diluida a aproximadamente 5 g/l, que fue mucho menor que los 20 g/l logrados para el producto de 20 kDa más pequeño.

Después de la concentración, los retenidos se diafiltraron cada uno a volumen constante usando 4 diavolúmenes de agua enfriada (2 l para el producto de 10 y 20 kDa; 4 l para el producto de 40 kDa). Se recogieron muestras de permeado durante todo el proceso de concentración y de diafiltración y se registraron el pH y la conductividad. La diafiltración se completó cuando la conductividad de las disoluciones de permeado se aproximó a la del agua usada para la diafiltración (< 50 microS/cm).

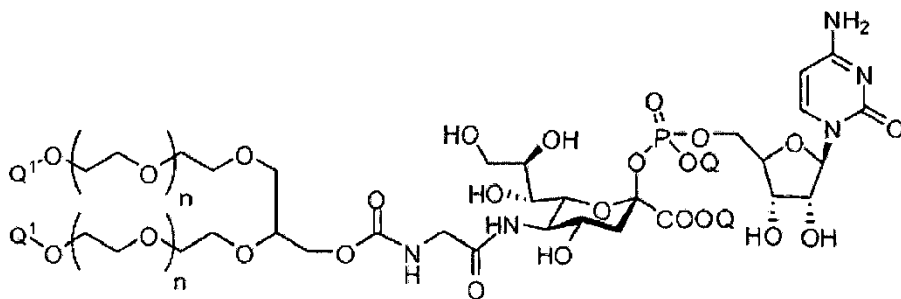
Tabla 8:

Los grupos de retenido diafiltrado final se analizaron por RP-HPLC y se liofilizaron proporcionando un polvo blanco durante un periodo de aproximadamente 3 días. Los productos de TFF liofilizados finales se analizaron por RP-HPLC y RMN para determinar la recuperación de producto (90-95 %) y la pureza (>90 %, Tablas 2, 3, 5 y 6). Las recuperaciones de producto globales para la reacción combinada, rotoevaporación, intercambio iónico, operaciones unitarias de TFF y liofilización fueron del 65-77 %. La RMN ¹H verificó cada estructura de producto y las pruebas de ICP indicaron que cada estructura de producto estaba en la forma de disodio. Las pruebas de ICP también indicaron que no estuvieron presentes sales de sodio adicionales.

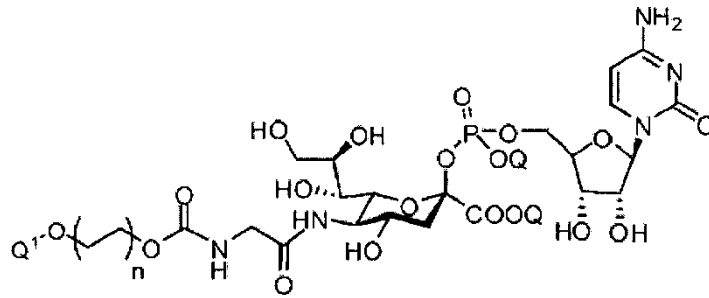
Los cálculos de pureza y de rendimiento globales se basan en masas promedio estimadas de los mPEG usados para producir cada uno de los productos de CMP-SA-PEG (10.700 para CMP-SA-PEG-10 kDa; 20.700 para CMP-SA-PEG-20 kDa; 43.347 para CMP-SA-glicerol-PEG-40 kDa) como se ha indicado por el fabricante. La subestimación de los pesos moleculares del producto produce una infradeclaración del contenido de producto por RP-HPLC y, por tanto, la subestimación de la pureza del producto.

REIVINDICACIONES

1. Un método de preparación de una composición que comprende un azúcar de nucleótido modificado enlazado covalentemente a un grupo modificador polimérico, comprendiendo dicho grupo modificador polimérico al menos un resto de poli(óxido de alquileo) lineal o ramificado, comprendiendo dicho método:
- (i) poner en contacto una mezcla de reacción que comprende dicho azúcar de nucleótido modificado con un medio de intercambio aniónico;
 - (ii) eluir dicho azúcar de nucleótido de dicho medio de intercambio aniónico que forma una fracción de eluato que comprende dicho azúcar de nucleótido modificado; y
 - (iii) desalar dicha fracción de eluato,
- en donde dicho método no comprende ultrafiltración antes de la etapa (i), formando así dicha composición.
2. El método de la reivindicación 1, en el que dicha mezcla de reacción tiene una conductividad salina de menos de aproximadamente 5 mS/cm.
3. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha desalación se lleva a cabo usando filtración en membrana, en el que, preferentemente, dicha filtración en membrana es filtración de flujo tangencial (TFF), y/o en el que dicha filtración en membrana reduce el volumen de dicha fracción de eluato, y/o en el que dicha filtración en membrana produce conductividad salina reducida de dicha fracción de eluato en comparación con dicha conductividad salina antes de dicha filtración en membrana y en el que, preferentemente, dicha conductividad salina reducida de dicha fracción de eluato está entre aproximadamente 10 μ S/cm y aproximadamente 200 μ S/cm, más preferentemente menos de aproximadamente el 50 μ S/cm.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho resto de poli(óxido de alquileo) es un resto de poli(etilenglicol) lineal o ramificado, en el que, preferentemente, dicho resto de poli(etilenglicol) tiene un peso molecular entre aproximadamente 5 kDa y aproximadamente 500 kDa, más preferentemente, un peso molecular entre aproximadamente 10 kDa y aproximadamente 100 kDa.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho azúcar de nucleótido modificado es un miembro seleccionado de un resto de GlcNAc, un resto de aGalNAc y un resto de ácido siálico (SA).
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho azúcar de nucleótido modificado comprende ácido citidina-monofosfo-siálico (CMP-SA), en el que, preferentemente, dicho azúcar de nucleótido es ácido citidina-monofosfo-siálico (CMP-SA) enlazado covalentemente a un resto de poli(etilenglicol) lineal o ramificado, en el que, más preferentemente, dicho resto de poli(etilenglicol) ramificado comprende un esqueleto de glicerol.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho azúcar de nucleótido modificado es un miembro seleccionado de:



50 y



- en las que cada n es un número entero independientemente seleccionado de 1 a 2500;
 cada Q es un miembro independientemente seleccionado de H, una carga negativa y un contraión salino; y
 cada Q¹ es un miembro independientemente seleccionado de H, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo y hexilo, en
 5 donde, preferentemente,
 n está seleccionado de 200 a 500.
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores que, además, comprende antes de la etapa (i):
 10 (vii) poner en contacto un derivado de azúcar de nucleótido que comprende un grupo amino primario con un
 resto de poli(óxido de alquileo) activado en condiciones suficientes para formar un enlace covalente entre
 dicho grupo amino de dicho derivado de azúcar de nucleótido y dicho resto de poli(óxido de alquileo).
- 15 9. El método de la reivindicación 8, en el que dicho derivado de azúcar de nucleótido es CMP-SA-glicina.
10. El método de las reivindicaciones 8 o 9, en el que dicho resto de poli(óxido de alquileo) activado comprende un
 resto de carbonato de *p*-nitrofenilo.
- 20 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que dicho derivado de azúcar de nucleótido y
 dicho reactivo de poli(óxido de alquileo) se ponen en contacto en presencia de un disolvente acuoso que tiene un
 pH entre aproximadamente 8,0 y aproximadamente 8,8.
- 25 12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en el que dicho reactivo de poli(óxido de alquileo)
 es un poli(etilenglicol)-carbonato de *p*-nitrofenilo.

Figura 1

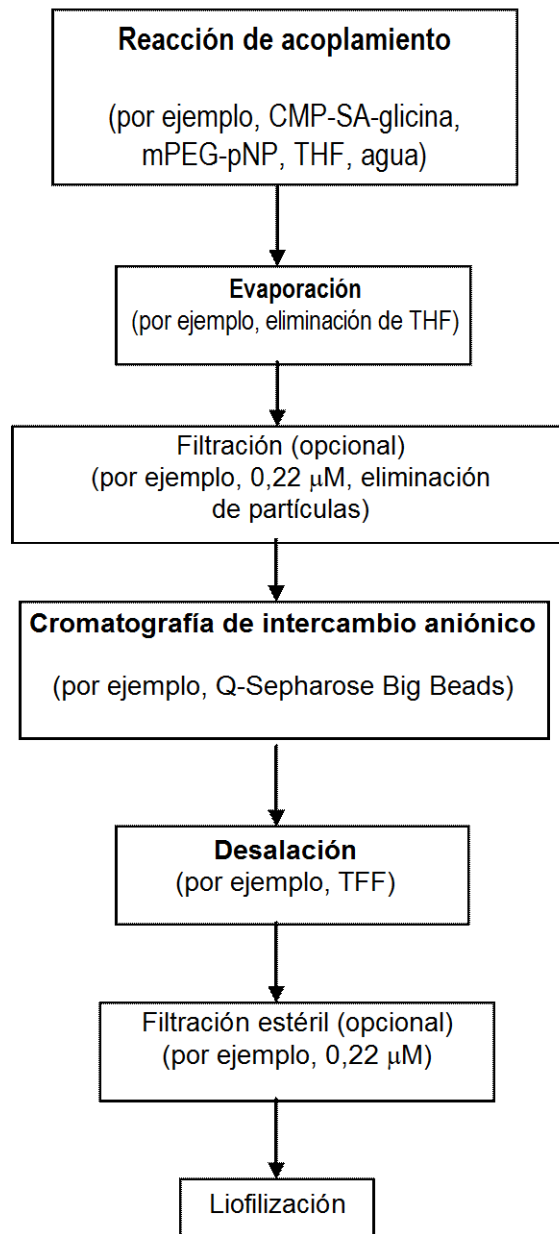


Figura 2

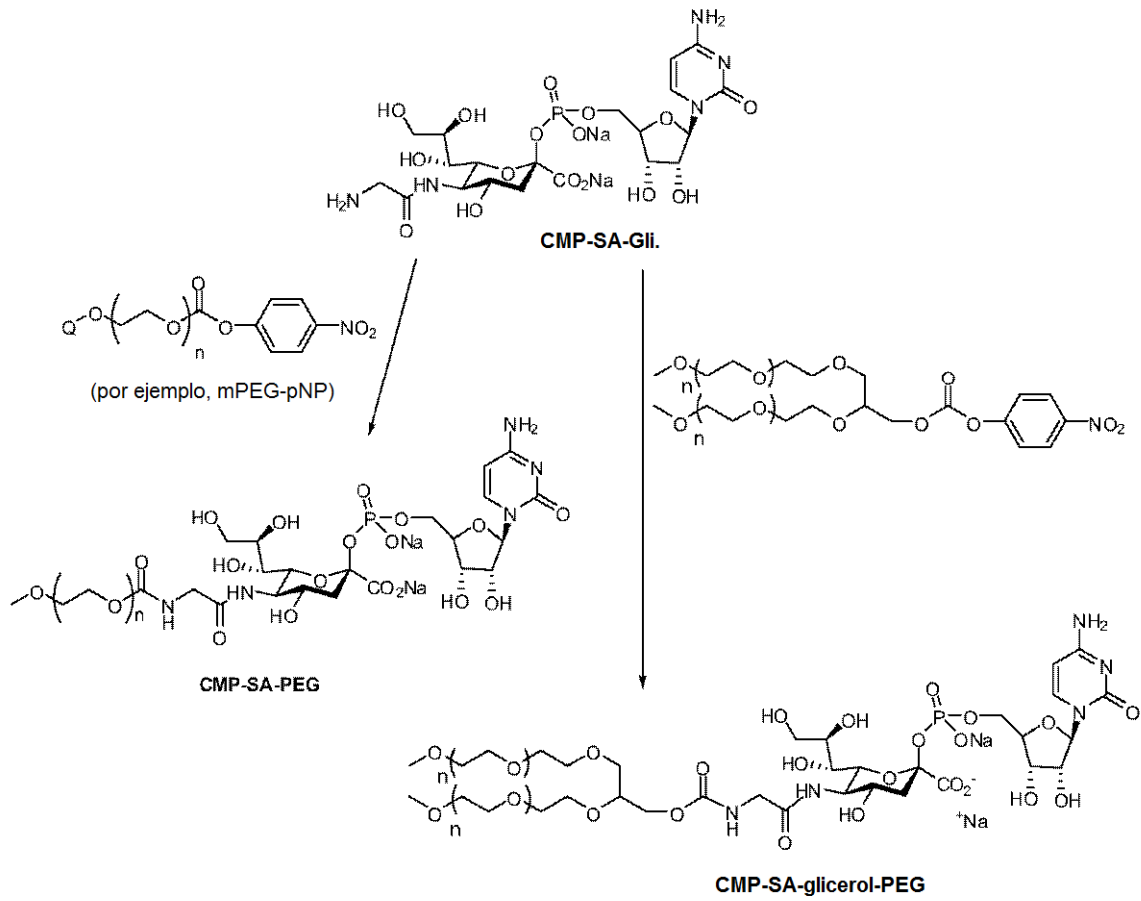


Figura 3

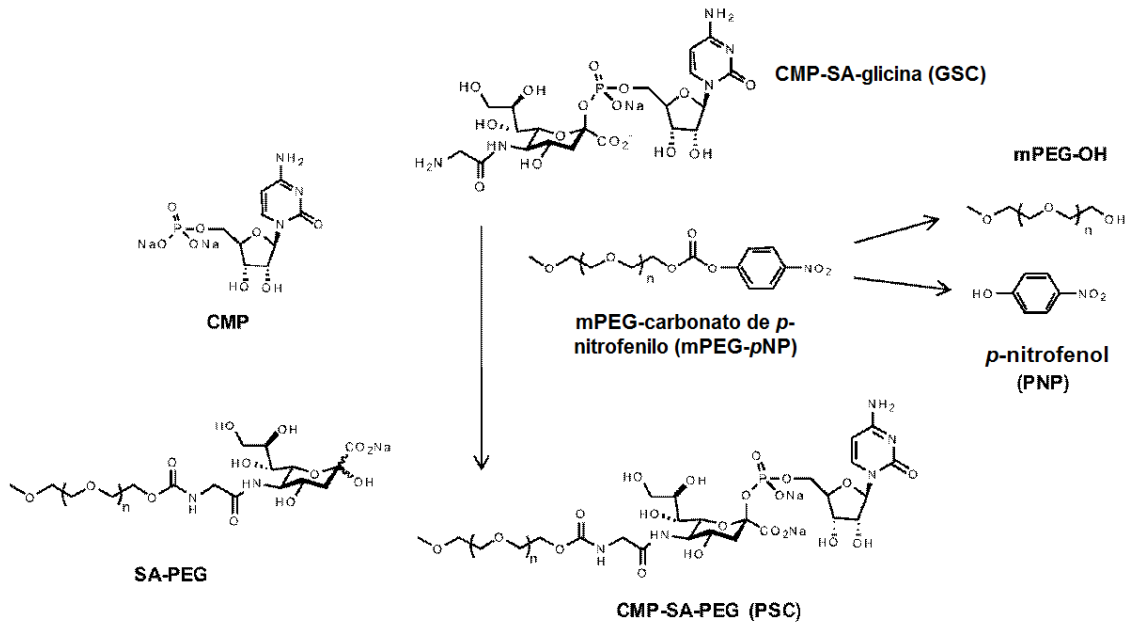


Figura 4

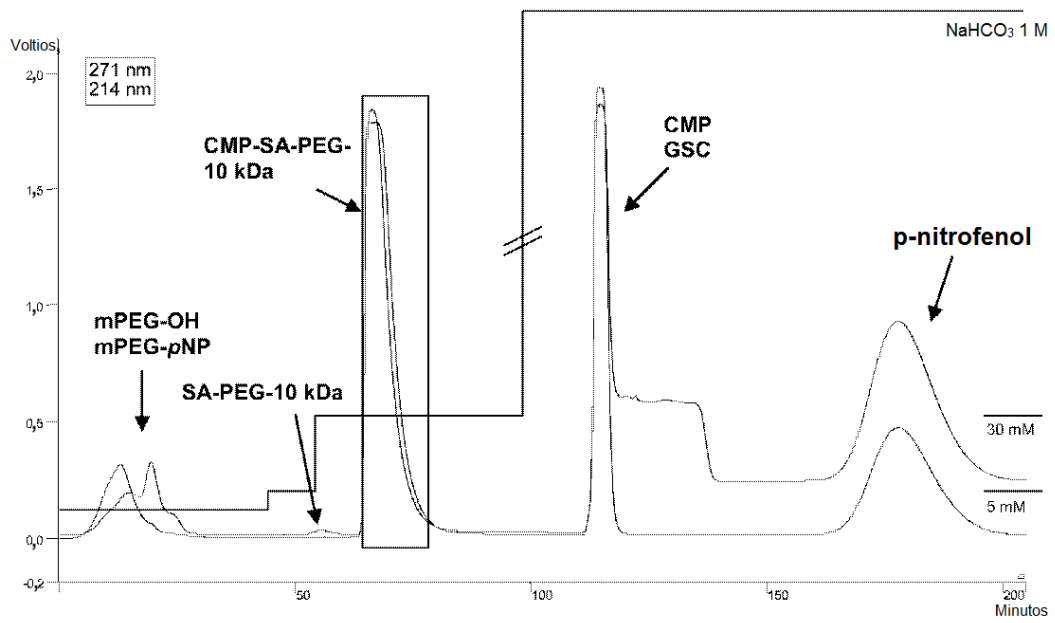


Figura 5

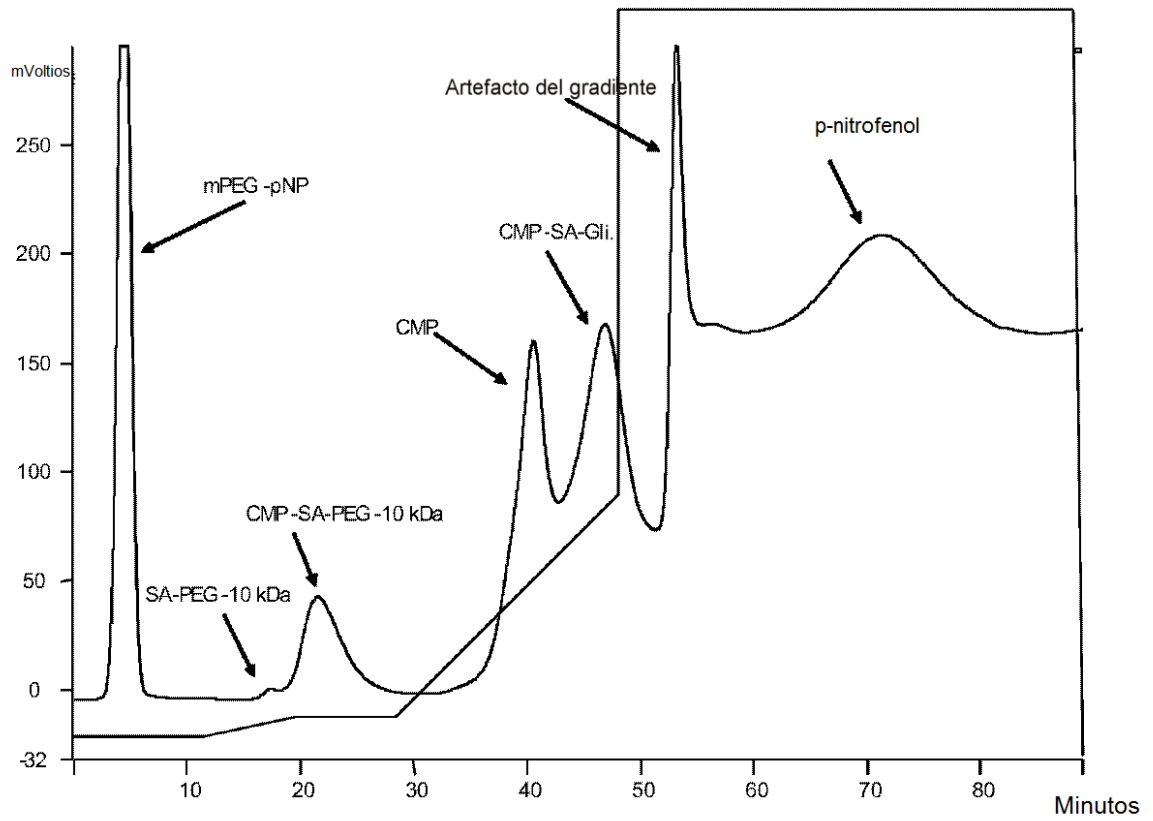


Figura 6

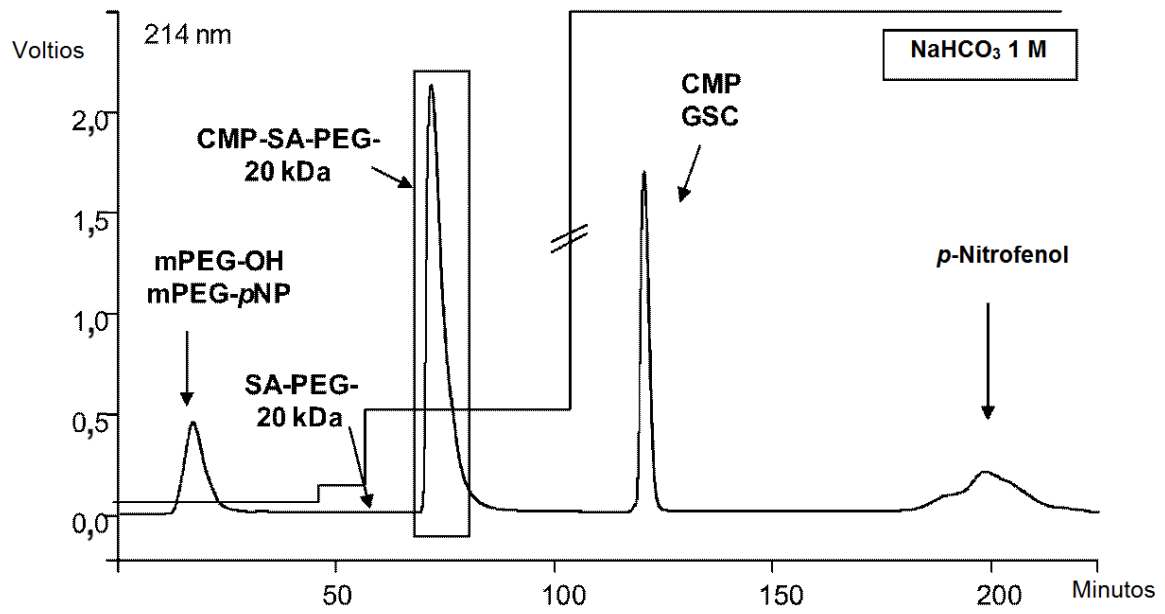


Figura 7

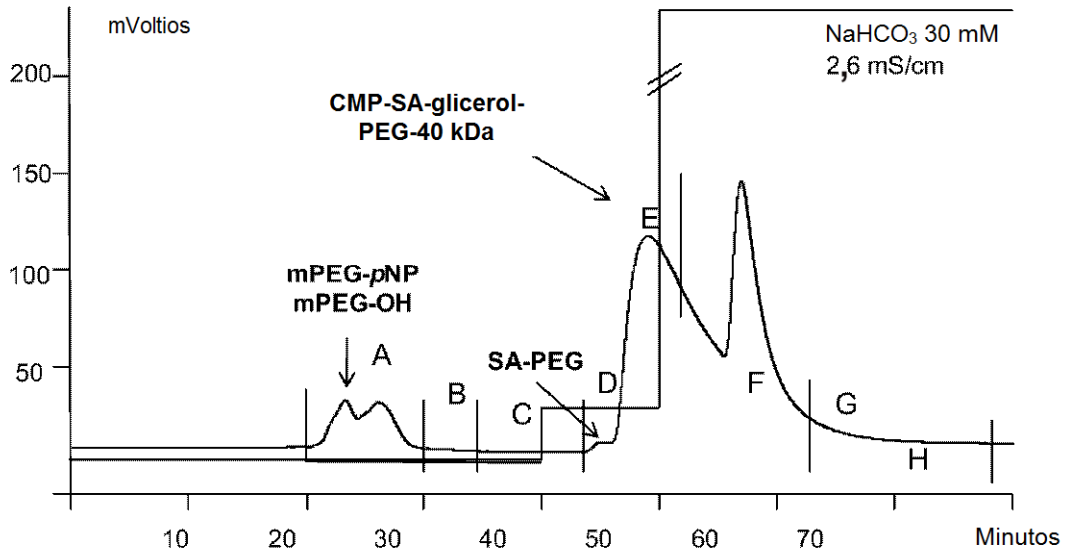


Figura 8

