

## INCREMENTO DE ESCALA PRODUCTIVA EN LA ETAPA DE SÍNTESIS DEL PROCESO DE OBTENCIÓN DEL PÉPTIDO INMUNOMODULADOR CIGB-814 EN FASE SÓLIDA

### INCREASE TO PRODUCTION SCALE THE SYNTHESIS STAGE OF THE PROCESS FOR OBTAINING THE CIGB-814 IMMUNOMODULATORY PEPTIDE IN SOLID PHASE

Ivet Castellanos Román<sup>a</sup>  
Ever Pérez Hernández<sup>a</sup>  
Denia González León<sup>a</sup>  
Yaïma Mortarell Pérez<sup>a</sup>  
Lisamaris Pico Brea<sup>a</sup>  
Antonio J. Antequera Guevara<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), Producción, Planta 14 (1)

<sup>b</sup> Universidad Tecnológica de La Habana “José Antonio Echeverría” (CUJAE), Facultad de Ingeniería Química (2)

\*ivet.castellanos@cigb.edu.cu

Recibido: 08 de noviembre de 2023;

Aceptado: 13 de diciembre de 2023;

#### RESUMEN

En el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) se produce el péptido sintético CIGB-814. Entre las etapas de obtención del mismo se realiza la síntesis química partiendo de una masa de resina de 50 g. Este péptido inmunomodulador constituye el Ingrediente Farmacéutico Activo (IFA) del medicamento Jusvinza, el mismo ha sido utilizado para el tratamiento de pacientes infectados con el virus SARS- Cov-2 así como los que han llegado a estado grave y crítico. Debido a su gran efectividad y alta demanda se hizo necesario incrementar su producción. Dada esta situación se lleva a cabo un estudio de las variables del proceso para aumentar la masa de resina de partida de 50 a 150 g. Se utilizan las técnicas analíticas de espectrometría de masas para conocer su identidad y la RP-HPLC para el grado de pureza, obteniendo resultados positivos en cada una. Mediante un análisis estadístico, se determina la mejor condición de operación en la etapa, siendo esta una masa de resina igual a 150 g y velocidad de agitación de 80 min<sup>-1</sup>. Con estos resultados se garantiza un buen mezclado sin turbulencia, el aumento de la cantidad de péptido crudo obtenido y se logra satisfacer la demanda del producto.

**Palabras claves:** Bagasse; RAC; High temperature corrosion; Heat exchanger steel tubes; Alkali and chlorides compounds.

#### ABSTRACT

The CIGB-814 synthetic peptide is produced at the Center for Genetic Engineering and Biotechnology (CIGB). Between the stages of obtaining it, the chemical synthesis is carried out starting from a resin mass of 50 g. This immunomodulatory peptide constitutes the Active Pharmaceutical Ingredient (API) of the drug Jusvinza; it has been used for the treatment of patients who have improved with the SARS-CoV-2 virus as well as those who have reached a serious and critical state. Due to its great efficiency and high demand, it became necessary to increase its production. Given this situation, a study of the process variables is carried out to increase the starting resin mass from 50 to 150 g. Mass spectrometry analytical techniques are used to determine their identity and RP-HPLC for the degree of purity, obtaining positive results in each one. Through a statistical analysis, the best operating condition in the stage is determined, this being a mass of resin equal to 150 g and a depression speed of 80 min<sup>-1</sup>. With these results, good mixing without turbulence is guaranteed, the amount of crude peptide obtained is increased, and the demand for the product is satisfied.

**Keywords:** bagazo; RAC; Corrosión a alta temperatura; Tubos de acero para intercambiadores de calor; Compuestos alcalinos y cloruros.

## INTRODUCCION

El desarrollo de metodologías de síntesis química de péptidos ha acelerado el descubrimiento de nuevos compuestos con posibilidades de convertirse en agentes terapéuticos (1, 2) o vacunas (3, 4). Los péptidos sintéticos se han aplicado en el tratamiento de varias enfermedades como la diabetes, enfermedades infecciosas virales, bacterianas y el cáncer (5). En el CIGB se estableció la metodología de síntesis en fase sólida (6-9) para péptidos de hasta 50 residuos. Una de estas moléculas es el CIGB-814, con 27 aminoácidos en su secuencia, constituye el IFA del medicamento Jusvinza. Este ha sido utilizado para el tratamiento de la artritis reumatoide (AR) (10-12) mostrando efecto anti-inflamatorio y aumento de la actividad de las células reguladoras T (12, 13). Los resultados de los ensayos clínicos con el Péptido Inmunomodulador 814 en pacientes con artritis reumatoide mostraron que el medicamento es seguro y reduce significativamente la inflamación (12). Basado en estos resultados y dado la cantidad de pacientes que fallecían por hiperinflamación pulmonar por COVID-19 se propone utilizar este péptido en pacientes críticos con ventilación asistida. Los resultados fueron alentadores, en 24 horas los pacientes lograban salir de la ventilación mecánica al disminuir y casi eliminar la inflamación pulmonar (14). Rápidamente se aprueba el autorizo de uso de emergencia de Jusvinza para pacientes graves, críticos, embarazadas y de forma preventiva en pacientes que por su cuadro clínico conducían a la gravedad. Teniendo en cuenta este problema sanitario, donde existían gran cantidad de personas que requerían ser tratados con el fármaco, la capacidad de producción en la escala actual del Péptido Inmunomodulador en fase sólida era insuficiente. Para resolver esta problemática, el presente trabajo tiene como objetivo incrementar la escala productiva del Péptido Inmunomodulador, manteniendo las especificaciones de calidad. Para esto, se determinan las condiciones de operación en la etapa de síntesis química. Se evalúan los resultados obtenidos y se demuestra el cumplimiento de las especificaciones de calidad del producto en la nueva escala.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Las materias primas y reactivos utilizados en el proceso de obtención del péptido sintético CIGB-814 son suministrados por el proveedor Merck (Alemania) y se controlan según su especificación. Los equipos utilizados en el proceso están calibrados y calificados.

### Preparación de la resina

En el reactor (Buchiglasuster, Suiza), se realizaron lavados sucesivos a la resina MBHA con DCM (2 veces (v) / 1 L), disolución de TFA al 37 % en DCM (1 v / 1 L), DCM (2 v / 1 L), metanol (MeOH) (1 v / 1 L), DCM (2 v / 1 L), disolución de DIEA al 5 % en DCM (1 v / 1 L), DCM (2 v / 1 L) y DMF (4 v / 1 L). Se calcula la sustitución de la resina midiendo la absorbancia (Espectrofotómetro UV, Camspec, Inglaterra). (15)

### Acoplamiento del espaciador Fmoc-AM-OH

Se utiliza para lograr un mayor espaciado entre cada terminal carboxilo donde se acoplará el primer aminoácido de la cadena peptídica y evitar complejidad durante la formación de la cadena (15). Se calculó la cantidad de espaciador a utilizar mediante la siguiente ecuación:

$$G_{AA} = \frac{S}{1000} * L * E * PM_{AA}$$

Donde:

GAA: Cantidad de espaciador, (g)

S: Sustitución de la resina descrita en el frasco, (mmol/g)

L: Cantidad de resina empelada, (g) E: Número de excesos de reactivos  
PMAA: Peso molecular del espaciador, g/mol

Una vez calculada la cantidad a utilizar se pesó (Balanza Técnica, Sartorius, Alemania) en un vaso de precipitado. Se usó el DMF (1 v / 1L) como solvente, la solución de Piperidina al 20 por ciento en DMF (2 v/ 1L) para desproteger el extremo carboxilo que formará el enlace peptídico con el extremo amino del primer aminoácido y finalmente se realizaron 4 lavados con DMF para eliminar la Piperidina restante. (9)

### Ensamblaje de la secuencia

Se calculó y se pesó en un vaso de precipitado la cantidad de aminoácido correspondiente en la cadena:

$$G_{AA} = \frac{S}{1000} * L * E * PM_{AA}$$

Donde:

GAA: Cantidad de aminoácido por acoplamiento, (g) S: Sustitución de la resina, (mmol/g)

L: Cantidad de resina empelada, (g) E: Número de excesos de reactivos

PMAA: Peso molecular de cada aminoácido que se empleara en el acoplamiento, g/mol

Se usó el DMF (1 v / 1L) como solvente, la solución de Piperidina al 20 por ciento en DMF (2 v/ 1L) para desproteger el extremo carboxilo que formará el enlace peptídico con el extremo amino del primer aminoácido y finalmente se realizaron 4 lavados con DMF para eliminar la Piperidina restante.(9)

### Preparación de la resina para el desanclaje del péptido

Una vez acoplado todos los aminoácidos de la cadena se realizan lavados 4 lavados de 1 L con Metanol y 4 lavados de 1 L con Éter dietílico y se deja secar el péptido-resina al vacío con la ayuda de una bomba de vacío (VACCUBRAND/RZ-8) durante 24 horas. (15)

### Desanclaje del péptido de la resina y recuperación del péptido

La reacción de desanclaje ocurre con una solución de TFA al 95 por ciento, TIS al 2,5 por ciento y agua al 2,5 por ciento, utilizando de 12 mL de mezcla por cada gramo de péptido- resina (16). Luego se realizaron 3 centrifugaciones (Centrifuga refrigerada, Shanghai zhizheng, China) con Éter dietílico (500 mL cada vez), 1 centrifugación con agua purificada (500 mL) y finalmente el péptido crudo se disolvió en acetonitrilo (800 mL) y se congeló a -70 grados Celcius por 24 horas. (9, 15)

### Liofilización del péptido crudo

Las fracciones se liofilizaron (Liofilizadora, ILSHIN, Países Bajos) durante 72 horas. (17) Una vez terminada la liofilización se toman muestras del péptido crudo y se analiza la identidad y pureza mediante las técnicas analíticas espectrometría de masa (18) y RP- HPLC respectivamente (19).

Los parámetros operacionales a evaluar para el incremento de escala productiva son la masa de resina de partida y la velocidad de agitación. El proceso inicial de síntesis se realizó a una velocidad de 100 min<sup>-1</sup>, partiendo de 50 g de resina donde se obtuvo de 3 a 3,5 veces la cantidad de péptido-resina.

Se realizó un experimento estímulo respuesta con 3 velocidades diferentes 100, 80 y 60 min<sup>-1</sup>. Para esto se utilizó como sustancia trazadora una solución de TFA al 37% en DCM (1 L), y se observó el tiempo de mezclado utilizando la resina MBHA, ya que la misma cambia de color al mezclarse completamente con la solución, pudiéndose ver así si quedan áreas de zona muerta en el reactor.

### Análisis Estadístico

Para el estudio de la mejor condición de operación se realizó un diseño de experimento 22 con una réplica que permitió el estudio de la influencia de las variables de operación masa de resina y velocidad de agitación sobre las variables respuesta masa de péptido- crudo y pureza del crudo. Los resultados obtenidos serán analizados a través de la herramienta estadística Statgraphics Centurion XV Versión 15.2.05.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Selección de las condiciones de operación para el estudio del incremento de escala productiva

Dado la necesidad de incrementar la escala productiva se evaluó el aumento de la masa de resina de 50 a 150 g y se estudió su impacto en el cumplimiento de las especificaciones de calidad de esta etapa (pureza mayor o igual al 50 por ciento e identidad de 2986,1 a 2987,1 Da). Una vez decidido aumentar la escala productiva fue necesario el análisis de la variable de operación velocidad de agitación, considerando que el medio con que se trabaja es una suspensión y es importante evitar la turbulencia para cuidar la integridad de las perlas y a su vez se debe garantizar un buen mezclado en todo el volumen del reactor para favorecer la reacción de acoplamiento de los aminoácidos. (9, 15)

Se realizó un experimento estímulo respuesta con 3 velocidades diferentes 100, 80 y 60 min<sup>-1</sup> a temperatura ambiente. Se desechó la velocidad de 60 min<sup>-1</sup> debido a la presencia zonas muertas, se logró una suspensión de las perlas de resina, pero no en todo el volumen del reactor. Las velocidades de agitación seleccionadas para la realización de los experimentos fueron 100 y 80 min<sup>-1</sup>, las mismas garantizaron una buena suspensión de los sólidos en todo el volumen del reactor sin peligro de ruptura de las partículas.

#### Resultados de las condiciones de operación en la etapa de síntesis química

**Tabla 1.** Resultados de la masa de péptido-resina obtenida y el tiempo de realización de cada reacción de síntesis.

Masa de resina de partida (g)	Velocidad de agitación (min <sup>-1</sup> )	Masa de péptido resina (g)	Tiempo de realización de lote (días)
50	100	163,00	15
50	100	161,68	13
50	80	143,36	14
50	80	158,24	15
150	100	456,32	13
150	100	463,51	15
150	80	500,42	15
150	80	466,50	14

Tal como muestra la tabla 1, se obtuvo un incremento de péptido crudo de 3 veces la cantidad de masa de resina inicial. El tiempo de obtención de cada síntesis osciló entre 13 y 15 días. Aumentó la cantidad de aminoácidos a utilizar, pero la cantidad de solventes se mantuvo constante, esto se debe a la geometría del reactor que, al ser cilíndrico de fondo plano (volumen específico 5 L), para lograr la suspensión de las perlas cuando se parte de 50 g de resina es necesario utilizar una gran cantidad de solventes. Para las síntesis de 150 g de resina se puede utilizar la misma cantidad de

solventes por lotes, dado esto, hay un mayor aprovechamiento de los solventes y a su vez se puede considerar como un ahorro económico y una disminución del impacto negativo medioambiental. (20)

#### **Análisis del péptido crudo obtenido después de la realización del desanclaje**

Las síntesis que parten de 50 g de resina, se dividieron en dos desanclajes cada una y las síntesis que parten de 150 g de resina se fraccionaron en seis desanclajes. La literatura consultada refiere que la cantidad de mezcla óptima de desanclaje a utilizar es de 10 a 25 mL por cada gramo de péptido-resina (16), en este trabajo se utilizó una cantidad de solución de desanclaje de 12 mL por cada gramo de péptido-resina a desanclar, obteniendo altos recobrados de péptido-crudo con elevada pureza. En la tabla 2 se muestran los resultados de la cantidad de péptido crudo total obtenido por cada síntesis, el rendimiento de cada una ellas y el promedio de la pureza del total de desanclaje por síntesis.

**Tabla 2.** Resultados de masa de resina, rendimiento y promedio de la pureza de cada síntesis luego del total de desanclajes correspondientes, continuación de la **Tabla 1.**

<b>Masa de péptido resina (g)</b>	<b>Masa de péptido crudo (g)</b>	<b>Rendimiento (%)</b>	<b>Pureza (%)</b>
163	63,30	38,83	80,61
161,68	52,07	32,20	78,89
143,36	48,77	34,01	81,18
158,24	58,08	36,71	81,11
456,32	175,72	38,50	83,19
463,51	178,38	38,48	82,88
500,42	194,28	38,82	85,67
466,50	179,68	38,52	79,61

El rendimiento de los desanclajes osciló de 30 a 40 por ciento de la masa de péptido- resina.

#### **Análisis de las especificaciones de calidad para cada lote de desanclaje**

Según las especificaciones de calidad, el péptido crudo debe cumplir con una pureza mayor o igual a 50 por ciento e identidad de 2986,1 a 2987,1 Da.

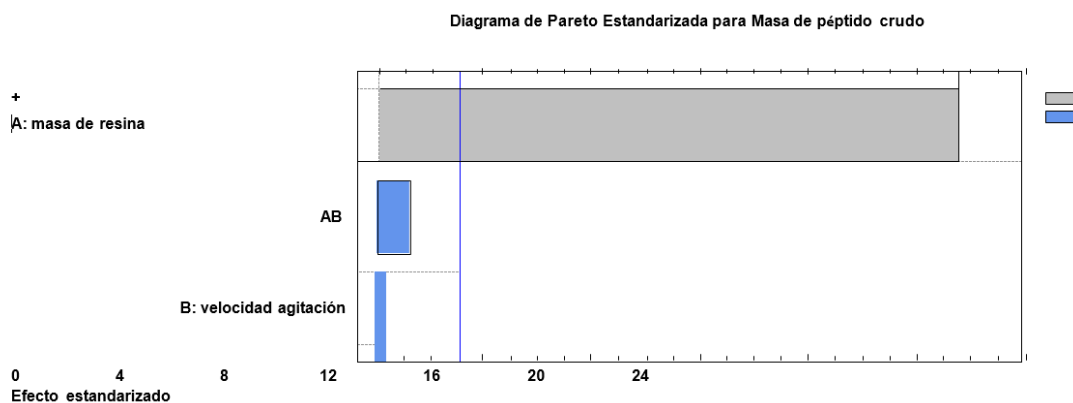
En la determinación por RP-HPLC y los espectros de masa del péptido crudo, los resultados obtenidos en los lotes fabricados a las dos escalas de trabajo se encuentran dentro de los límites establecidos en la especificación de calidad (NP 4398). La literatura refiere que la pureza de los péptidos crudos se encuentra en un intervalo de 50 a 70 por ciento, con un promedio de 60 por ciento (21). Es válido resaltar que la pureza del péptido crudo en este trabajo investigativo es superior a la especificación, obteniendo valores por encima del 78 por ciento, lo que representa un buen indicador de la correcta operación durante la síntesis química y el aprovechamiento de los reactivos, corroborando lo descrito en

la literatura. Así mismo todos cumplieron con la identidad garantizando así que el péptido obtenido es el de interés.

**Tabla 3.** Resultados del diseño de experimento

Bloque	Masa de resina		Velocidad de agitación		Masa péptido-crudo	Pureza
	Nivel	g	Nivel	min-1	g	%
1	-1,0	50	1,0	100	63,30	80,61
1	1,0	150	-1,0	80	194,28	85,67
1	-1,0	50	-1,0	80	48,77	81,18
1	1,0	150	1,0	100	175,72	83,19
2	-1,0	50	1,0	100	52,07	78,89
2	1,0	150	-1,0	80	179,68	79,61
2	-1,0	50	-1,0	80	58,08	81,11
2	1,0	150	1,0	100	178,38	82,88

En las figuras 1 A y 1 B se muestra el gráfico de Pareto que indica la influencia de las variables masa de resina de partida y velocidad de agitación sobre ambas variables respuesta.



**Fig. 1 A.** Influencia de las variables masa de resina y velocidad de agitación sobre la variable respuesta masa de péptido crudo.

#### ANOVA para la masa de péptido crudo

R-cuadrada = 99,4043 %

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 98,6101 % Error estándar del est. = 8,01041

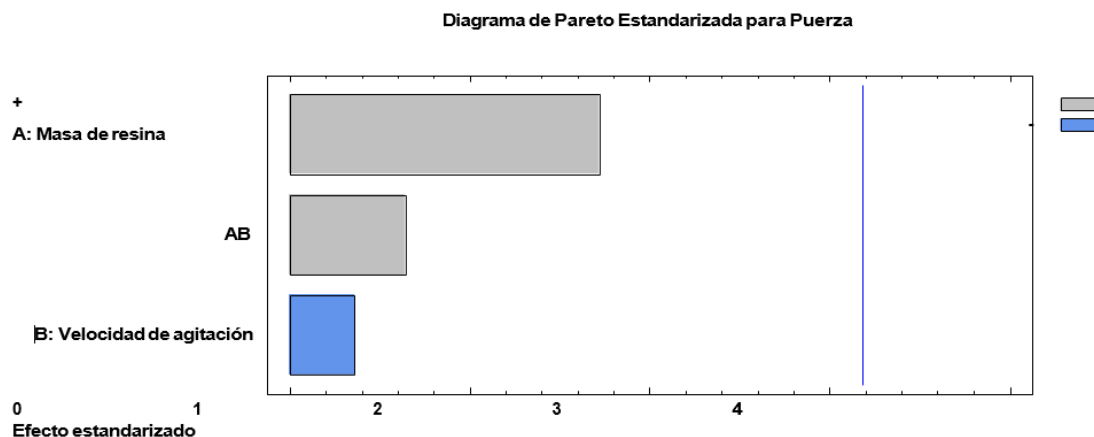
Error absoluto medio = 4,725

Estadístico Durbin-Watson = 1,63276 (P=0,2537)

Como se observa en la figura 1 A, solamente resultó significativo la masa de resina de partida con efecto positivo. El aumento de la misma trae como consecuencia un aumento en la masa de péptido-crudo obtenido, esto favorece el cumplimiento de la demanda del producto en el mercado. Los resultados indican que se debe trabajar partiendo de una masa de resina de 150 g.

Perdomo y colaboradores en el año 2021 (22) realizaron un estudio a diferentes velocidades de agitación con diferentes temperaturas. En su caso su mejor respuesta la obtuvo a 250 min-1. En este análisis al no resultar significativamente positiva la velocidad de agitación, se seleccionó 80 min-1 como condición de

operación. Teniendo en cuenta que a menor velocidad de agitación se garantiza menor daño a las partículas sólidas.



*Fig. 1 B. Influencia de las variables masa de resina y velocidad de agitación sobre la variable respuesta pureza*

ANOVA para la pureza del péptido crudo

R-cuadrada = 65,3828 %

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 19,2265 % Error estándar del est. = 1,9637

Error absoluto medio = 1,005

Estadístico Durbin-Watson = 2,45821 (P=0,6294)

Tal como se muestra en el diagrama de Pareto de la figura 1 B, las variables: masa de resina, velocidad de agitación y su interacción, no presentan influencia significativa sobre la variable respuesta pureza.

Una vez analizado los resultados anteriores, se establece como condición de operación para realizar la síntesis química utilizar 150 g de resina, donde la reacción ocurra a una velocidad de 80 min<sup>-1</sup>. Este aumento inicial trae consigo un aumento de la cantidad de péptido-resina obtenido en el mismo intervalo de tiempo y a su vez un aumento en la cantidad de péptido crudo por lote de síntesis química que cumple con las especificaciones establecidas de identidad 2986,1 a 2987,1 y pureza mayor al 50 por ciento. Es necesario utilizar mayor masa de aminoácidos, pero existe un mayor aprovechamiento de los solventes.

## CONCLUSIONES

Para lograr satisfacer la demanda del fármaco Juzvinza que utiliza como ingrediente farmacéutico activo el péptido 814, se logró establecer como condición de operación para la síntesis química utilizar 150 g de resina a una velocidad de 80 min<sup>-1</sup>. Logrando obtener un incremento de la producción en el mismo intervalo de tiempo, con el mismo consumo de solventes orgánicos y garantizando el cumplimiento de las especificaciones de calidad del producto según las regulaciones nacionales e internacionales.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Lowman SLHB. Therapeutic peptides. *Trends in Biotechnology*. 2003;21(12):556-62.
- Vlieghe P. Synthesis therapeutic peptides: science and market. *National Library of Medicine*. 2010.
- Dudek NL. Epitope discovery and their use in peptide based vaccines. *PubMed*. 2010:3149.
- McCluskey AWPJ. More than one reason to rethink the use of peptides in vaccine design. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2007;6:404-14.

- Stevenson CL. Advances in peptide pharmaceuticals. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2009;10(1):122-37.
- Alsina J, Kates SA, Barany G. Backbone amide linker strategies for the solid- phase synthesis of C-terminal modified peptides. *PubMed*. 2005:195-208.
- Amblard M, Fehrentz J-A. *Methods and protocols of modern solid phase peptide synthesis*. Springer Nature. 2006;33:239-54.
- Gracia SR, Gaus K. Synthesis of chemically modified bioactive peptides: recent advances, challenges and developments for medicinal chemistry. *Future Science*. 2009.
- Pérez HEG. Síntesis de péptidos modificados químicamente con posibles aplicaciones farmacéuticas [En opción al grado científico de Doctor en Ciencias Médicas]: Universidad de La Habana; 2012.
- Deza DACDJLZBYGC. Desarrollo de artritis reumatoide refractaria al tratamiento convencional. *Revista Cubana de Reumatología*. 2021;23(1):194.
- Ariana LPNBB. Un Ligando peptídico alterado como novedoso fármaco para el tratamiento de la artritis idiopática juvenil. *Revista Cubana de Reumatología*. 2009;11(14):1817-5996.
- Horta MdCD. CIGB-814, un nuevo candidato terapéutico para la artritis reumatoide, basado en la inducción de la tolerancia periférica. *Revista Anales de la Academia de Ciencias de Cuba*. 2018:9.
- Goes FRCSMR-LTIFvd. Células T reguladoras tímicas: su origen, función e importancia en la salud y la enfermedad. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*. 2017;60(5):2448-4865.
- Dominguez-Horta MdC. CIGB-258, a peptide derived from human heat-shock protein 60, decreases hyperinflammation in COVID-19 patients. *Cell Stress Society International*. 2021;26:515-25.
- Román IC. Estudio de la reacción de síntesis en fase sólida del péptido CIGB- 300: Universidad Tecnológica de La Habana "José Antonio Echeverría"; 2020.
- Novabiochem. *Peptide Synthesis*. In: Merck, editor. 2014/2015.
- Jang J-W. *Lyophilization and stability studies of peptides and related compounds*. Iowa: University of Iowa; 1995.
- Jordana-Lluch E, Catalá EM, Ruiz VA. La espectrometría de masa en el laboratorio de microbiología clínica. *Elsevier*. 2012;30(10):635-44.
- Aguilar M-I. *HPLC of peptides and proteins* 2001.
- Cavazzini LFMCA. Sustainability in peptide chemistry: current synthesis and purification technologies and future challenges. *Green Chemistry*. 2022;1039(4).
- Fujifilm. *Peptide Synthesis: What level of purity do you need?* Biocompare2012
- Nafiah HPNAK. The effect of stirring speed and reactant residence time in the bench scales CSTR on the reaction conversion of ZBS. *ELSEVIER*. 2022;61(6):1309

*Este artículo no presenta conflicto de interés*

### CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

**Ivet Castellanos Román, Ever Pérez Hernández, Denia González León:** *Conceptualización.*

**Yaima Mortarell Pérez, Lisamaris Pico Brea:** *Investigación y análisis de datos.*

**Antonio J. Antequera Guevara:** *Redacción, revisión y edición.*