

Escalado y estandarización de la síntesis en fase sólida de un péptido para el tratamiento de pacientes con Artritis Reumatoide y COVID-19

Scale-up and standardization of the solid-phase synthesis of a peptide for the treatment of patients with Rheumatoid Arthritis and COVID-19

Ever Pérez-Hernandez^{1*} <http://orcid.org/0000-0002-4571-5750>

Yaima Martorell-Pérez¹ <https://orcid.org/0009-0000-1053-352X>

Lourdes Zumalacárregui-de Cárdenas² <http://orcid.org/0000-0001-6921-737X>

Denia González-León³ <http://orcid.org/0000-0002-8493-5174>

Miladys Limonta-Fernández¹ <http://orcid.org/0000-0002-1664-5255>

¹Centro de ingeniería genética y biotecnología, La Habana, Cuba

²Universidad Tecnológica de la Habana, "José Antonio Echeverría", La Habana, Cuba

³Complejo industrial biotecnológico Mariel. Artemisa, Cuba

* Autor para correspondencia. Correo electrónico: ever.perez@cigb.edu.cu

RESUMEN

El péptido CIGB-814, se utilizó inicialmente para tratar a pacientes con Artritis Reumatoide (AR); sin embargo, su uso en pacientes con COVID-19 durante la pandemia, hizo que se requiriera ampliar la capacidad productiva existente. No existía un procedimiento de síntesis en fase sólida (SPFS) a gran escala estandarizado para producirlo de conformidad con las Buenas Prácticas de Fabricación (BPF). El objetivo principal del estudio fue estandarizar la SPFS para producir el péptido CIGB-814 utilizando hasta 200 g de resina MBHA. Primero, se escaló y estableció la SPFS para 50 g de resina aplicando la regla del pulgar, evaluando los criterios (potencia por unidad de volumen (P/V) y velocidad en la punta del impiacente (NDi)). Luego se estandarizaron las condiciones experimentales a 200 g de resina MBHA, combinados con la determinación de la identidad del péptido por espectrometría de masas y la



pureza por RP-HPLC. Se estudiaron las condiciones de reacción obteniendo que a 200 g de resina MBHA y velocidad de agitación de 80 min^{-1} , $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, en un reactor de geometría 20/20 cm/cm altura/diámetro, se incrementa hasta cuatro veces la masa del péptido CIGB-814 crudo, el rendimiento en 7,5 %, manteniendo la pureza del material; con el mismo consumo total de disolventes orgánicos en igual intervalo de tiempo. Como conclusión, el escalado y la estandarización de la SPFS para la producción del péptido CIGB-814 bajo BPF a una escala de 200 g de resina MBHA satisface la demanda del producto biofarmacéutico Jusvinza® diseñado para tratar pacientes con AR y COVID-19.

Palabras clave: artritis reumatoide; COVID-19; escalado de reactores; síntesis de péptidos.

ABSTRACT

The CIGB-814 peptide was initially designed to treat patients with Rheumatoid Arthritis (RA); however, the expansion of its use to COVID-19 patients during the pandemic led to a required increment of the peptide manufacturing capacity. There was no standardized large-scale solid-phase synthesis (SPPS) procedure to produce it in compliance with Good Manufacturing Practices (GMP). The primary objective of the study was to standardize an SPPS procedure to produce the CIGB-814 peptide using up to 200 g of MBHA resin. First, the SPPS procedure was scaled up and established for 50 g of MBHA resin by applying the rule of thumb, evaluating two scale-up criteria (power per unit volume (P/V) and nozzle tip velocity (DTI)). The experimental conditions were standardized to 200 g of MBHA resin, combined with the determination of peptide identity by mass spectrometry and purity by RP-HPLC. The reaction conditions were studied, obtaining that at 200 g of MBHA resin and a stirring speed of 80 min^{-1} , $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, in a 20/20 cm/cm height/diameter geometry reactor, the mass of the crude CIGB-814 peptide increases up to fourfold, the yield at 7.5%, maintaining the purity of the material; with the same total consumption of organic solvents in the same time interval. In conclusion, the scaling and standardization of the SPFS for the production of the CIGB-814 peptide under GMP at a scale of 200 g of MBHA resin meets the demand for the biopharmaceutical product Jusvinza® designed to treat patients with RA and COVID-19.

Keywords: COVID-19; peptide synthesis; rheumatoid arthritis; reactor scale-up.

Recibido: 25/10/2025

Aceptado: 22/12/2025

Introducción

Las nuevas metodologías de síntesis química de péptidos han permitido descubrir compuestos con potencial para convertirse en agentes terapéuticos o vacunas, fármacos que se utilizan para el tratamiento de diversas enfermedades como el cáncer, enfermedades infecciosas virales y bacterianas; y la diabetes.⁽¹⁾ En el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), se estableció la metodología de síntesis en fase sólida a escala de laboratorio para péptidos de hasta 50 residuos.⁽²⁾ Una de estas moléculas sintéticas es el CIGB-814, con 27 aminoácidos en su secuencia, siendo el Ingrediente Farmacéutico Activo (IFA) del medicamento Jusvinza®, producto para el tratamiento de la Artritis Reumatoide (AR) debido a su efecto antiinflamatorio y la mejora de la actividad de las células T reguladoras.⁽³⁾ En base a estas evidencias, también se utilizó con excelentes resultados en pacientes graves y críticos de COVID-19 para eliminar la hiperinflamación pulmonar.⁽⁴⁾ Por tanto, se incrementó la demanda del péptido entre 3-4 kg por año lo que requirió un aumento en la capacidad de producción del CIGB-814. Para su obtención en el laboratorio se utiliza el procedimiento de síntesis en fase sólida (SPFS), tecnología que simplifica los procesos de síntesis por su alta efectividad y tasa de acoplamientos efectivos.^(5,6) Asimismo, en esta técnica se debe tener en cuenta que el carácter hidrofóbico de la secuencia peptídica y su tamaño juegan un importante papel en la pureza y el rendimiento de producto obtenido.⁽⁷⁾ Para el incremento de la capacidad productiva se requiere realizar el escalado del proceso. El escalado de procesos químicos para productos biofarmacéuticos es una tarea compleja, debido a que tiene requerimientos técnicos y requisitos regulatorios farmacéuticos. Para lograr un escalado exitoso, se deben aplicar un conjunto de técnicas, metodologías y procedimientos que permitan transferir procesos desde el laboratorio a las plantas de producción. Existen varios criterios de escalado vinculados

directamente a las variables que afectan al sistema a escalar, entre ellos, el número de Reynolds, tiempo de mezclado, la velocidad de agitación, velocidad en la punta del impulsor, potencia por unidad de volumen y el coeficiente de transferencia de masa volumétrica.^(8,9,10) Este trabajo tuvo como objetivo, aplicando las técnicas y metodología establecidas, realizar el escalado y la estandarización de la SPFS para producir el péptido CIGB-814 con una pureza y un rendimiento adecuados utilizando hasta 200 g de resina MBHA para así cumplir con la demanda comercial del producto Jusvinza®.

Materiales y métodos

Reactivos y solventes

Resina MBHA (amino-(4-metil-fenil)metil poliestireno), espaciador Fmoc-AM-OH, piperidina, N,N dimetilformamida (DMF), ácido trifluoroacético (TFA), piperidina, N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC), Oximapure®, acetonitrilo (ACN), triisopropilsilano (TIS), diclorometano (DCM) y los aminoácidos protegidos con Fmoc. Los reactivos y solventes utilizados en este trabajo tienen calidad para síntesis de péptidos y fueron suministrados por los laboratorios Merck KGaA (Darmstadt, Alemania).

Instrumentación y equipamiento

Para el análisis del material obtenido se utilizó un sistema de cromatografía de alta resolución con una longitud de onda de 226 nm (HPLC, software LabSolutions, Corporación Shimadzu, Kioto, Japón) con una columna C-18 de 150 mm x 4,6 mm, 5 µm, 300 Å° (Vydac, Grace Davison, IL, E.U.A). Espectrómetro de masas con fuente de ionización de electrospray y detector de tiempo de vuelo (ESI-QTOF) (Micromass, E.U.A).

En la escala de laboratorio se utilizó un reactor cilíndrico de fondo cónico con un volumen total de 0,237 L. Para el escalado, se contó con un reactor de geometría cilíndrica de fondo plano de volumen total 6 L (modelo SPPS DN200/6L, BUCHI) con impelente tipo ancla. Ambos equipos no tienen similitud geométrica. Sus características se presentan en la tabla 1.

Tabla 1- Características de los reactores y datos necesarios para el escalado del proceso productivo del péptido CIGB 814

| Volumen reactor, V_T (L) | Volumen efectivo de trabajo, V_e (L) | Diámetro del impelente, D_i (cm) | Diámetro reactor, D_T (cm) | Altura reactor, H_T (cm) | Altura líquido, H_L (cm) | Altura impelente, H_i (cm) |
|-------------------------------|---|---------------------------------------|---------------------------------|----------------------------|----------------------------|------------------------------|
| 0,237 | 0,230 | 3,57 | 6,15 | 9,5 | 9 | 6,15 |
| 6 | 5 | 19 | 20 | 20 | 15 | 19 |

Criterios para el escalado del proceso

Para el escalado se utilizó el método de la regla del pulgar, este se basa en establecer un criterio que se mantendrá constante en las dos escalas. Se tuvieron en cuenta los criterios de potencia por unidad de volumen (P/V) y velocidad en la punta del impelente (ND_i) constante. Se consideró régimen turbulento con un número de Reynold ($Re \geq 10^5$) debido a que el reactor utilizado en el escalado no tiene deflectores ⁽¹¹⁾ y en este caso el número de potencia (N_p) depende solamente del tipo de impelente,⁽¹²⁾ por lo que se supuso N_p constante para ambas escalas de trabajo.

Determinación de la velocidad de agitación en el reactor escalado

Con el objetivo de establecer las variables de escalado se utilizaron los datos mostrados en la tabla 1. Para el cálculo de la velocidad de agitación (N), en el caso de P/V se calculó a través de la ecuación 1 empleada cuando no hay similitud geométrica entre los reactores y para ND_i la ecuación 2. Se utilizó la ecuación 3 para el cálculo del factor geométrico (F_G) y la ecuación 4 para el número de Reynolds (Re).

La velocidad de agitación a escala de laboratorio es igual a 520 min^{-1} . El disolvente orgánico empleado en la síntesis química es la DMF, que presenta las siguientes propiedades: $\rho = 940 \text{ kg/m}^3$ y $\mu = 4,73 \times 10^{-4} \text{ Pa}\cdot\text{s}$.

$$\left(\frac{Np \cdot n^3 \cdot d_i^5 \cdot \rho \cdot f_c}{\frac{\pi}{4} \cdot D^2 \cdot H_L + \frac{\pi}{3} \cdot r^2 \cdot h} \right)_L = \left(\frac{Np \cdot n^3 \cdot d_i^5 \cdot \rho \cdot f_c}{\frac{\pi}{4} \cdot D^2 \cdot H_L} \right)_P \quad (1)$$

$$N_L \cdot Da_L = N_P \cdot Da_P \quad (2)$$

donde:

N velocidad de agitación

Da diámetro del impelente

L, subíndice escala de laboratorio

P, subíndice escala productiva

$$F_G = \sqrt{\frac{(D_{di} \cdot H_{di})}{3}} \quad (3)$$

$$Re = \frac{\rho \cdot N \cdot D}{\mu} \quad (4)$$

Procedimiento general de síntesis de péptidos en fase sólida (SPFS)

Se utilizó la SPFS mediante la química Fmoc/tBu (9-fluorenilmetiloxicarbonilo/*ter*-Butilo) donde el aminoácido correspondiente al extremo C del péptido se acopla al soporte sólido funcionalizado. Los restantes aminoácidos se ensamblan mediante ciclos de acoplamiento y desprotección hasta completar la secuencia peptídica. Como soporte sólido se empleó la resina MBHA (amino-(4-metil-fenil)metil poliestireno) con una sustitución de 0,50 mmol de grupos amino/g de resina y como espaciador el Fmoc-AM-OH. El grupo Fmoc que protege el grupo Nα-amino se eliminó mediante el tratamiento con una disolución de piperidina:DMF (2:8, v/v) (2 × 10 min). El acoplamiento de cada aminoácido y del espaciador se realizó mediante el método de activación con DIC/Oximapure®, se utilizaron cuatro equivalentes de los reactivos y DMF como disolvente. El completamiento de la reacción de acoplamiento se verificó por el método de ninhidrina.⁽¹³⁾ Todas las reacciones y lavados se realizaron en un reactor con agitación mecánica fabricado por la firma Suiza Buchiglass y los disolventes o reactivos se eliminaron por filtración

al vacío. La desprotección de las cadenas laterales de los aminoácidos y la separación del péptido de la resina se realizaron por tratamiento con una disolución de TFA: H₂O: TIS (95:2,5:2,5, v/v) durante dos horas a 25°C. El péptido se precipitó en éter a -70°C, se redissolvió en una disolución de ACN: H₂O (4:6, v/v) y se secó en una liofilizadora (LABCONCO, EUA) durante 72 h. Para determinar el correcto ensamblaje de la secuencia de aminoácidos del péptido se determinó la identidad por espectrometría de masas ⁽¹⁴⁾ la que debe ser de 2986 ± 0,5 Da y la pureza del péptido crudo por RP-HPLC ≥ 50 %. ⁽¹⁵⁾

Caracterización del péptido CIGB 814

Para la pureza se utilizó la técnica de cromatografía de fase reversa en alta resolución modelo LC 20 AD (RP-HPLC, Corporación Shimadzu, Kioto, Japón). Columna cromatográfica C-18, Vydac 5 µm, 300 Aº, 150 mm x 4,6 mm. Fase móvil: Solución A: TFA 0,1 % en agua, solución B: TFA 0,05 % en ACN. Gradiente de 5 %-35 % de B en 35 minutos. Flujo volumétrico 1 ml/min. λ= 226 nm. Los cromatogramas fueron adquiridos y analizados utilizando el software LabSolutions. Para confirmar la masa molecular se utilizó un espectrómetro de masas con fuente de ionización de electroespray y detector de tiempo de vuelo (ESI-QTOF) (Micromass, E.U.A). Los espectros fueron adquiridos y procesados utilizando el software MassLynx 3.5.

Evaluación de los parámetros de operación

Para el escalado productivo se evaluaron la masa de resina de partida y la velocidad de agitación, a 25 °C. En el caso de la masa de resina se evaluó el intervalo entre 50 g y 200 g. Para seleccionar la velocidad de agitación se realizó un experimento de homogenización con valores de 100, 80 y 60 min⁻¹, los valores se fueron disminuyendo con el objetivo de reducir el consumo energético en la operación.

Para el experimento se utilizó una disolución de TFA: DCM (37,63, v/v), la resina MBHA se tiñe de color carmelita al ser resuspendida en ella por lo que se observó cómo ocurría el proceso de homogenización a partir del cambio de coloración de esta al mezclarse completamente con la disolución y determinar así el área de zona muerta en el reactor.

Para el estudio de la mejor condición de operación se realizó un diseño factorial multinivel 2², con una réplica que permitió el estudio de la influencia de las variables de operación masa de resina a los niveles de 50 g y 200 g y

velocidad de agitación a 80 min^{-1} y 100 min^{-1} sobre las variables respuesta rendimiento de péptido crudo, rendimiento específico de péptido crudo y la pureza del péptido crudo. Para el diseño y evaluación de los resultados obtenidos se utilizó el software Statgraphics Centurion XV Versión 15.2.05 (StatPoint Technologies, EUA).

Cálculo de rendimientos en la síntesis

Para la cuantificación del rendimiento del péptido crudo se emplearon las ecuaciones 5, 6 y 7, expresiones empleadas en trabajos previos. ⁽¹⁶⁾

$$\text{Crudo teórico (g)} = \text{Masa de resina} \times \text{Sustitución de la resina}$$

$$\times \text{Masa molecular del péptido} \quad (5)$$

$$\text{Rendimiento de crudo \%} = \frac{\text{Crudo obtenido (g)}}{\text{Crudo teórico (g)}} \times 100 \quad (6)$$

$$\text{Rendimiento específico de crudo (\%)} = \frac{\text{Pureza (\%)} \times \text{Crudo obtenido (g)}}{\text{Crudo teórico (g)}} \quad (7)$$

Resultados y discusión

Criterios para el escalado del proceso

Mediante la aplicación de los criterios de escalado seleccionados, potencia por unidad de volumen P/V y velocidad en la punta del impelente constante NDi, se calcularon las velocidades de agitación para cada uno de ellos así como el número de Reynolds. Los datos obtenidos se presentan en la tabla 2.

Tabla 2 - Resultados de los criterios de escalado aplicando la regla del pulgar

| Criterios | $N_2 (\text{min}^{-1})$ | Re_2 |
|-----------|-------------------------|--------------------|
| P/V | 120 | $7,55 \times 10^5$ |
| NDi | 100 | $6,29 \times 10^5$ |

Con los resultados mostrados en la tabla 2 se comprobó que el régimen hidrodinámico del medio es turbulento ya que se obtuvo un valor de $Re > 10^5$,

válido para el reactor utilizado en el escalado,⁽¹¹⁾ por lo que la suposición de Np constante fue correcta.

Al analizar los valores de velocidad en la tabla 2 se observó que para el criterio de P/V se obtiene un valor igual a 120 min⁻¹, al realizar las pruebas de mezclado en el reactor a esta velocidad ocurrió la aparición de vórtices y salpicaduras, lo que pudiera afectar la integridad de las perlas de la resina MBHA debido a que pueden deformarse, esto no favorece la reacción de síntesis química pues atenta contra el ensamblaje de la secuencia de aminoácidos y pudiera generar obstrucción en la placa filtrante del reactor. Al probar la velocidad de 100 min⁻¹, obtenido con el criterio de NDi, se observó un buen mezclado garantizando la suspensión de las partículas en todo el volumen de mezcla, por tanto, se tomó este valor de velocidad de agitación como punto de partida para estudiar las condiciones de operación en la etapa de síntesis química para el reactor de 5 L de volumen específico de la planta de producción.

Selección de las condiciones de operación para el estudio del escalado productivo en la operación de SPFS

Dada la necesidad del escalado productivo se evaluó el incremento de la masa de resina en el intervalo de 50 g a 200 g y se estudió su impacto sobre el rendimiento del péptido crudo (RPC), el rendimiento específico del péptido crudo (REPC) y la pureza al final de la operación de la síntesis química.

Para la variable de operación, velocidad de agitación, considerando que el medio con que se trabaja es una suspensión es importante cuidar la integridad de las perlas, garantizar una buena suspensión en todo el volumen del reactor y favorecer así la reacción de acoplamiento de los aminoácidos.⁽¹⁷⁾ Se realizó el experimento de homogenización de la resina a las velocidades de 100, 80 y 60 min⁻¹ a temperatura ambiente y se determinó desechar la velocidad de 60 min⁻¹ debido a la presencia de zonas muertas, al no lograrse una suspensión uniforme de las perlas de resina en el volumen del reactor. Por consiguiente, las velocidades de agitación seleccionadas para la realización de los experimentos de escalado fueron 100 y 80 min⁻¹, con estas se garantizó una buena suspensión de los sólidos en todo el volumen del reactor sin peligro de ruptura de las partículas de resina.

Análisis de la influencia de la masa de resina de partida y la velocidad de agitación sobre el rendimiento, rendimiento específico y la pureza del péptido crudo

En la tabla 3 se muestra el diseño experimental y los resultados obtenidos del estudio de la influencia de la masa de resina de partida y la velocidad de agitación sobre el RPC, el REPC y la pureza del péptido crudo.

Tabla 3-Resultados de la aplicación del diseño experimental propuesto, en términos de RPC, REPC y Pureza, variando condiciones de Masa de resina y Velocidad de agitación.

| Bloque | Masa de resina | Velocidad de agitación | (RPC) | (REPC) | Pureza |
|--------|----------------|------------------------|-------|-------------------|--------|
| | Nivel | g | Nivel | min ⁻¹ | % |
| 1 | -1,0 | 50 | 1,0 | 100 | 84,78 |
| 1 | 1,0 | 200 | -1,0 | 80 | 86,73 |
| 1 | -1,0 | 50 | -1,0 | 80 | 63,32 |
| 1 | 1,0 | 200 | 1,0 | 100 | 79,45 |
| 2 | -1,0 | 50 | 1,0 | 100 | 69,74 |
| 2 | 1,0 | 200 | -1,0 | 80 | 80,21 |
| 2 | -1,0 | 50 | -1,0 | 80 | 77,79 |
| 2 | 1,0 | 200 | 1,0 | 100 | 79,63 |

En las figuras 1 y 2 se muestran los diagramas de Pareto (**A**) y el gráfico de efectos principales (**B**) para las variables respuesta RPC y REPC. Del análisis de estos gráficos se puede concluir que el incremento de la masa inicial de resina y la velocidad de agitación, en la operación de síntesis, tienen un efecto positivo no significativo sobre ambas variables respuesta.

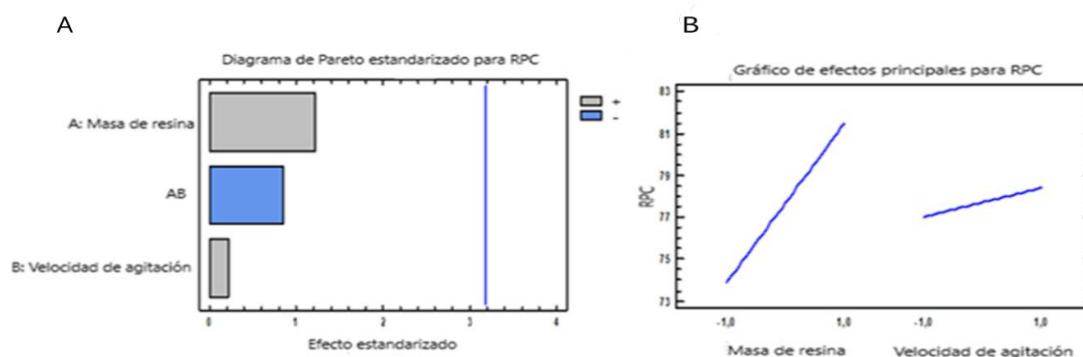


Fig. 1- Diagrama de Pareto (**A**) y Gráfico de efectos principales (**B**) para la influencia de las variables masa de resina y velocidad de agitación sobre la variable respuesta rendimiento de péptido crudo

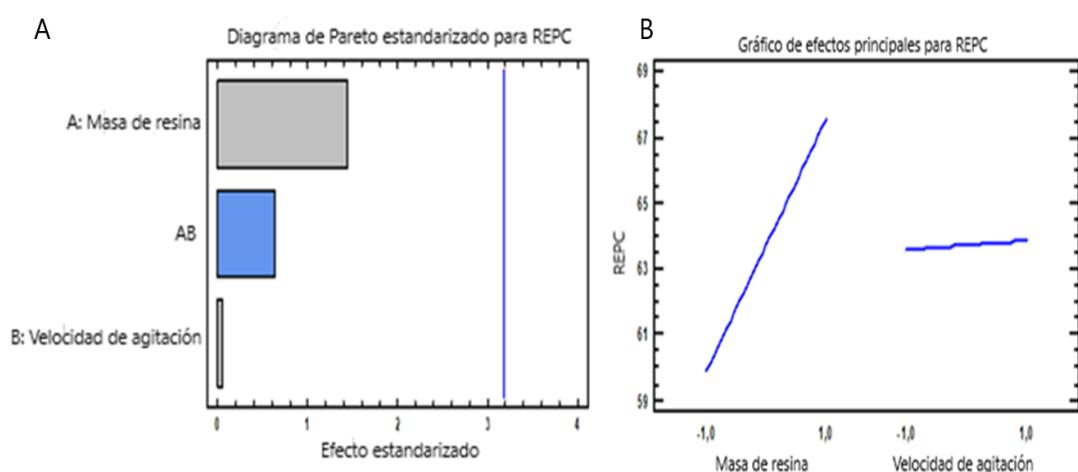


Fig.2- Diagrama de Pareto **(A)** y Gráfico de efectos principales **(B)** para la influencia de las variables masa de resina y velocidad de agitación sobre la variable respuesta rendimiento específico de péptido crudo

En el caso de la influencia de la velocidad de agitación a 80 y 100 min^{-1} . Ramírez y colaboradores ⁽¹⁸⁾ plantean que un aumento de la velocidad de agitación favorece la transferencia de masa por incremento de los coeficientes de transferencia de masa. Sin embargo, en este análisis al no resultar significativa la velocidad de agitación, y a los efectos de la variable respuesta analizada, se puede seleccionar 80 min^{-1} como condición de operación. La resina MBHA es una partícula esférica que puede sufrir deformación en el proceso de síntesis lo que puede perturbar el ensamblaje de la secuencia de aminoácidos, afectando los tiempos de acoplamiento y los recobrados en la operación.

En la figura 3 se muestra el diagrama de Pareto **(A)** y el gráfico de efectos principales **(B)** para la variable pureza del péptido crudo, estos indican la influencia de las variables masa de resina de partida y velocidad de agitación; de ellos se puede concluir que ambas no tienen influencia significativa sobre la variable respuesta. Lo anterior se corrobora cuando se analizan los datos obtenidos de la tabla 3, los valores no difieren significativamente por lo que, para esta variable, se puede trabajar en cualquier condición de las estudiadas.

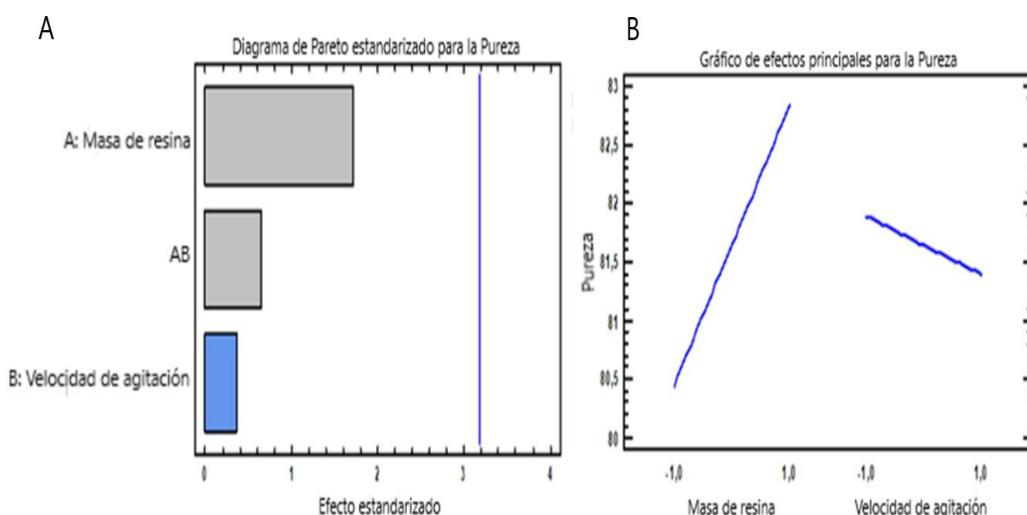


Fig.3- Diagrama de Pareto **(A)** y Gráfico de efectos principales **(B)** para la influencia de las variables masa de resina y velocidad de agitación sobre la variable respuesta pureza del crudo

Una vez presentados estos resultados es necesario señalar que Castellanos y colaboradores ⁽¹⁹⁾ obtienen un incremento de la masa del péptido crudo CIGB 814 cuando aumentan la masa de resina en la operación de síntesis, lo que es de esperar si se tiene en cuenta que la masa de resina de partida es mayor.

En este trabajo se evalúan los criterios de escalado P/V y NDi, se conoce el régimen de mezclado, se calculan las velocidades de agitación para cada uno de ellos, se eligen las condiciones de trabajo en el escalado industrial y se estandarizó el proceso en conformidad con las Buenas Prácticas de Fabricación. Asimismo, se realizó un análisis del efecto de las variables velocidad de agitación y masa de resina sobre el RPC, el REPC y la pureza del material. Consideramos que conocer el REPC es importante ya que, al estar relacionado con la pureza del material obtenido, nos da la calidad del proceso de síntesis, lo que hace posible implementar un proceso posterior de purificación donde se obtengan altos recobrados del IFA.

Del análisis de los resultados se puede concluir que es posible trabajar partiendo de una masa de resina desde 50 g hasta 200 g. Además, se debe apuntar que, trabajar a 80 min^{-1} y no a 100 min^{-1} pudiera traer un importante ahorro energético en la operación. Por tanto, con el objetivo de incrementar la productividad se toma la condición 200 g y 80 min^{-1} ; con estas condiciones de operación se realizó una campaña productiva a escala industrial de

52 procesos de síntesis en la que todos los lotes obtenidos fueron liberados satisfactoriamente. En ellos, se obtuvieron valores de pureza del péptido crudo de $79,53 \pm 5,9\%$ ($CV=2,31$) y un $68,07 \pm 5,01\%$ ($CV=5,41$) de REPC, estos valores demuestran que se cuenta con un proceso de SPFS reproducible y robusto. Lo que favorece la entrega del IFA del péptido CIGB 814 para el cumplimiento de la demanda del producto Jusvinza® con fines clínicos y comerciales.

Por otro lado, dada la geometría del reactor, cilíndrico de fondo plano de volumen específico 5 L, se aumentó la masa de aminoácidos a utilizar pero el consumo de disolventes se pudo mantener constante ya que se requiere de igual volumen para mantener una suspensión homogénea en ambas masas de resina lo que se traduce en un mayor aprovechamiento de estos. El mantener la masa de disolvente constante hace que la relación de disolvente/masa de resina sea inferior, lo que tiene un efecto positivo en el proceso tanto desde el punto de vista económico como medioambiental.

Análisis de pureza del péptido crudo por RP-HPLC e identidad por espectrometría de masas

En la figura 4 se presenta una comparación de los perfiles cromatográficos de RP-HPLC analítico y los espectros de masa (ESI-MS) del péptido CIGB 814 crudo obtenidos en ambas escalas de la operación de síntesis (A: masa de resina igual a 50 g y B: masa de resina igual a 200 g). Como aquí se observa, y se ha comentado con anterioridad en este trabajo, la pureza del péptido crudo superó el 80 % por RP-HPLC para ambas escalas de trabajo. Por otro lado, las masas experimentales obtenidas por ESI-MS (mostradas en la esquina superior derecha de ambos espectros) se corresponden con la masa molecular teórica de esta molécula sintetizada ($2986,6 \pm 0,5$ Da).

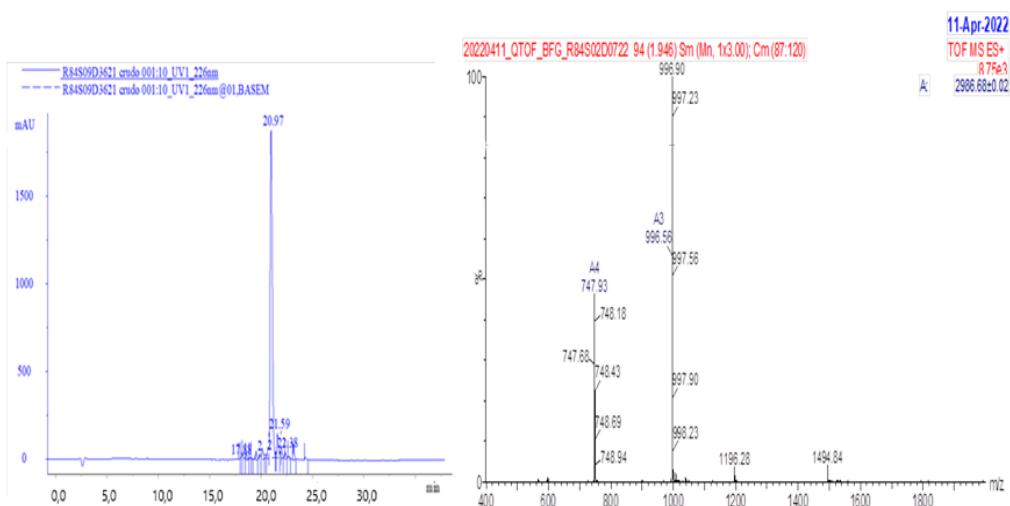
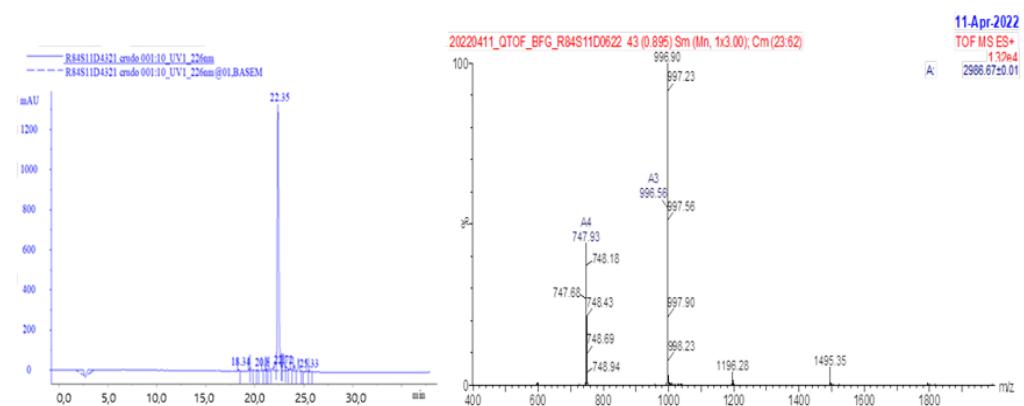
A**B**

Fig. 4. Perfiles cromatográficos de RP-HPLC (UV $\lambda=226$ nm) y espectros de masa obtenidos para el péptido crudo del CIGB 814, a diferentes escalas de síntesis. **(A):** Péptido crudo con pureza de 80,44 %, obtenido a partir de 50 g de resina. **(B):** Péptido crudo con pureza de 82,83 %, obtenido a partir de 200 g de resina

Se reporta que la pureza de los péptidos crudos se encuentra en un intervalo de 50 % a 80 %, con una media del 65 %. ^(15,17) Guzmán y colaboradores, ⁽²⁰⁾ a través del empleo de la SPFS, sintetizan péptidos con naturaleza aminoacídica similar al CIGB 814 y obtienen como promedio resultados de pureza del péptido crudo igual a 64,4 %. Sin embargo, en este trabajo, en cualquiera de las condiciones de reacción estudiadas, se obtienen valores de pureza de superiores al 80 %; como se muestran en la tabla 3, lo que demuestra que se cuenta con un proceso de SPFS reproducible y robusto.

Asimismo, representa un buen indicador de la correcta operación durante la síntesis química y el aprovechamiento de las materias primas. Todo esto corrobora lo descrito por Ferrazano y colaboradores⁽²¹⁾ cuando plantean que, el objetivo principal en la operación de síntesis química es obtener péptidos crudos con la mayor pureza posible para así facilitar la operación de purificación y disminuir la generación de residuales químicos; lo anterior se logra en este trabajo con las condiciones de operación estudiadas. Por otro lado, para todos los experimentos realizados, se cumplió con la identidad por espectrometría de masas, demostrándose el correcto ensamblaje de la secuencia de aminoácidos durante la síntesis.

Una vez analizados los resultados anteriores, se estableció como condición de operación, para realizar la síntesis química del péptido CIGB 814 a escala industrial, 200 g de resina y una velocidad de agitación en el reactor de 80 min⁻¹. Estas condiciones conllevan a un incremento en los rendimientos del péptido crudo obtenido con valores aceptables de pureza para este material, todo en el mismo intervalo de tiempo.

Conclusiones

Se escaló y estandarizó el proceso de SPFS del péptido CIGB 814, se estudiaron y establecieron nuevas condiciones de operación en la SPFS para esta molécula sintética, lo que permitió incrementar la cantidad de péptido crudo hasta 4 veces y el rendimiento del péptido crudo en un 7,5 % sin comprometer la pureza del material ni la identidad de la molécula. Con las nuevas condiciones se mantuvo el consumo total de disolventes orgánicos en el mismo intervalo de tiempo.

El escalado y la estandarización de la SPFS para la producción del péptido CIGB-814 bajo BPF a una escala de 200 g de resina MBHA, permite satisfacer la demanda del producto farmacéutico Jusvinza® diseñado para tratar pacientes con AR y COVID-19.

Referencias bibliográficas

1. WANG, L., WANG, N., ZHANG, W. et al. Therapeutic peptides: Current applications and Future Directions. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2022; **7**: 48. ISSN 2095-9907. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00904-4>
2. PEREA, S. E., PERERA, Y., RODRÍGUEZ-ULLOA, A., RAMOS, Y., ROSALES, M., PADRÓN, G. Nuevos eventos moleculares vinculados al mecanismo de acción antineoplásico del CIGB-300. *Anales de la Academia de Ciencias de Cuba*. 2022; **12**(2). ISSN 2304-0106. http://www.scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2304-01062022000200030
3. CORRALES, O., HERNÁNDEZ, L., PRADA, D., GÓMEZ, J., REYES, Y., LÓPEZ, A. M., GONZÁLEZ L. J., DOMÍNGUEZ HORTA M. del C. CIGB-814, an altered peptide ligand derived from human heat-shock protein 60, decreases anti-cyclic citrullinated peptides antibodies in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*. 2019. **38**(3):955-960. doi: 10.1007/s10067-018-4360-3. ISSN 0770-3198.
4. VENEGAS, R., et al. Jusvinza. An anti-inflammatory drug derived from the human heat-shock protein 60, for critically ill COVID-19 patients. An observational study. *PLOS ONE*. 2023; **18**(2): e0281111. ISSN 1932 6203. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0281111>.
5. ISIDRO-LLOBET, A., et al. Sustainability challenges in peptide synthesis and purification: from R&D to production. *The Journal of organic chemistry* 2019; **84**, 46-4628.ISSN 0022 3263.
6. WANG, X. & JIN, K. Chemical synthesis of peptides and proteins. *Progress in chemistry*. 2023; **35**(4): 526-542. ISSN 1005-281X.
7. GUZMÁN, F., et al. Peptides, solid phase synthesis and characterization: Tailor-made methodologies. *Electronic journal of Biotechnology*. 2023; **64**: 27-33. ISSN 0717 3458.
8. STAMENKOVIC, S., et al. Microbial fertilizers: A comprehensive review of current findings and future perspectives *Spanish Journal of Agricultural Research*. 2018; **16**(1): 161-12117. e09R01; ISSN 2171 9292. doi:10.5424
9. PÉREZ, M.C., ORAMAS, J., SOTOLONGO, E.A., MIRANDA, A., ROMÁN Y., & GONZÁLEZ A. Optimización del medio de cultivo y las condiciones de fermentación para la producción de un biofertilizante a base de *Pseudomonas fluorescens*. *Biotecnología Vegetal*. 2019. **19**(2):127-138. ISSN 1609 1841.

10. ALÍ, S., SAMEER, M. & RAFIQUE Z. A review scale up fermentation procedure. *Int. J. S. Res. Sci. Tech.* 2018; **4**(5): 1301-1307. ISSN 2395 602X.
 11. DORAN, P. M. Bioprocess Engineering Principles. 2013. Second edition. Chapter **8.5**. Page 285. Stirrer Power Requirements.
 12. DORAN, P. M. Bioprocess Engineering Principles. 2013. Second edition. Chapter **7.9**. Page 151. Mixing.
 13. MTHETHWA, N., et al. Toward sustainable solid-phase peptide synthesis strategy – *in situ* Fmoc removal, *Green Chemistry Letters and Reviews*. 2024; **17**:1. ISSN 1751-8253
 14. ESPINOZA, L. A. Caracterización de las modificaciones químicas y regiones hidrofílicas en péptidos y proteínas por espectrometría de masas. Tesis doctoral inédita. Dr C. L. J González López. & Dr C. V. Besada Pérez (dir.). Universidad de la Habana, 2023.
 15. Quality attributes of synthetic peptides drug substances <1503>. General chapter. USP-NF. Rockville, MD: United States Pharmacopeia. 2024.
 16. LUNA, O., et al. Deprotection reagents in Fmoc Solid phase peptide synthesis: moving away from piperidine? *Molecules*. 2016; **21**(11):1542. ISSN 1420 3049.
 17. CASTELLANOS ROMÁN, I. Estudio de la reacción de síntesis en fase sólida del péptido CIGB- 300: Universidad Tecnológica de La Habana "José Antonio Echeverría"; 2020.
 18. RAMÍREZ HERNÁNDEZ, D., y col. Influencia del tamaño de partícula y la velocidad de agitación sobre el rendimiento de pectina. *Revista Cubana de Farmacia*. 2016; **50**(1): 98-105. ISSN 0034 7515.
 19. CASTELLANOS ROMÁN, I. & PÉREZ HERNÁNDEZ, E. y col. Incremento de escala productiva en la etapa de Síntesis del proceso de obtención del péptido inmunomodulador CIGB-814 en fase sólida. Rev. CENIC Cienc. Quími. 2023; **54** (publicación continua): 294-301.e-ISSN: 2221-2442.
 20. GUZMÁN, F., et al. The tea-bag protocol for comparison of Fmoc removal reagents in solid-phase peptide synthesis. *Amino Acids* 2020; **52**:1201–5.ISSN 0939 4451.
 21. FERRAZANO, L.C, et al. Sustainability in peptide chemistry: current synthesis and purification technologies and future challenges. *Green Chemistry*. 2022; **1039**(4). 975. ISSN 1463 9262
-

Conflictos de interés

Los autores declaran que no hay conflictos de intereses.

Contribución de los autores

Ever Pérez-Hernández: Diseño de experimentos, experimentación, procesamiento, análisis de resultados y redacción.

Yaima Martorell-Pérez: ejecución de trabajos prácticos a escala de laboratorio.

Lourdes M. Zumalacárregui-de Cárdenas: análisis de resultados y revisión crítica del artículo.

Denia González-León: curación de datos y análisis de resultados.

Miladys Limonta-Fernández: revisión crítica del artículo.