VacciMonitor 2026;35:e023526
www.vaccimonitor.finlay.edu.cu
Artículo Original

Purificación y escalado por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa del CIGB -814, un péptido inmunomodulador de interés farmacéutico

Ever Pérez-Hernández[1*] ORCID: https://orcid.org/0000-0002-4571-5750
Lourdes Zumalacárregui-de Cárdenas[2] ORCID: https://orcid.org/0000-0001-6921-737X
Hilda Elisa Garay-Pérez[1] ORCID: https://orcid.org/0000-0003-3101-255X
Osvaldo Reyes-Acosta[1] ORCID: https://orcid.org/0000-0002-4999-2835
David Diago-Abreu[1] ORCID: https://orcid.org/0000-0002-0519-329X
Tatiana Álvarez-Martín[1] ORCID: https://orcid.org/0009-0000-2728-8567
Silvia Barcelona-Pérez[1] ORCID: https://orcid.org/0009-0005-6525-3687
Miladys Limonta-Fernández[1] ORCID: https://orcid.org/0000-0002-1664-5255

[1] Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, La Habana, Cuba.
[2] Universidad Tecnológica de La Habana José Antonio Echeverría, La Habana, Cuba.

Autor por correspondencia: ever.perez@cigb.edu.cu

El péptido inmunomodulador CIGB-814 constituye el ingrediente farmacéutico activo del producto Jusvinza®. Se diseñó para tratar pacientes con artritis reumatoide, pero su aplicación en pacientes con COVID-19 determinó escalar el proceso de purificación por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa. El objetivo principal de este trabajo fue estandarizar el proceso de purificación a escala de laboratorio del péptido inmunomodulador CIGB-814 para luego realizar su escalado productivo utilizando el criterio de similitud geométrica. Se estudiaron pendientes de 0,33 y 0,5 % acetonitrilo/min en el segmento de elución del gradiente lineal. Con la pendiente de 0,33 % acetonitrilo/min, se obtuvieron valores de pureza superiores al 99,5 %, y un rendimiento del 60 %, que representó 3 veces en comparación con la pendiente de 0,5 % acetonitrilo/min con similares valores de pureza. Con esta nueva condición, se escaló 20,66 veces el proceso de purificación manteniendo los niveles de pureza y recobrado. Finalmente, el procedimiento cromatográfico estandarizado y escalado permitió purificar hasta 1 kg del péptido CIGB-814 al año y satisfacer así la demanda del producto Jusvinza® para el uso clínico y comercial.

Palabras clave: cromatografía líquida en fase reversa; péptido; inmunomodulación.

Introducción

El desarrollo de metodologías de síntesis química de péptidos propició obtener nuevos compuestos con posibilidades de convertirse en agentes terapéuticos o vacunas. Estas moléculas se utilizan en el tratamiento de enfermedades como la diabetes, enfermedades infecciosas y el cáncer.(1) Para la purificación de los péptidos se emplean técnicas cromatográficas como el intercambio iónico, afinidad, exclusión molecular y cromatografía líquida de interacción hidrofílica (HILIC). Sin embargo, sigue siendo la cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) la técnica de elección utilizada, la cual se basa en la interacción hidrofóbica entre las moléculas y la fase estacionaria, siendo la que mejor combina eficiencia, versatilidad, robustez y confiabilidad.(2,3) En ella, se pueden diseñar gradientes isocráticos o lineales, si la molécula a purificar contiene muchos componentes heterogéneos. Sin embargo, es poco probable que se produzca una separación óptima en el modo isocrático de elución. Además, el tiempo del ciclo cromatográfico puede ser bastante largo para la elución de todos los componentes. En tales casos, la elución se logra aplicando un gradiente lineal basado en una mezcla binaria o ternaria de disolventes seleccionados en función de la selectividad hacia los componentes.(4) El desarrollo de un método de gradiente requiere establecer la mejor pendiente, el intervalo de aplicación y la forma. En términos de optimización y operación, son los gradientes lineales los más empleados en esta técnica cromatográfica.(5)

[*] Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, La Habana, Cuba.

En el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) se estableció la metodología de síntesis en fase sólida para péptidos de hasta 50 residuos.[6] Entre estas moléculas, destaca el CIGB-814, un péptido de 27 aminoácidos que constituye el ingrediente farmacéutico activo (IFA) del medicamento Jusvinza®. Este compuesto ha demostrado potente actividad inmunomoduladora, siendo un candidato clave para el tratamiento de enfermedades autoinmunes e inflamatorias. Su uso en el tratamiento de artritis reumatoide (AR),[7,8,9] ha mostrado resultados positivos en la reducción de la inflamación crónica y la regulación de la respuesta inmune mediante la modulación de las células T reguladoras (Tregs).[10]

Además de la aplicación en AR, el CIGB-814 ha demostrado relevancia en la inmunoterapia de enfermedades con un alto componente inflamatorio, como la tormenta de citoquinas observada en pacientes con COVID-19. Durante la pandemia, Jusvinza® se utilizó para tratar la hiperinflamación pulmonar, contribuyendo a la reducción de complicaciones respiratorias graves y mejorando la evolución clínica de los pacientes afectados.[11]

La elevada eficacia del producto Jusvinza® para el tratamiento de pacientes enfermos de AR y COVID-19 incrementó notablemente el uso de este fármaco.[9,11] En las etapas de investigación y desarrollo, se necesitaban cantidades de hasta 50 g de IFA por año para los estudios a nivel de laboratorio. Sin embargo, los resultados positivos que se alcanzaron en los ensayos preclínicos y clínicos, hicieron que se incrementara la demanda hasta 1 kg del IFA por año. La mayor demanda de cantidades del fármaco Jusvinza® impulsó la necesidad de realizar el escalado de la operación de purificación por RP-HPLC partiendo del péptido crudo CIGB-814.

Para el incremento de escala en la cromatografía líquida preparativa se debe tener en cuenta que las condiciones óptimas de separación para la escala industrial se transfieren a partir de una separación desarrollada en una columna a escala de laboratorio.[12] El desarrollo de un método de separación cromatográfica utilizando un gradiente lineal requiere estudiar la pendiente, intervalo de aplicación y forma para obtener valores de resolución que garanticen una mayor separación y purificación de la fracción de interés en el menor tiempo posible.[5] Mant y colaboradores plantean que los procesos de mejoras de purificación de péptidos generalmente se realizan variando la pendiente en el gradiente entre 0,50 y 2,0 % de acetonitrilo (ACN)/min.[13] Por otro lado, Kremser estudió la optimización del proceso de purificación por fase reversa C-18 del péptido Liraglutide utilizando pendientes del gradiente desde 0,50; 1,0 y 2,3 % ACN/min, obteniendo los mejores resultados en cuanto a rendimiento con una pendiente de 0,50 % ACN/min.[3] Pérez realizó un estudio de mejora del gradiente de purificación para un péptido sintético utilizando valores de pendiente igual a 0,33; 0,40 y 0,50 % ACN/min logrando optimizar el proceso e incrementar el recobrado en un 30 % con la de 0,33 % ACN/min.[14]

Durante la síntesis de péptidos se generan impurezas con tiempo de retención similares al péptido de interés, lo que dificulta la purificación cromatográfica. Estas impurezas pueden ser péptidos truncados o alguna modificación en el péptido de interés, incidiendo negativamente en la pureza del material y el recobrado.[14] Para mejorar la resolución en el proceso cromatográfico se modifican las pendientes del gradiente lineal, las concentraciones del modificador orgánico en la fase móvil o se introducen nuevos, ya que estos también juegan un rol importante en la separación y purificación de péptidos.[3,4,6,14]

En este trabajo se establecieron las condiciones de purificación por RP-HPLC del péptido inmunomodulador CIGB-814 a escala de laboratorio. Para incrementar el volumen de producción, se realizó el escalado de la operación siguiendo el principio de similitud geométrica, cumpliendo las premisas de mantener constante la velocidad lineal (cm^3/h), la altura del lecho cromatográfico (mm) y su capacidad de carga (mg péptido crudo/ mL de fase estacionaria); incrementando solo el diámetro de la columna (mm).[12]

Materiales y Métodos

El péptido crudo, obtenido en el laboratorio de síntesis del CIGB y con un 82 % de pureza, se disolvió en una solución de metanol/agua a 10:90 v/v antes de realizar los estudios de separación cromatográfica.[15]

Solventes orgánicos y soluciones

El ácido trifluoroacético (TFA), ACN y metanol (MeOH), con calidad para cromatografía fueron suministrados por Merck KGaA (Darmstadt, Alemania). En la cromatografía de RP-HPLC se utilizaron las soluciones siguientes: solución A, TFA 0,1 % en H_2O; solución B, TFA 0,05 % en ACN y metanol (MeOH)/agua (H_2O) (10:90, v/v).

Columnas y medios cromatográficos

Para realizar el estudio a escala de laboratorio de utilizó una columna C-18 de 250 x 2,2 mm, 12 µm, 300 Aº (Vydac, Grace Davison, IL, EE. UU). En el escalado se utilizó una columna de C18 de 250 x 10,0 mm, 10-15 µm, 300 Aº (Vydac, Grace Davison, IL, EE. UU).

Para el análisis del material purificado se utilizó una columna C-18 de 150 x 4,6 mm, 5 µm, 300 Aº (Vydac, Grace Davison, IL, EE. UU).

Instrumentación y equipamiento

A escala de laboratorio se utilizó un sistema cromatográfico Akta 100 de alta resolución (HPLC) y para adquirir y analizar los cromatogramas, el software Unicornio Versión 5.31 (Amershan Bioscences, Uppsala, Suecia). Para el escalado se empleó un HPLC industrial Novasep modelo HIPERSEP LAB II y el software Ifix para adquirir y analizar los cromatogramas (Novasep, Nancy, Francia). La caracterización analítica del material purificado se realizó en un sistema Shimadzu modelo LC 20 AD, los cromatogramas fueron adquiridos y analizados utilizando el software LabSolutions (Corporación Shimadzu, Kioto, Japón).

Diseño de experimentos y evaluación de los parámetros de operación a escala de laboratorio

Para el diseño del experimento y la evaluación de los parámetros de operación a escala de laboratorio se utilizó el software Statgraphics Centurion XV Versión 15.2.05 (StatPoint Technologies, EUA). Se realizó un diseño de un factor categórico donde se estudió la incidencia de la pendiente del gradiente lineal, con los valores de 0, 50 % ACN/min y 0, 33 % ACN/min en el segmento de elución, sobre el recobrado y la pureza del material obtenido. Todo en un solo bloque de trabajo con un total de 10 corridas experimentales completamente aleatorizados a temperatura ambiente. Se empleó la capacidad de carga de la matriz C18 de 1,6 mg de péptido crudo/mL de matriz según Martorell.[16]

Escalado productivo de la operación de purificación del péptido crudo CIGB-814

El escalado de la operación se realizó siguiendo el principio de similitud geométrica, donde se mantuvo constante el flujo lineal (F_L, cm^3/h), la altura del lecho cromatográfico (h, mm), la capacidad de carga (mg péptido crudo/mL de fase estacionaria) y se incrementó el diámetro de la columna (D, mm), calculando el factor de escala (Fe).[3]

Para ello se utilizaron las ecuaciones (1 – 4), donde A: área transversal, V: volumen y F_V: flujo volumétrico, r: radio y Fe: factor de escala.

$$A = \frac{\pi}{4} \cdot D^2 \quad \text{Ecuación 1}$$

$$V = A \cdot h \quad \text{Ecuación 2}$$

$$F_V = A \cdot F_L \quad \text{Ecuación 3}$$

$$Fe = \frac{r^2\,(columna\,productiva)}{r^2\,(columna\,laboratorio)} \quad \text{Ecuación 4}$$

En la Tabla 1 se presenta el proceso de escalado realizado en la operación de purificación por RP-HPLC del péptido sintético CIGB-814. Para los cálculos correspondientes se emplearon las ecuaciones 1-4.

El Fe alcanzado, según la ecuación 4, es de 20,66.

Tabla 1. Parámetros cromatográficos calculados para el escalado de la etapa purificación por RP-HPLC.

Parámetro	Escala laboratorio	Escalado productivo
Dimensiones	250 x 22 mm diámetro interior	250 x 100 mm diámetro interior
Fase estacionaria	RP-C18, 300 A°, 12 µm	RP-C18, 300 A°,12 µm
Solución A	Agua-TFA 0,1 %	Agua-TFA 0,1 %
Solución B	Acetonitrilo-TFA 0,05 %	Acetonitrilo-TFA 0,05 %
Flujo volumétrico	25,33 mL/min	400 mL/min
Velocidad lineal	305,4 cm/h	305,4 cm/h
Carga aplicada	1,6 mg/mL	1,6 mg/mL

TFA: ácido trifluoroacético. RP-C18: matriz en fase reversa de 18 átomos de carbono.

Resultados y Discusión

Estudio a escala de laboratorio de la purificación del péptido CIGB-814

Sobre la base de informes previos de purificación de péptidos por RP-HPLC),[14] se estudiaron a escala de laboratorio dos pendientes en el segmento de elución del gradiente lineal de purificación 0,33 % ACN/min y 0,50 % ACN/min.

En la Figura 1 se muestra la comparación de los perfiles cromatográficos correspondientes al péptido CIGB-814 purificado con una pendiente en el gradiente lineal igual a 0,50 % ACN/min (Fig. 1A) y 0,33 % ACN/min (Fig. 1B). Para ambos casos, utilizando el software Unicornio, se calculó la resolución en el paso cromatográfico. Se obtuvo que para una pendiente de 0,50 % ACN/min su valor es 0,82, esto representa que no se logró la separación del CIGB-814 de las impurezas de origen peptídico que se generan durante la síntesis, obteniendo un recobrado de solo 20 % en la operación. Sin embargo, para una pendiente de 0,33 % ACN/min se obtuvo un valor de resolución igual a 1,30,

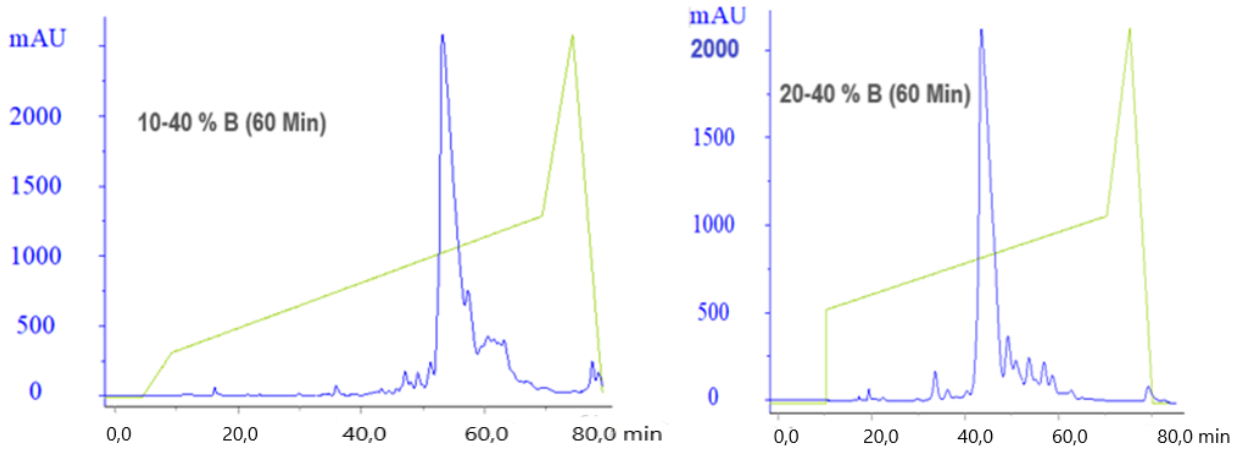


Fig. 1. Perfiles cromatográficos de RP-HPLC (UV λ= 226 nm (azul)) para el péptido purificado del CIGB-814 correspondientes al estudio de mejora de pendiente del gradiente a escala de laboratorio. Condiciones experimentales: columna cromatográfica C-18, Vydac 12 µm, 300 Aº, 250 mm x 22 mm. Fase móvil: solución A TFA 0,1 % en agua y solución B TFA 0,05 % en ACN. Flujo volumétrico 25,33 mL/min. A: gradiente lineal (verde) (10-40 % de B en 60 min) pendiente de elución 0,5 % ACN/min. B: gradiente lineal (verde) (20-40 % de B en 60 min) pendiente de elución 0,33 % ACN/min.

lográndose separar el CIGB-814 de las impurezas de origen peptídico lo que incrementa el recobrado hasta 60 %. La resolución es la medida con que una columna cromatográfica es capaz de separar a dos solutos con tiempos de retención muy semejantes y se reporta que para contar con un paso cromatográfico eficiente, en la práctica, su valor debe ser igual o mayor que 1.[5]

Comparando ambos perfiles cromatográficos, se observó un cambio en la forma al inicio del método en ambas purificaciones. En la Figura 1A el porcentaje de la solución de ACN aumentó de 0 a 10 % en 5 min y luego, en el segmento de elución del péptido, la concentración del ACN en el gradiente lineal ascendió desde 10 % a 40 % en 60 min. En la Figura 1B, el porcentaje de la solución de ACN se incrementó de forma vertical desde 0 % a 20 % y para la elución del péptido se realizó un gradiente lineal ascendente desde 20 % a 40 % de la solución de ACN en 60 min. Este cambio hizo que la pendiente del gradiente lineal disminuyera y que el segmento de elución del péptido iniciara a un porcentaje más alto en la concentración de ACN lo que permite un ahorro del 10 % del disolvente orgánico, en el mismo intervalo de tiempo del ciclo cromatográfico. Tóth y colaboradores[5] describen gradientes de elución multi-isocráticos y con pendientes de gradiente negativo para separaciones de mezclas de péptidos y proteínas, pero esto trae como consecuencia que se alarguen los ciclos cromatográficos. Trabajar a bajos porcentajes de ACN durante el proceso de elución/retención mejoraría la selectividad, pero disminuiría la sensibilidad del método debido al ensanchamiento de la señal de la molécula a purificar.[5]

Dentro de los parámetros más importantes en la cromatografía está la resolución, esta magnitud cromatográfica tiene efecto sobre el recobrado, se puede mejorar variando la pendiente del gradiente de elución y así separar la molécula de interés de las impurezas.[17] Para la separación de péptidos se han utilizado pendientes desde 0,2 hasta 2,3 % ACN/min,[3,5,14] en este trabajo se estudió el efecto de la pendiente solo en los puntos de 0,5 a 0,33% ACN/min y no se trabajó a pendientes menores porque se podría retrasar el tiempo de retención del péptido, desplazándolo hacia el final del gradiente lineal junto a las impurezas de naturaleza hidrofóbica,[5,13] lo que incide de manera negativa en la separación y purificación, así como en la productividad del proceso y sus costos. Por otro lado, se demostró el efecto positivo que tiene la pendiente en el desarrollo de la purificación del péptido sintético CIGB-814, con los valores estudiados para esta variable, se logró mejorar la resolución desde 0,82 con la pendiente de 0,50 % ACN/min hasta 1,30 con la de 0,33 % ACN/min. Se mantuvieron los niveles de pureza del material colectado y se logró incrementar en tres veces el recobrado en la operación. Todo lo anterior se obtuvo en el mismo tiempo del ciclo cromatográfico lo que incide positivamente en la productividad del proceso.

En la Figura 2 se muestran los resultados del diseño de experimento realizado para estudiar el proceso de purificación del péptido sintético CIGB-814. Se puede observar que para los experimentos con pendiente de 0,50 % ACN/min el recobrado es del orden del 20 % del material crudo que se purificó. Sin embargo, para los experimentos donde se empleó la pendiente igual a 0,33 % ACN/min el recobrado es del orden del 60 %, lo que representa un incremento de tres veces en la variable respuesta.

Para la pureza del material colectado en la operación de purificación, al determinar las medias obtenidas en ambas condiciones, se obtuvo que para la pendiente 0,33 % ACN/min el porcentaje medio de pureza es de 99,62± 0,16% y para la pendiente de 0,50 % ACN/min es de 98,87±0,41 %. Al realizar la prueba estadística *t student* para las dos muestras, existen diferencias significativas entre las medias de ambas condiciones de gradiente, debido a que el valor p (0,0057) es menor que los niveles α normalmente elegidos (0,05). Es decir, existe evidencia de diferencia entre las medias de la variable pureza de los gradientes, aunque es destacable que ambos valores superan el 95 % cumpliendo el atributo de calidad establecido para este parámetro.[18]

En la síntesis de péptidos se generan impurezas de origen peptídico que dificultan la purificación de la molécula de interés ya que ambas pueden tener tiempos de retención muy cercanos, pero características hidrofóbicas diferentes en dependencia de la secuencia de aminoácidos.

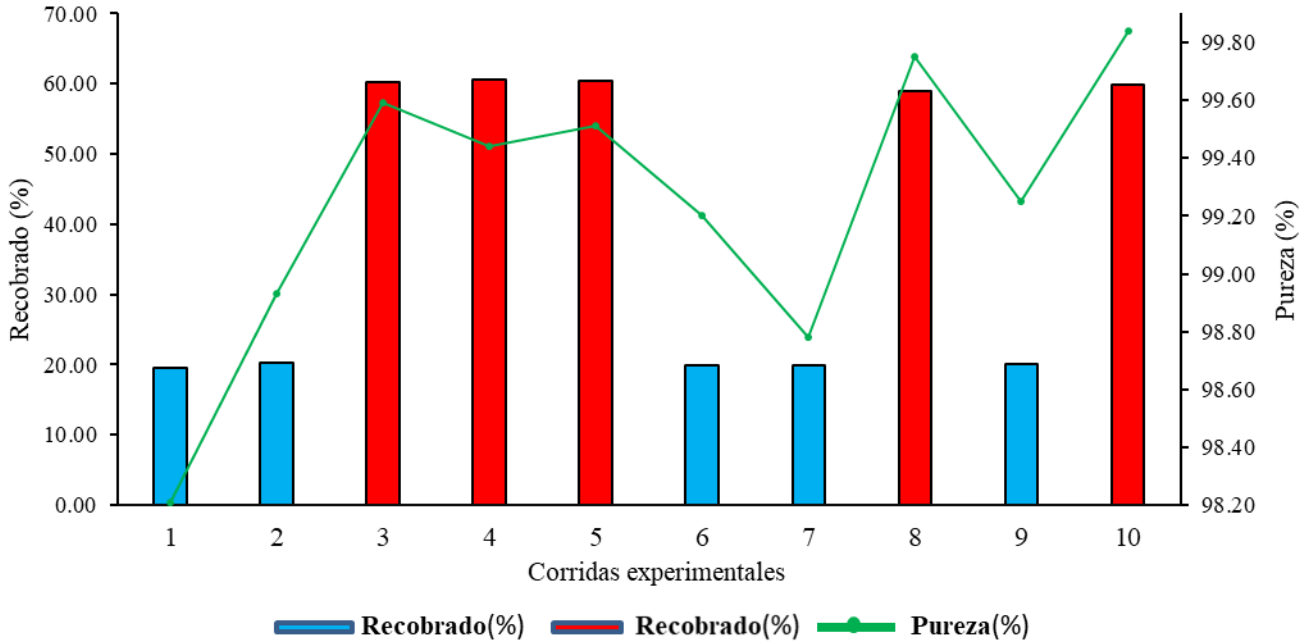


Fig. 2. Evaluación de la incidencia de la pendiente en el segmento de elución del gradiente lineal en la purificación de péptido sintético CIGB-814. Las barras representan el porcentaje de recobrado para cada corrida experimental, diferenciando por color las pendientes de 0,50 % ACN/min (azul) y 0,33 % ACN/min (rojo). La línea verde indica el porcentaje de pureza alcanzado en cada experimento (especificación ≥ 95 %).

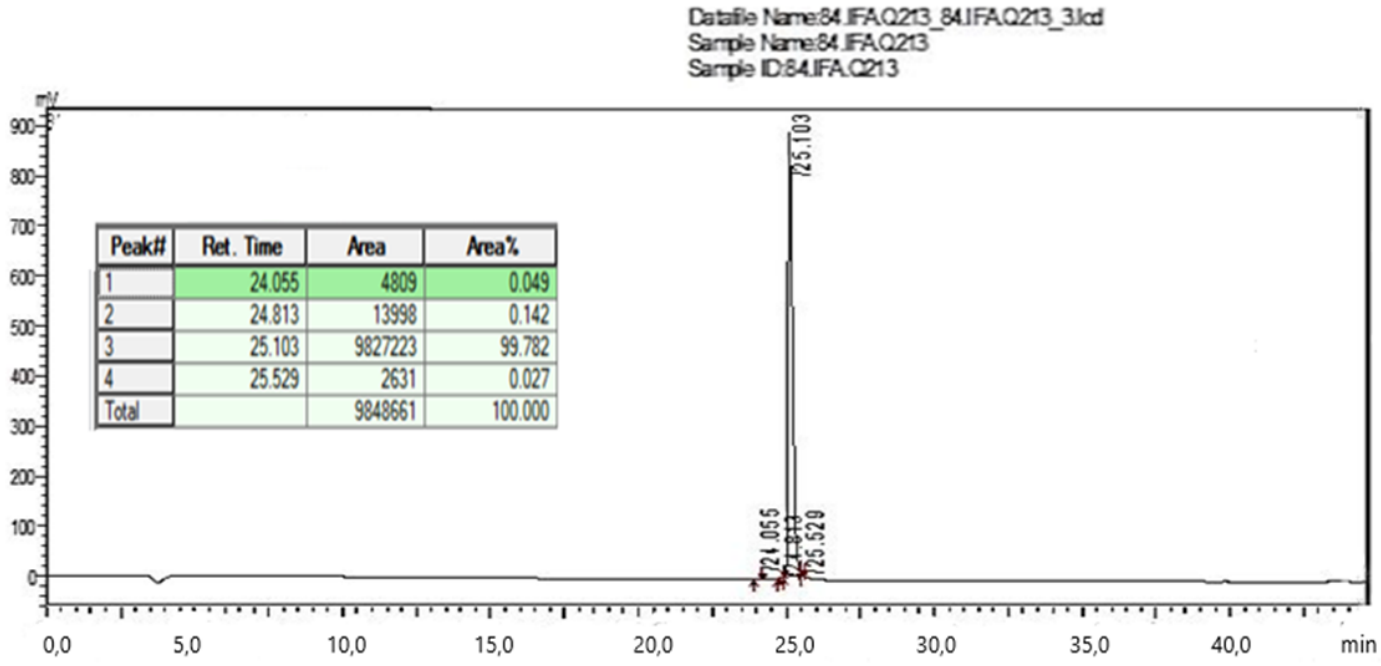
Por esta razón, la principal herramienta para lograr la separación en la cromatografía de RP-HPLC ha sido disminuir las pendientes en el gradiente lineal, lo que representa reducir el porcentaje de ACN/min que es alimentado a la columna cromatográfica e incidir sobre las interacciones entre la matriz cromatográfica y las moléculas a separar.[2,16,17]

En la Figura 3 se muestra el resultado del análisis de pureza obtenido por RP-HPLC para el péptido CIGB-814 purificado empleando el proceso establecido a escala de laboratorio con una pendiente de 0,33 % ACN/min en el gradiente lineal. Se puede observar que el valor de pureza supera el 99 % lo que demuestra la reproducibilidad con los resultados obtenidos en el diseño de experimento realizado que se presentaron en la Figura 2. Este valor de pureza cumple con el atributo de calidad establecido para esta variable.[18]

Escalado productivo de la purificación del péptido sintético CIGB-814

Se ha planteado con anterioridad que las mejores condiciones de separación para la escala industrial se transfieren a partir de una separación desarrollada en una columna a escala de laboratorio. La posterior transferencia de estos resultados a la producción a gran escala es posible con un alto grado de fiabilidad, ya que los parámetros del método cromatográfico no serán modificados.[12]

En la Figura 4 se presenta el perfil cromatográfico obtenido una vez realizado el escalado productivo. Si se compara con el obtenido a escala de laboratorio, presentado en la Figura 1B, se puede observar que los perfiles son muy similares en las dos escalas, en ambos cromatogramas se alcanzó un valor de resolución de 1,30 lo que significa que se logró separar el CIGB-814 de sus impurezas asociadas, demostrando una correcta implementación del proceso a escala productiva. Kamysz y colaboradores plantean que un método correctamente optimizado y mejorado combinará confiabilidad, robustez, eficiencia y poder resolutivo en el escalado.[19] La metodología de purificación desarrollada puede optimizarse en función de las necesidades específicas del proceso. Un enfoque potencial para mejorar la eficiencia en la separación cromatográfica sería la incorporación de un espaciador escindible por reducción durante la síntesis del péptido,



Peak#	Ret. Time	Area	Area%
1	24.055	4809	0.049
2	24.813	13998	0.142
3	25.103	9827223	99.782
4	25.529	2631	0.027
Total		9848661	100.000

Fig. 3. Perfil cromatográfico analítico de RP-HPLC UV (λ=226 nm) obtenido para el péptido CIGB-814 a escala de laboratorio. Condiciones experimentales: Cclumna cromatográfica C-18, Vydac 5 µm, 300 Aº, 150 mm x 4,6 mm. Fase móvil: solución A TFA 0,1 % en agua y solución B TFA 0,05 % en ACN. Gradiente de 5 % - 35 % de solución B en 35 min. Flujo volumétrico 1 mL/min.

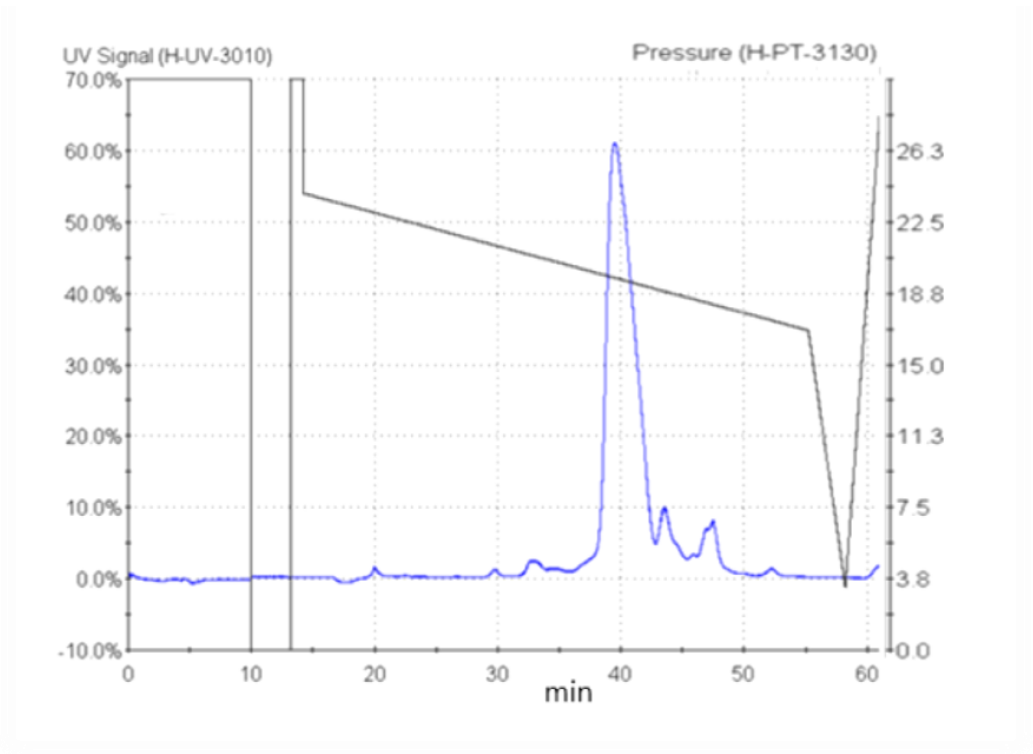


Fig. 4. Perfil cromatográfico de RP-HPLC (UV λ=226 nm) para péptido purificado del CIGB-814, obtenido en el escalado productivo. Condiciones experimentales: columna cromatográfica C-18, Vydac 12 µm, 300 Aº, 250 mm x 100 mm. Fase móvil: solución A TFA 0,1 % en agua y solución B TFA 0,05 % en ACN. Pendiente de elución 0,33 % ACN/min y flujo volumétrico de 400 mL/min.

evitando reacciones secundarias no deseadas y facilitando la purificación. No obstante, sería necesario evaluar el impacto de esta modificación en los costos del escalado productivo, dado que hasta el momento solo ha sido descrita a escala de laboratorio.[20] Si bien la cromatografía de inmunoafinidad ofrece una mayor selectividad, su alto costo la hace poco viable para procesos industriales, restringiendo su uso a aplicaciones analíticas o preparativas a pequeña escala.[21] Alternativamente, Andersson y colaboradores[22] reportaron el uso de cromatografía de intercambio iónico en combinación con RP-HPLC para la purificación de péptidos a gran escala, logrando una pureza superior al 99,5 %. Sin embargo, la combinación de estos métodos conlleva un incremento significativo en los costos productivos en comparación con el procedimiento descrito en este estudio, que permite alcanzar niveles de pureza equivalentes utilizando un solo paso de purificación.

El rol de los aditivos o modificadores orgánicos en la fase móvil para mejorar las separaciones de los péptidos sin necesidad de variar las formas de los gradientes lineales ha sido descrito.[4] Por otro lado, Lin y colaboradores[23] introdujeron nuevos compuestos y mejoraron el proceso de purificación, proceder que puede ser empleado en la cromatografía, pero depende de las características estructurales del péptido en cuestión. En nuestro trabajo no se introdujo aditivo alguno para lograr mejorar la purificación del CIGB-814, se trabajó con el TFA, que es el modificador orgánico de referencia a utilizar en la separación y purificación de péptidos por RP-HPLC.

Al Musaimi y colaboradores[2] describieron varios tipos de cromatografías posibles a utilizar en la separación y purificación de péptidos, la afinidad, exclusión molecular, HILIC y cromatografía de fluido sub/ supercrítico. Sin embargo, deberían analizarse los costos de producción si se introdujeran a escala industrial. En este sentido, la cromatografía RP-HPLC demuestra ser una técnica altamente eficiente en términos de capacidad de separación y viabilidad económica. Los resultados obtenidos en este trabajo proporcionan un marco sólido para maximizar el potencial de esta estrategia y facilitar su aplicación en la purificación de otros péptidos sintéticos, dada la versatilidad y eficiencia del método cromatográfico desarrollado.

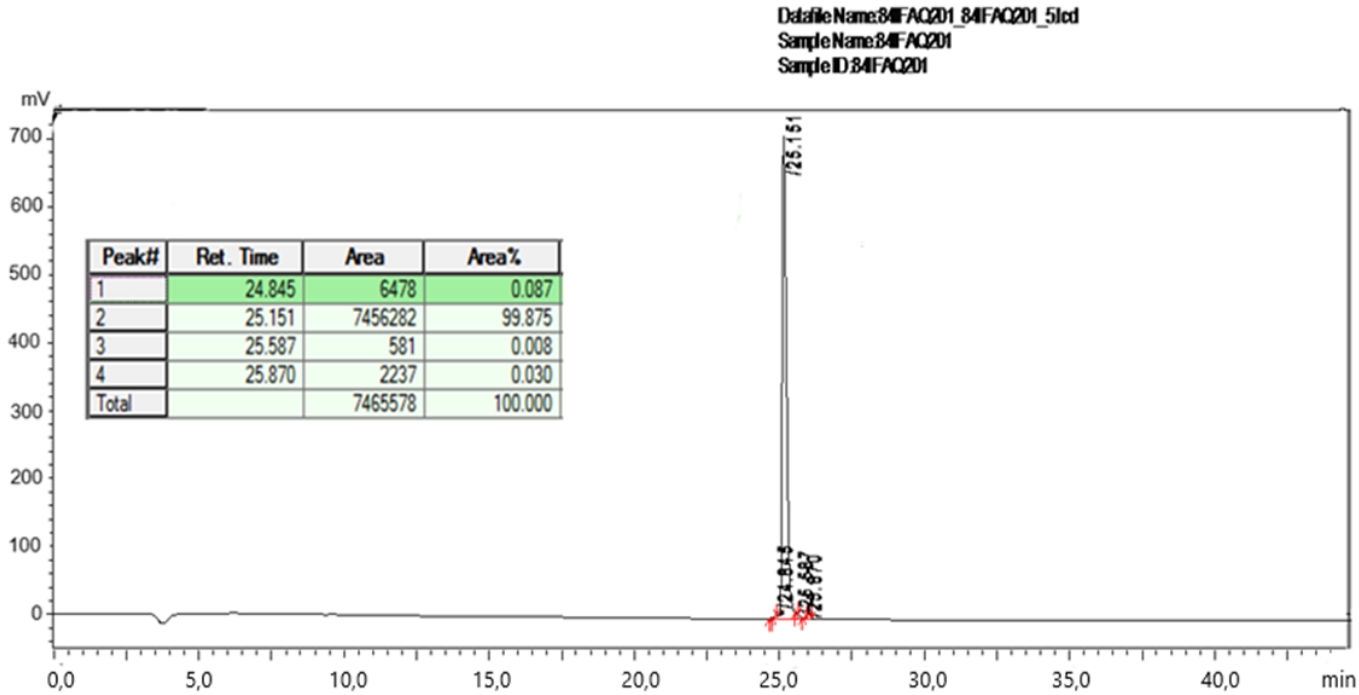
En la Figura 5 se muestra el resultado del análisis de pureza obtenido por RP-HPLC para el péptido CIGB-814 purificado a escala productiva con una pendiente de 0,33 % ACN/min en el gradiente lineal. Se puede observar que el valor de pureza supera el 99 %, lo que demuestra la reproducibilidad con los resultados obtenidos a escala de laboratorio. Este valor de pureza cumple con el atributo de calidad establecido para esta variable.[17]

Evaluación del recobrado del péptido sintético CIGB-814 purificado

Con el proceso de purificación a escala productiva establecido, se realizó una campaña productiva donde se fabricaron 52 lotes del péptido inmunomodulador CIGB-814 como IFA, con una media de 18 g, esto permitió producir las cantidades demandadas. En ellos se obtuvo un recobrado del 60,00 ± 2,88 % y un coeficiente de variación (CV) de 4,88; para la pureza el recobrado fue 99,81 ± 0,01 % y el CV = 0,06, valores similares a los obtenidos a escala de laboratorio.

En este estudio se logró establecer una metodología de purificación del péptido CIGB-814 mediante RP-HPLC, se incrementó en tres veces el recobrado del producto sin comprometer la pureza final. El cambio de pendiente en el segmento de elución del gradiente a 0,33 % ACN/min permitió mejorar la resolución de separación, asegurando una mayor eficiencia del proceso. Además, el escalado productivo de la operación validó la reproducibilidad y robustez de la metodología, alcanzando niveles de pureza superiores al 99 % y garantizó la producción eficiente del péptido a gran escala. Estos resultados evidencian la viabilidad del proceso para su aplicación en la fabricación industrial de péptidos terapéuticos, optimizando recursos y costos sin comprometer la calidad del producto final.

La versatilidad y robustez del método desarrollado abren la posibilidad de extrapolar esta estrategia de purificación a otros péptidos sintéticos o vacunas con aplicaciones terapéuticas, ampliando su potencial impacto en el campo de la biotecnología.



Peak#	Ret. Time	Area	Area%
1	24.845	6478	0.087
2	25.151	7456282	99.875
3	25.587	581	0.008
4	25.870	2237	0.030
Total		7465578	100.000

Fig. 5. Perfil cromatográfico analítico de RP-HPLC UV (λ=226 nm) obtenido para el péptido CIGB-814 a escala productiva. Condiciones experimentales: columna cromatográfica C-18, Vydac 5 µm, 300 Aº, 150 mm x 4,6 mm. Fase móvil: solución A TFA 0,1 % en agua y solución B TFA 0,05 % en ACN. Gradiente de 5 % - 35 % de solución B en 35 min. Flujo volumétrico 1 mL/min.

Conclusiones

La RP-HPLC es un método robusto, reproducible y eficiente para la purificación del péptido sintético CIGB-814. Con su estandarización a escala de laboratorio, especialmente con una pendiente de 0,33 % ACN/min en el gradiente lineal de elución, se incrementó significativamente el recobrado del péptido, alcanzando valores cercanos al 60 % en comparación con el 20 % obtenido con pendientes más pronunciadas. No se comprometió la pureza del producto, se mantuvo consistentemente por encima del 99,5 %, cumpliendo los estándares requeridos para su uso preclínico y clínico. El escalado exitoso de la purificación del péptido CIGB-814 permitió satisfacer la creciente demanda clínica del medicamento Jusvinza®, utilizado en el tratamiento de la AR y como modulador de la hiperinflamación en pacientes con COVID-19.

Conflicto de intereses

Los autores no declaran conflictos de intereses.

Roles de autoría

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

Lourdes Zumalacárregui-de Cárdenas: curación de datos, análisis de resultados y revisión.

Hilda Elisa Garay-Pérez: análisis formal y revisión del artículo.

Osvaldo Reyes-Acosta: supervisor de los experimentos diseñados y revisión del artículo.

David Diago-Abreu: ejecución de trabajos prácticos a escala de laboratorio.

Tatiana Álvarez-Martín: ejecución de trabajos prácticos a escala productiva.

Silvia Barcelona-Pérez: diseño de experimentos.

Miladys Limonta-Fernández: revisión crítica del artículo.

Todos los autores revisaron y aprobaron la versión final de este manuscrito.

Referencias

1. Rossino G, Marchese E, Galli G, Verde F, Finizio M, Serra M, et al. Peptides as therapeutic agents: Challenges and opportunities in the Green Transition Era. Molecules. 2023; 28(20): 7165. doi: https://10.3390/molecules28207165.

2. Al Musaimi O, Jaradat DMM. Advances in Therapeutic Peptides Separation and Purification. Separations. 2024; 11 (8):233. doi: https://10.3390/separations11080233.

3. Kremser A, White C. Development of an efficient purification method for a peptide pharmaceutical. Oligonucleotides & Peptides. 2019; 37(2): 12-6. Disponible en: https://www.teknoscienze.com/tks_article/development-of-an-efficient-purification-method-for-a-peptide-pharmaceutical-optimisation-of-hplc-separation-and-considerations-for-scaling-up-to-production-scale-in-case-of-the-glp-1-receptor-agoni/. (Consultado en línea: 6 mayo 2025).

4. Joshi VS, Kumar V, Rathore AS. Role of organic modifier and gradient shape in RP-HPLC separation: analysis of GCSF variants. J Chromatogr Sci. 2015;53(3):417-23. doi: https://10.1093/chromsci/bmu222.

5. Tóth G, Sugár S, Balbisi M, Molnár BA, Bugyi F, Fügedi KD, et al. Optimized Sample Preparation and Microscale Separation Methods for High-Sensitivity Analysis of Hydrophilic Peptides. Molecules. 2022;27(19):6645. doi: https://10.3390/molecules27196645.

6. Perea SE, 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(3): 1110. Disponible en: https://doaj.org/article/92bb406648bb4753a62f660356a63b04. (Consultado en línea: 6 mayo 2025).

7. Del Carmen Domínguez M, Cabrales A, Lorenzo N, Padrón G, Gonzalez LJ. Biodistribution and pharmacokinetic profiles of an altered peptide ligand derived from heat-shock proteins 60 in Lewis rats. Cell Stress Chaperones. 2020;25(1):133-40. doi: https://10.1007/s12192-019-01054-3.

8. Crizol-Deza DA, Zurita-Borja JL, Crisol-Deza YG. Desarrollo de artritis reumatoide refractaria al tratamiento convencional. Revista Cubana de Reumatología. 2021; 23 (1):e194. Disponible en: https://dialnet.unirioja.es/ejemplar/589208. (Consultado en línea: 6 mayo 2025).

9. Domínguez-Horta MDC, Serrano-Díaz A, Hernández-Cedeño M, Martínez-Donato G, Guillén-Nieto G. A peptide derived from HSP60 reduces proinflammatory cytokines and soluble mediators: a therapeutic approach to inflammation. Front Immunol. 2023;14:1162739. doi: https://10.3389/fimmu.2023.1162739.

10. Guibert Toledano ZM, Bermúdez-Marrero WM, Hernández-Martínez AA, Morasen Cuevas R, Reyes-Llerena GA, Hernández M . Primer consenso cubano sobre el uso de terapia convencional y biológica en pacientes con artritis reumatoide. Revista Cubana de Reumatología. 2020; 23 (3):230. Disponible en: https://www.medigraphic.com/pdfs/revcubreu/cre-2021/cre213a.pdf. (Consultado en línea: 6 mayo 2025).

11. Hernandez-Cedeño M, Venegas-Rodriguez R, Peña-Ruiz R, Bequet-Romero M, Santana-Sanchez R, Penton-Arias E, et al. CIGB-258, a peptide derived from human heat-shock protein 60, decreases hyperinflammation in COVID-19 patients. Cell Stress Chaperones. 2021;26(3):515-25. doi: https://10.1007/s12192-021-01197-2.

12. Poole CF. The Essence of Chromatography. Amsterdam: ELSEVIER; 2003.

13. Mant C, Chen Y, Yan Z, Popa T, Kovacs J, Mills J, et al. HPLC Analysis and Purification of Peptides. En: Fields GB (eds) Peptide Characterization and Application Protocols. Methods in Molecular Biology™. New Jersey: Humana Press; 2007. p. 3-55. doi: https://10.1007/978-1-59745-430-8_1.

14. Pérez E. Introducción de mejoras a los procesos de purificación por RP-HPLC e intercambio iónico del péptido sintético CIGB 300. [Tesis de Maestría]. La Habana: ISPJAE; 2012.

15. Castellanos I, Pérez E, González D, Martorell Y, Pico L, Antequera A. Incremento de escala productiva en la etapa de síntesis del proceso de obtención del péptido inmunomodulador CIGB-814 en fase sólida. Rev CENIC Cien Quim. 2023; 54: 294-301. Disponible en: https://revista.cnic.edu.cu/index.php/RevQuim/article/view/4107. (Consultado en línea: 6 mayo 2025).

16. Martorell Y. Nuevo proceso de purificación del Péptido Inmunomodulador 814. [Tesis de Maestría]. La Habana: ISPJAE; 2024.

17. Kromidas S, editor. Gradient HPLC for Practitioners. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA; 2019.

18. United States Pharmacopeia (USP). General Chapter 1503 Quality Attributes of Synthetic Peptide Drug Substances. MD: USP; 2021.

19. Kamysz W, Okrój M, Lempicka E, Ossowski T, Lukasiak J. Fast and efficient purification of synthetic peptides by solid phase extraction. Acta Chromatogr. 2004; 14: 180-6. Disponible en: https://yadda.icm.edu.pl/baztech/element/bwmeta1.element.baztech-article-BAT3-0028-0062. (Consultado en línea: 6 mayo 2025).

20. Zitterbart R, Berger N, Reiman O, Noble G, Lüdtke S, Sarma D, et al. Traceless parallel peptide purification by a first-inclass reductively cleavable linker system featuring a

safety-release. Chem Sci. 2021; 12(7): 2389-96. doi: https://10.1039/d0sc06285e.

21. Gurevich Messina JM, Giudicessi SL, Martínez Ceron MC, Urtasun N, Forno G, Mauro L, et al. Recombinant human follicle stimulating hormone purification by a short peptide affinity chromatography. J Pept Sci. 2018;24 (11):e3128. doi: https://10.1002/psc.3128.

22. Andersson L, Persson J. Aspects of industrial purification of peptides using large-scale chromatography. Limhamn: PolyPeptide Group; 2004.

23. Lin CW, Haeuptle MA, Aebi M. Supercharging Reagent for Enhanced Liquid Chromatographic Separation and Charging of Sialylated and High-Molecular-Weight Glycopeptides for NanoHPLC-ESI-MS/MS Analysis. Anal Chem. 2016;88(17):8484-94. doi: https://10.1021/ acs.analchem.6b0093.

Purification and scale-up by reversed-phase high performance liquid chromatography of CIGB-814, an immunomodulatory peptide of pharmaceutical interest

Abstract

The immunomodulatory peptide CIGB-814, the active pharmaceutical ingredient of Jusvinza® was developed for the treatment of rheumatoid arthritis, but its application in COVID-19 patients required scaling up the RP-HPLC chromatographic purification process. The main objective of this work was to standardize the immunomodulatory peptide CIGB-814 in a lab scale purification process to perform scale-up production using the geometric similarity criterion. Slopes of 0.33 and 0.5 % acetonitrile/min were studied in the elution segment of the linear gradient. As a result, with a slope at 0.33% acetonitrile/min, purity values were greater than 99.5 % and a yield was obtained at 60 %, which represented three times more compared with the obtained using acetonitrile/min at 0.5 % with similar purity values. This new condition enhanced the purification process scaled up 20.66 times while maintaining the levels of purity and recovery. Finally, the standardized and scaled chromatographic procedure allowed the purification up to 1 kg of the CIGB-814 peptide per year, thus satisfying the demand of Jusvinza® for clinical and commercial usage.

Keywords: reversed-phase liquid chromatography; peptide; immunomodulation.

Recibido: 25 de junio de 2025 *Aceptado: 12 de enero de 2026.*