



Universidad de Concepción

Dirección de Postgrado



Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química

Doctorado en Ciencias de la Ingeniería con mención en Ingeniería Química

Desarrollo y producción recombinante de un péptido bloqueador de TNF para el tratamiento de trastornos autoinmunes inflamatorios

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias de la Ingeniería con mención en Ingeniería Química

Pedro Pablo Aguilar Domínguez

Concepción, Chile 2023

Profesores patrocinantes:

Dr. Oliberto Sánchez Ramos

Dr. Claudio Alfredo Zaror Zaror

Resumen

El Factor de Necrosis Tumoral (*TNF*; de sus siglas en inglés, *tumor necrosis factor*), se ha transformado en una importante diana terapéutica para el tratamiento de trastornos autoinmunes inflamatorios. A la fecha, existen 5 biofármacos bloqueadores de TNF aprobados por la FDA que corresponden a proteínas de fusión y anticuerpos monoclonales. A pesar de los resultados terapéuticos informados, estos biofármacos poseen desventajas que limitan su uso, entre ellas: (i) deben ser producidos en cultivos de células de mamíferos, a un elevado costo de producción, (ii) son moléculas considerablemente grandes (~150 kDa), lo que limita la penetración de tejidos y condiciona el uso de altas dosis, (iii) tienen altos precios de mercado (~100 000 dólares/año, para una terapia individual), lo que implica que menos del 10% de los pacientes tenga acceso a este tipo de terapia. Para solucionar estas limitaciones, el Laboratorio de Biofármacos Recombinantes (LBR), de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción, empleando la tecnología de *Phage Display*, ha desarrollado un péptido de unión a TNF (CBB288) con capacidad bloqueadora. Los péptidos, como potenciales bioactivos, suelen ser selectivos, poco tóxicos, y con un tamaño molecular (≤ 5 kDa) que permite el uso a bajas dosis respecto a los anticuerpos monoclonales.

Como limitante, es conocido que existe una escasa optimización de operaciones a escala industrial para sintetizar péptidos, resultando la síntesis química de péptidos en un proceso caro y poco sustentable que genera un exceso de residuos tóxicos. En este marco, el avance de la biotecnología ofrece variantes con buena combinación de costo-sustentabilidad, donde sobresale la expresión de proteínas en *Escherichia coli*. En este trabajo, tres etapas fundamentales fueron establecidas para producir el r-CBB288, en una primera etapa de fermentación se expresaron copias repetidas del CBB288 en forma de tándem, luego, para obtener el péptido recombinante se realizó una proteólisis asistida con hidroxilamina (HX) y posteriormente para purificar el péptido se utilizó una cromatografía de exclusión molecular (CEM). Las tres operaciones se evaluaron mediante diseño experimental para analizar la influencia de los principales parámetros operacionales sobre las variables respuestas más importantes. En el caso de la CEM, resulta válido aclarar que las operaciones de purificación en los procesos biotecnológicos constituyen alrededor del 70% del costo total de producción, motivo por el cual estas operaciones deben ser optimizadas con rigor, para evitar afectaciones en la factibilidad del proceso. En este sentido, para la CEM se desarrolló un modelo fenomenológico que permite describir la operación e inferir el comportamiento a dimensiones requeridas. Para demostrar que el r-CBB288 conserva la capacidad unirse al TNF, ensayos de Termoforesis en Microescala (TMS) determinaron las constantes de disociación (Kd) respecto a la diana molecular. Además, ensayos MTT se llevaron a cabo para demostrar el bloqueo de la actividad citotóxica del TNF. Por otra parte, se demostró que la alternativa del péptido sintético no presenta diferencias respecto a su homólogo recombinante en cuanto a afinidad, para esto se realizó un estudio de simulación *in silico* desarrollado

mediante dinámica molecular. Finalmente, un análisis técnico-económico del proceso se ejecutó mediante la herramienta de simulación computacional SuperPro Designer.

Los resultados obtenidos sugieren que el péptido diseñado previamente CBB288 puede ser obtenido a partir de un proceso recombinante y utilizado en futuros estudios biomédicos relacionados con las patologías de inflamación crónicas.

Abstract

Tumor Necrosis Factor has become an important therapeutic target for the treatment of inflammatory autoimmune disorders. To date, there are five FDA-approved TNF-blocking biopharmaceuticals that correspond to fusion proteins and monoclonal antibodies. Despite the reported therapeutic results, these biopharmaceuticals have drawbacks that limit their use and a high production cost in mammalian cells. In this study, we designed a recombinant TNF blocking peptide (CBB288). Our approach consisted in a recombinant tandem protein containing 15 copies of the peptide was obtained in *E. coli*. The tandem protein expression was induced using IPTG. The hydrolysis of the tandem protein to obtain monomeric units of the CBB288 peptide was performed using the hydroxylamine method. Recombinant peptide (r-CBB288) exhibited a high binding affinity to TNF with $K_D=2,39 \times 10^{-5} \pm 0,15 \text{ mol.L}^{-1}$, similarly to synthetic homologue peptide (syn-CBB288); $K_D=1,03 \times 10^{-5} \pm 0,05 \text{ mol.L}^{-1}$. The TNF-neutralizing activity of r-CBB288 was assessed in L929 cells. r-CBB288 was able to inhibit TNF induced cytotoxicity in a dose-response manner, resulting in a maximum viability recovery of 79%. According to an *in silico* simulation study, it was demonstrated that the differences between the synthetic and recombinant peptides do not modify the predicted binding affinity for the target protein. The results obtained suggest that CBB288 could be obtained by a recombinant process and used for future biomedical studies related to chronic inflammation pathologies.

Índice general

<i>Introducción</i>	1
<i>Hipótesis</i>	5
<i>Objetivo general</i>	5
<i>Objetivos específicos</i>	5
1. Antecedentes generales	6
1.1 Péptidos como biofármacos.....	6
1.2 Péptidos bloqueadores de TNF.....	7
1.2.1 Identificación de péptidos por PD.....	11
1.3 Producción de péptidos recombinantes	13
1.4 Fermentación microbiana en <i>Escherichia coli</i> (etapa 1)	16
1.4.1 Cultivos de alta densidad celular.....	17
1.4.2 Proceso fermentativo.....	18
1.5 Liberación del r-CBB288 (etapa 2)	21
1.5.1 Aislamiento	22
1.5.2 Solubilización-recuperación	22
1.5.3 Proteólisis	23
1.6 Purificación de péptidos recombinantes (etapa 3).....	25
1.6.1 Cromatografía de exclusión molecular.....	26
1.6.2 Eficiencia de la operación cromatográfica	29
1.6.3 Principios de transferencia de masa en operaciones cromatográficas	32
1.6.4 Modelos fenomenológicos de transporte en cromatografía	34
1.7 Simulación técnica-económica del proceso	39
2. Materiales y métodos	41
2.1 Diseño y síntesis del prototipo syn-CBB288	42
2.1.1 Evaluación de la actividad bloqueadora de TNF mediante ensayo de MTT.....	42
2.1.2 Determinación de la K_D mediante Termoforesis en Microescala (TMS)	42
2.1.3 Optimización de péptidos CBB288 <i>in-silico</i>	43

2.2 Metodología experimental para el proceso recombinante del CBB288.....	44
2.2.1 Proceso fermentativo con <i>Escherichia coli</i>	44
2.2.2 Aislamiento-Solubilización-Recuperación de los cuerpos de inclusión	46
2.2.3 Proteólisis del tándem multimérico	46
2.2.4 Purificación del péptido objetivo r-CBB288.....	48
2.2.5 Modelación GRM para CEM	51
2.2.6 Simulación en SuperPro Designer.....	53
3. Resultados y discusión.....	55
3.1 Caracterización mediante TMS de la afinidad de syn-CBB288 respecto al TNF.....	55
3.2 Efecto neutralizante de syn-CBB288 sobre la actividad citotóxica inducida por el TNF.....	55
3.3 Desarrollo de un modelo <i>in-silico</i> para predecir la afinidad de syn-CBB288 y r-CBB288 hacia el TNF	56
3.4 Proceso recombinante para producir péptido r-CBB288	57
3.4.1 Desarrollo y optimización de la operación de fermentación.....	57
3.4.2 Desarrollo y optimización de la operación de proteólisis con hidroxilamina	63
3.4.3 Desarrollo y optimización de la operación cromatográfica para la purificación del r-CBB288.....	68
3.4.4 Caracterización del producto r-CBB288 mediante TMS y MTT	82
3.5 Factibilidad técnico-económica del proceso recombinante.....	85
3.5.1 Simulación general del proceso recombinante.....	85
3.5.2 Análisis de factibilidad para el proceso recombinante	87
4. Conclusiones.....	91
5. Nomenclatura.....	92
6. Referencias bibliográficas.....	94

Introducción

El TNF es una proteína que cumple funciones fisiológicas relacionadas a la respuesta inmune e inflamación, las cuales son importantes para la defensa del organismo, pero existen condiciones patológicas relacionadas con altos niveles de TNF que han sido asociados a varias enfermedades humanas que incluyen la artritis reumatoide [1] psoriasis [2], espondilitis anquilosante, artritis psoriásica, artritis idiopática juvenil, enfermedad inflamatoria intestinal como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa, cáncer [3, 4] y hace algunos años se han sumado patologías como la enfermedad de Alzheimer y enfermedades cardiovasculares, entre otras [5]. Para el tratamiento de estas patologías de trastornos autoinmunes inflamatorios, la FDA tiene aprobado un grupo de 5 fármacos que corresponden a anticuerpos monoclonales y proteínas de fusión (Infliximab, Adalimumab, Etanercept, Golimumab, y Certolizumab pegol), estos fármacos son conocidos como agentes bloqueadores de TNF y tienen la función terapéutica de interactuar con esta proteína e impedir la unión con sus receptores para evitar acciones negativas en el organismo [6, 7]. Durante su rol, estas biomoléculas actúan como potentes inmunosupresores, trayendo consigo efectos adversos, tal como, la reactivación de la tuberculosis y la infección viral por hepatitis B y C [7]. Otra desventaja de estos medicamentos es la elevada talla molecular (150 kDa aproximadamente), característica típica de los anticuerpos monoclonales, que genera dificultades durante la penetración hacia tejidos diana, requiriendo la aplicación de altas dosis [8-10]. La aplicación de altas dosis en un tratamiento con anticuerpos monoclonales, así como, los elevados costos asociados a los procesos de obtención de estas biomoléculas generan una problemática sin precedentes respecto a la accesibilidad de los pacientes que requieren este tipo de tratamiento. El valor anual de una terapia individual puede alcanzar los 100 000 dólares, se estima que solamente un 10% de los afectados por estas inmuno-patologías tienen acceso a los tratamientos existentes [8, 10, 11].

Bajo este contexto surge la necesidad de investigar sobre tratamientos alternativos que involucren otras biomoléculas bloqueadoras de TNF, capaces de influir en las patologías asociadas a la inflamación crónica y que, a la vez, puedan ser obtenidas mediante procesos productivos de un costo menor con relación a los anticuerpos monoclonales.

Dentro de los grupos de biomoléculas bioactivas con potenciales aplicaciones en la industria biomédica, destacan los péptidos. Las biomoléculas peptídicas presentan características que las hacen adecuadas para el uso terapéutico, dentro de estas características sobresale, la elevada especificidad para dianas moleculares, así como, la baja toxicidad y acumulación en tejidos corporales en comparación con otras biomoléculas, tales como, los anticuerpos monoclonales [12, 13]. La flexibilidad que presentan los péptidos ante las diversas formas de entregas también hace conveniente su selección sobre los anticuerpos monoclonales, los cuales, históricamente han sido administrados por vía intravenosa. En caso de utilizar péptidos para el tratamiento de afecciones crónicas o subcrónicas, otras estrategias de administración

podrían ser viables, por ejemplo, formulaciones de liberación controlada inyectables y no inyectables que permitirían explotar rutas de administración menos invasivas, con una dosificación relativamente menor [6, 14].

En este punto, resulta válido destacar no solo las potencialidades de los péptidos como biomoléculas bioespecíficas de poca toxicidad, sino también, la importancia que implica administrar dosis pequeñas al organismo. En este caso, una formulación peptídica capaz de cumplir funciones relacionadas al bloqueo de TNF, podría satisfacer con más facilidad la demanda existente de agentes bloqueadores de TNF incluso a precios más bajos que los fármacos convencionales.

Algunos productos terapéuticos basados en péptidos han sido utilizados como agentes antitrombosis, antihipertensión, antimicrobial, anticancerígenos y antidiabético. Otros péptidos, por ejemplo, pueden ser capaces de influir en actividades fisiológicas e intervenir en mecanismos de inflamación celular y tisular, con baja probabilidad de desencadenar efectos adversos [12, 15]. No obstante, en la actualidad no existe ningún agente terapéutico bloqueador de TNF basado en péptidos en el mercado, aunque, si se han realizado estudios relacionados al tema [16-18]. Al respecto, se puede plantear que una de las grandes problemáticas que tributan a la no existencia de productos comercializables basados en péptidos son las limitaciones asociadas a elevados costos de operación durante la síntesis química de péptidos [12, 19-21].

Por lo tanto, en este trabajo, se plantea que la obtención de un péptido de unión a TNF (identificados en PD [22]) puede generar una nueva biomolécula peptídica capaz de unirse y bloquear al TNF. Para evaluar la afinidad con la cual el péptido formado interacciona con el blanco molecular, ensayos de medición de la constante de disociación (K_D) se realizarán empleando un equipo de TMS [23]. El nuevo péptido se evaluará *in vitro* mediante un ensayo de MTT para demostrar capacidad de bloqueo durante la actividad citotóxica del TNF en una línea celular sensible [24-26]. Como prueba de concepto inicial, se sintetizará por vía química un prototipo (syn-CBB288), al cual se le realizarán los ensayos anteriormente mencionados.

La problemática de carácter tecnológico, es originada principalmente debido a la carente investigación básica sobre la optimización de las operaciones de purificación diseñadas específicamente para producir péptidos bioactivos a escala industrial [12]. La mayoría de los péptidos farmacéuticos fabricados a gran escala se producen por vía química, para la cual, extensos tiempos de desarrollo son requeridos, además la síntesis química involucra el consumo de grandes cantidades de disolventes generando un exceso de residuos tóxicos, siendo a priori un proceso poco factible desde el punto de vista ecológico y técnico-económico [27, 28]. En este sentido, el desarrollo de la biotecnología recombinante ofrece una alternativa para la producción de péptidos con buena combinación de costo-efectividad, escalabilidad y sustentabilidad [29, 30]. Cabe destacar, que de las modalidades utilizadas en la tecnología recombinante, la producción de péptidos mediante fermentación microbiana en *Escherichia coli* es la más rápida, manejable y económica

[29, 31]. Sin embargo, en esta primera etapa, si los péptidos son expresados directamente pueden resultar tóxicos para la bacteria hospedera, por eso deben ser expresados fusionados a determinadas proteínas, o bien, en serie o forma de tándem multimérico uniendo varias copias del péptido de interés (unidad monomérica), siendo esta última modalidad la de mejores resultados en cuanto a rendimientos, los cuales podrían mejorar considerablemente si el tándem multimérico se expresa como cuerpo de inclusión [29, 32-36].

Para ambas modalidades, se requerirá de una segunda etapa de proteólisis que busca liberar el péptido de interés, para esto se utilizan agentes de corte que son específicos para escindir determinados sitios aminoacídicos de proteínas y péptidos. Los agentes de corte pueden ser compuestos químicos o enzimáticos, aunque existe preferencia por la vía química debido al elevado costo de las enzimas utilizadas para este fin. La selección de un agente de corte es relativa a la secuencia de la proteína o tándem, por ejemplo, el bromuro de cianógeno realiza corte específico en los residuos de Met (metionina), el ácido fórmico lo hace en sitios de Asp-Pro (aspartato-prolina) y la hidroxilamina (HX) escinde en Asn-Gly (asparangina-glicina) [29, 33, 37].

Por lo anteriormente mencionado, parte de la investigación estará centrada en establecer una etapa primaria basada en una fermentación microbiana usando *Escherichia coli* como hospedero, donde se requiere expresar un tándem que contiene 15 copias del péptido de interés, se estudiarán las condiciones necesarias para fomentar la formación de cuerpos de inclusión. Luego de aislar y solubilizar los cuerpos de inclusión, una segunda etapa de proteólisis se llevará a cabo para separar la unidad peptídica requerida, las copias del tándem multimérico serán idénticas y cada una presentará residuos de Asp y Gly en los extremos para garantizar la escisión mediada por HX. Ambas operaciones (fermentación y proteólisis), serán evaluadas de manera independiente mediante herramientas de diseño experimental, los factores operacionales de entrada y la influencia de estos sobre las variables respuestas más importantes serán estudiadas y analizadas durante la investigación.

Una tercera y última etapa para la obtención de péptidos recombinantes, se centra en la obligatoria purificación del CBB288 una vez concluida la operación de proteólisis [38, 39] [45], [46]. La purificación de péptidos mayormente se realiza mediante técnicas de “*downstream*” basadas en operaciones cromatográficas [12, 39-41]. Las operaciones cromatográficas más utilizadas en las etapas de purificación son, la cromatografía de intercambio iónico, la cromatografía de interacciones hidrofóbicas y la cromatografía de exclusión molecular (CEM) [42]. La implementación de estas operaciones es realizada muchas veces a partir de ensayo y error o análisis puramente empírico que no describe el comportamiento dinámico del sistema, generando así, demoras sustanciales en el desarrollo de péptidos con actividad biológica definida y niveles de pureza requeridos ($\leq 95\%$), todo esto, a expensas de un elevado costo operacional. De hecho, se ha estimado que alrededor del 70% de los costos de producción en los procesos

recombinantes están asociados a etapas de purificación [43-45], motivo por el cual estas operaciones deben ser cuidadosamente estudiadas para no incurrir en diseños que afecten la factibilidad del proceso. La problemática se agudiza, cuando se busca establecer operaciones de purificación para péptidos novedosos, sin conocer al menos información básica sobre la talla molecular, punto isoeléctrico y coeficiente de extinción [12, 44].

Para la tercera etapa, una operación de CEM será la encargada de purificar el r-CBB288, la selección de esta cromatografía descansa sobre las características del material intermedio proveniente de la proteólisis, pues a la salida de la reacción de proteólisis se deberá discriminar entre el tamaño molecular del CBB288 como una unidad monomérica de 1,3 kDa y de los fragmentos peptídicos productos de una proteólisis incompleta [33, 46]. Para el diseño y establecimiento de la CEM, una previa caracterización de la eficiencia cromatográfica (N) y su relación con la velocidad de operación (v) se estudiará a través de la teoría de *Van Deemter* [45, 47]. Luego, mediante herramientas de diseño experimental, será investigada la influencia de los principales factores operacionales sobre las variables respuestas de mayor relevancia. Además, debido a la necesidad de describir con rigor el comportamiento dinámico de la CEM, un modelo fenomenológico de transporte GRM (del inglés, *General Rate Model*) [47-49] será desarrollado teniendo en cuenta los mejores resultados del diseño experimental previo. Las predicciones del modelo permitirán describir el fenómeno de transferencia de masa e inferir el comportamiento de la operación a escalas comerciales [47, 50].

En este punto del trabajo, las tres etapas para la obtención del péptido candidato CBB288 estarían definidas a escala de laboratorio, no obstante, los resultados experimentales recopilados en esta instancia serían insuficientes para determinar si las interacciones de las etapas a escalas superiores resultarían factibles desde un punto de vista técnico-económico. Es en este contexto, donde los programas computacionales como el *SuperPro Designer* han sido usados para simular procesos a escalas productivas y analizar la factibilidad a partir de indicadores económicos, todo esto, teniendo solamente como plantilla inicial datos experimentales [44, 51].

En resumen, este trabajo tiene como objetivo principal caracterizar un péptido bloqueador de TNF como alternativa para el tratamiento de trastornos autoinmunes inflamatorios, la actividad biológica del péptido r-CBB288 será comprobada mediante ensayos *in vitro*. También, un proceso recombinante para producir la biomolécula de interés será implementado, mediante la aplicación de diseño experimental, modelación matemática y simulación de procesos, se espera definir un proceso tecno-económicamente factible para la producción de un novedoso péptido bloqueador de TNF. Para la caracterización del CBB288 obtenido por vía recombinante (r-CBB288) se utilizarán los mismos ensayos aplicados al prototipo syn-CBB288.

Basado en estos elementos y de acuerdo con los antecedentes que serán discutidos se propone la siguiente hipótesis.

Hipótesis

El péptido CBB288 producido por vía recombinante, con actividad biológica demostrada para el bloqueo del TNF, constituye una alternativa factible para el futuro tratamiento de trastornos autoinmunes inflamatorios.

Objetivo general

Desarrollar un proceso productivo para la obtención de r-CBB288 y demostrar la actividad biológica del producto final.

Objetivos específicos

- 1- Establecer las técnicas que permitan caracterizar el r-CBB288 utilizando el prototipo syn-CBB288.
 - 1.1. Caracterizar mediante TMS la afinidad del syn-CBB288 respecto al TNF.
 - 1.2. Demostrar que el syn-CBB288 es capaz de bloquear la actividad citotóxica del TNF (*in vitro*).
 - 1.3. Desarrollar modelo predictivo de afinidad del diseño CBB288 hacia el TNF

- 2- Establecer un proceso recombinante para producir péptido CBB288.
 - 2.1. Desarrollar el proceso fermentativo en *Escherichia coli*.
 - 2.2. Desarrollar la operación de proteólisis con hidroxilamina.
 - 2.3. Desarrollar la operación cromatográfica para la purificación del r-CBB288.
 - 2.4. Caracterizar el r-CBB288 (utilizando la metodología establecida en los objetivos específicos 1.1 y 1.2).

- 3- Evaluar la factibilidad técnico-económica del proceso recombinante.
 - 3.1. Simular el proceso recombinante con la herramienta computacional SuperPro Designer.
 - 3.2. Realizar análisis de costo factibilidad para el proceso desarrollado.

1. Antecedentes generales

1.1 Péptidos como biofármacos

Los péptidos se definen como moléculas formadas por la unión covalente de dos o más aminoácidos, siendo arbitrario el número máximo de aminoácidos que los componen. Desde un punto de vista químico se pueden definir a los péptidos como cadenas de aminoácidos unidos covalentemente mediante enlaces amida, denominados enlaces peptídicos, el enlace peptídico es un ejemplo de reacción de condensación, una reacción común en el organismo [52]. Los péptidos son biomoléculas con acción terapéutica altamente selectiva y potente como los anticuerpos monoclonales. Sin embargo, los péptidos tienen un corto tiempo de vida media en circulación por lo que son eliminados del organismo antes de llevar a cabo su acción terapéutica, por esto es necesario incorporar modificaciones que permitan extender su tiempo de vida media en circulación [19, 53].

Por otra parte, desde un punto de vista legislativo, los péptidos presentan ventajas en términos de asuntos regulatorios, ya que, dependiendo de sus propiedades y fabricación, un péptido puede ser considerado como un medicamento químico convencional, y en otros casos como una entidad biológica. En este sentido, la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) maneja tradicionalmente los péptidos como medicamentos convencionales, no como productos biológicos [54]. Esto se debe a que la FDA enfoca la clasificación en relación con la composición del fármaco y la estructura del compuesto final en lugar de los medios de fabricación. Este aspecto reduce los tiempos necesarios para superar las fases clínico-regulatorias requeridas para la introducción de un producto peptídico a determinado mercado [55].

Más allá de los beneficios regulatorios, los péptidos tienen varios rasgos que los hacen adecuados para su uso como agentes terapéuticos. Estos rasgos incluyen (i) alta bioespecificidad para los objetivos; (ii) alta actividad y amplio espectro de acción, incluidos algunos péptidos individuales con propiedades multifuncionales; (iii) baja toxicidad y menor incidencia de acumulación en los tejidos corporales, en comparación con otras moléculas; (iv) alta diversidad estructural; (v) tamaño pequeño (en comparación con los anticuerpos) que es útil para la liberación en el organismo, y también significa que estos péptidos tienen una baja probabilidad de desencadenar respuestas inmunes indeseables [12, 13].

Como resultado de las actividades fisiológicas que desencadenan los péptidos bioactivos tienen enormes aplicaciones potenciales en las principales industrias de consumo, donde destacan la industria alimenticia y la biomédica, algunos productos terapéuticos basados en péptidos han sido utilizados como agentes antitrombosis, antihipertensión, antimicrobial, anticancerígenos, antidiabético, para el tratamiento de la anorexia y como ansiolíticos. Algunos péptidos pueden desencadenar actividades involucradas en mecanismos que modulan la inflamación celular y tisular (respuesta inmune), la estimulación de la síntesis

de colágeno, el control de la angiogénesis y la melanogénesis, y la modulación de la proliferación celular y la migración celular [12, 15].

De manera general, estas patologías que cursan con inflamación crónica se encuentran asociadas a elevados niveles de TNF en la circulación del organismo, por lo cual, un tratamiento alternativo podría ser el uso de péptidos como fármacos bloqueadores de TNF.

1.2 Péptidos bloqueadores de TNF

El TNF es una proteína que cumple funciones fisiológicas relacionadas a la respuesta inmune e inflamación, las cuales son importantes para la defensa de nuestro organismo, pero existen condiciones en las que el balance de su función se ve alterado, llegando así a condiciones patológicas relacionadas con altos niveles de TNF. La desregulación de la generación de TNF se ha asociado a una variedad de enfermedades humanas incluyendo artritis reumatoide [1] psoriasis [2], espondilitis anquilosante, artritis psoriásica, artritis idiopática juvenil, enfermedad inflamatoria intestinal [3] como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa, cáncer [4] y hace algunos años se han sumado patologías como la enfermedad de Alzheimer y enfermedades cardiovasculares, entre otras [5]. Como su nombre lo indica, los agentes bloqueadores de TNF cumplen su acción interactuando con esta proteína, tanto con su forma soluble como con la forma transmembrana, impidiendo la unión con sus receptores y sus acciones negativas en el organismo. Actualmente la FDA tiene aprobado 5 agentes biológicos bloqueadores de TNF para el tratamiento de patologías asociadas a la inflamación crónica, mencionadas anteriormente: Infliximab (IFX), Adalimumab (ADL), Etanercept, Golimumab, y Certolizumab pegol [6]. Estas moléculas corresponden a anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpos y proteínas de fusión. Estos agentes bloqueadores de TNF actúan como potentes inmunosupresores, lo que trae consigo algunos efectos adversos asociados a la terapia como el aumento de algunos tipos de infecciones, la reactivación de tuberculosis e infección por el virus de la hepatitis B y C, por lo que antes de iniciar el tratamiento con estos agentes se recomienda realizar exámenes para conocer si el paciente padece alguna de estas infecciones y tomar las medidas de precaución necesarias [7]. Otras desventajas de estos medicamentos basados en anticuerpos monoclonales durante su uso terapéutico es el tamaño molecular de los anticuerpos monoclonales (~150 kDa), que dificulta la penetración a los tejidos diana, que pueden ser tumores sólidos, o en el caso de bloqueadores de TNF, sitios de inflamación, esto genera la necesidad de que se administren altas dosis de estos agentes terapéuticos [8, 9, 56]. Un ejemplo es el reporte de grandes mejoras en pacientes con Alzheimer a los que se les administra Etanercept, pero como este biofármaco no puede penetrar la barrera hematoencefálica su administración se realiza por inyección periespinal, lo cual constituye una práctica de alto riesgo [57, 58]. Por otra parte, los altos costos asociados al proceso de obtención de anticuerpos monoclonales en cultivos de células de

mamíferos se traducen en productos de elevados precios, se estima que el valor anual de una terapia individual basada en anticuerpos monoclonales bloqueadores de TNF puede llegar a los 100 000 dólares, lo cual dificulta el acceso de los pacientes a esta terapia, se estima que solo un 10% de la población que requiere estos tratamientos tiene acceso a la misma [8, 10, 11, 56].

Históricamente, los anticuerpos monoclonales se han administrado por vía intravenosa, lo que puede ser potencialmente menos conveniente y más costoso para pacientes, clientes y proveedores. A medida que se desarrollan los anticuerpos monoclonales los pacientes y los proveedores desean y necesitan, diferentes enfoques de administración no intravenosa para facilitar la flexibilidad durante la administración lo cual encarece el proceso. Un enfoque distinto incluye otras formas de entrega parenteral, como la administración subcutánea e intramuscular, junto con estrategias de entrega basadas en depósitos destinados a minimizar el dolor para mejorar la experiencia de la inyección. Esto podría lograrse en el caso de utilizar péptidos para aplicaciones terapéuticas crónicas o subcrónicas, las cuales se desarrollan actualmente en función de modalidades autoadministradas subcutáneamente y otras estrategias de administración que incluyen formulaciones inyectables de liberación sostenida, así como garantizar rutas de administración no invasivas, como la vía oral, transdérmica, de inhalación y nasal [6, 14].

En la actualidad no existe ningún agente terapéutico bloqueador de TNF basado en péptidos en el mercado, aunque si se han realizado estudios al respecto, por ejemplo, Yin y colaboradores combinaron un péptido cíclico de unión a TNF- α (TBCP) y un péptido cíclico de unión al receptor de TNF 1 (TRBCP) para tratar la colitis inducida en ratas durante una semana. Los síntomas de la colitis, incluida la diarrea con sangre, el prolapso rectal y una pérdida de peso profunda y sostenida, mejoraron significativamente, lo cual sugiere que esta combinación puede ser un candidato para el tratamiento clínico de enfermedades relacionadas a la inflamación intestinal, la evidencia macroscópica de la reducción de la inflamación intestinal puede ser observada en la Figura 1 [16].

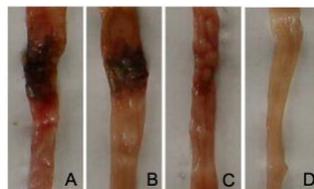


Figura 1. Evidencia macroscópica colónica en ratas con colitis inducida: A-Sin medicación (inflamado y necrosado), B- Aplicación de un péptido irrelevante como control negativo (inflamado y necrosado), C- Aplicación combinada de TBCP y TRBCP (tejido muestra mejoría y es comparable al control positivo), C- Control positivo [16]

De manera similar, Jesmin y colaboradores investigaron el rol que desempeña el péptido endotelina en la lesión pulmonar aguda por sepsis mediante el bloqueo de TNF [17]. Otro estudio, muestra el diseño de un péptido (RDP58) con actividad antiinflamatoria, siendo RDP58 una molécula peptídica que inhibe varias citoquinas proinflamatorias por al menos dos mecanismos distintos. En vista de esta actividad, RDP58 puede tener posibles aplicaciones clínicas en la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa y otras enfermedades con un componente inflamatorio crónico. La molécula peptídica RDP58 formó parte de un estudio clínico fase II para pacientes afectados con la enfermedad de Crohn, los resultados obtenidos sugieren que este candidato es capaz de disminuir los niveles de TNF presentes en muestras de biopsias realizadas a estos pacientes, los niveles de TNF por mililitro de muestra para varias concentraciones de péptido se pueden observar en la Figura 2 [18, 59].

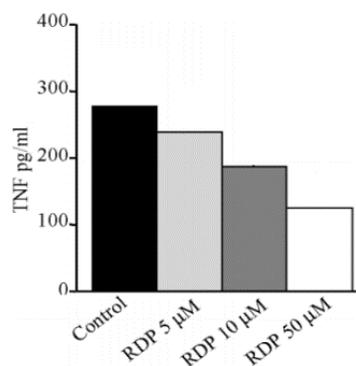


Figura 2. Reducción en los niveles de TNF en biopsias de pacientes con enfermedad de Crohn tratados con el péptido RDP58

Otro acercamiento al tema es abordado por Kanakaraj y colaboradores, en este estudio, se analiza el aumento de la actividad antiinflamatoria de un biofármaco comercial anti-TNF (Adalimumab) cuando se fusiona con un péptido antiangiogénico, esta fusión busca aumentar la actividad terapéutica (antiinflamatoria). Para verificar la funcionalidad de la propuesta, los autores utilizan un modelo de artritis reumatoide en ratones transgénicos Tg197, este modelo animal desarrolla artritis crónica con síntomas y características histológicas detectables [60]. Relacionado al tema, Fleming y colaboradores identificaron péptidos lineales capaces de unirse al Estimulador de Linfocito B (miembro de la familia del TNF), la afinidad de estos péptidos (DX-219, DX-221, DX-818, DX-876), hacia la molécula TNF fue evaluada mediante la determinación de la Kd, los resultados indican una alta afinidad para valores de Kd en el intervalo micromolar para péptidos seleccionados en una segunda ronda de PD [61].

DX-219	DX-221
GYDVLTLYFVPG	WTDSLTLGLWFPD
Kd = 1,9 ± 0,3 μM	Kd = 1,9 ± 0,3 μM
DX-818	DX-876
ANWYDPLTKLSLPD	WYDPLTKLWL
Kd = 0,34 ± 0,11 μM	Kd = 0,17 ± 0,09 μM

Figura 3. Valores de K_D para péptidos de unión a TNF obtenidos en PD [61]

Si bien, la determinación de los respectivos valores de K_D como medida de interacción entre dos biomoléculas puede constituir una prueba preliminar de la afinidad existente, otros ensayos *in vitro* pueden complementar la caracterización de biofármacos antagonistas, para lo cual se hace necesario evaluar la capacidad de los candidatos para neutralizar la actividad citotóxica de dianas terapéuticas en modelos celulares sensibles. Los niveles de neutralización (inhibición) citotóxica o viabilidad celular pueden ser determinados a partir de ensayos de MTT (*diphenyl tetrazolium bromide*), en el caso del TNF es posible utilizar células L929 las cuales son sensibles (apoptosis y muertes celular) a la citotoxicidad inducida por esta citoquina [25, 26, 36, 62]. Un ejemplo sobre el estudio de la neutralización o inhibición de la actividad citotóxica del TNF en una línea celular sensible puede encontrarse en el trabajo realizado por Tong y colaboradores, en el mismo, los autores demostraron que el péptido natural AAGALPS incide de manera positiva en la viabilidad celular, con una recuperación estimada del 40% [25]. Un resultado similar es alcanzado por Qin y colaboradores, en esta ocasión, se evaluó la inhibición de la citotoxicidad del TNF provocada por un péptido fusionado a un fragmento de anticuerpo (péptido 1) y por el mismo péptido sin fusionar (péptido 2), la gráfica de la inhibición a distintas concentraciones de péptidos es mostrada en la Figura 4.

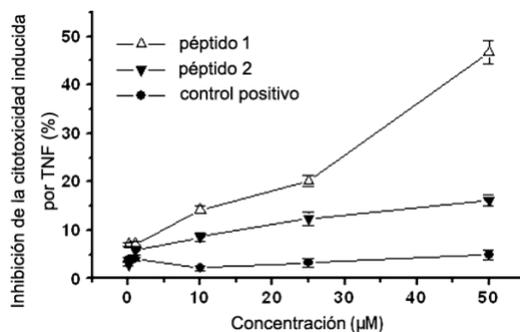


Figura 4. Ensayo MTT para evaluar la inhibición de la citotoxicidad inducida por TNF en modelo celular L929 en presencia de los péptidos 1 y 2 [26]

Según los autores, los resultados sugieren que el péptido 1 presenta capacidad protectora sobre las células L929 al inhibir la unión del TNF con sus receptores, mostrando una aceptable inhibición de la citotoxicidad inducida alrededor del 45% [26]. Otro enfoque relacionado a la actividad neutralizante de péptidos es brindado por Alizade y colaboradores, en este estudio, un ensayo MTT fue llevado a cabo para evaluar la capacidad neutralizante de los péptidos P51 (NLMSRPI) y P52 (HAIYPRH) en la citotoxicidad del TNF en

células L929, los péptidos evaluados fueron seleccionados de una biblioteca de fagos y posteriormente sintetizados por vía química.

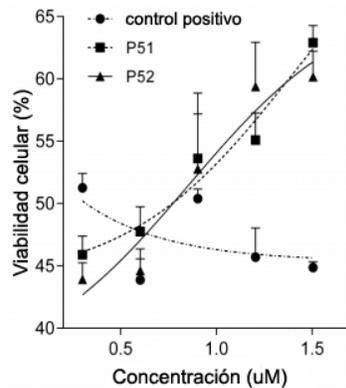


Figura 5. Ensayo MTT para evaluar la viabilidad celular en un modelo celular L929

La gráfica de la Figura 5 muestra la neutralización de los efectos citotóxicos del TNF a distintas concentraciones de los péptidos evaluados expresado como el porcentaje de viabilidad celular. Ambos péptidos son capaces de proteger las células L929, permitiendo recuperar la viabilidad celular del 45 al 60% aproximadamente. La propiedad neutralizante de los péptidos es atribuida a su capacidad de unirse en las interfaces entre las subunidades que conforman la molécula TNF fomentando la disociación estructural [62].

No obstante al interés existente en relación al potencial terapéutico de estos bioactivos como antagonistas del TNF, el desarrollo de productos comercializables basados en péptidos está limitado por el hecho de que los procesos de fabricación actuales son difícil de escalar, de alto costo o pueden introducir modificaciones a las propiedades estructurales de los péptidos diseñados, afectando así la actividad biológica y por ende la eficacia terapéutica del producto final [12].

1.2.1 Identificación de péptidos por PD

La tecnología PD se basa en la posibilidad de expresar péptidos foráneos fusionados a proteínas de la cápside de bacteriófagos. La expresión de los péptidos se logra insertando el gen codificante del péptido en el gen codificante de una de las proteínas de la cápside. Esta tecnología permite la exposición de un gran pool de péptidos sobre partículas de bacteriófagos, los cuales pueden ser evaluados simultáneamente para una actividad deseada [22, 24].

PD es utilizado para desarrollar ligandos peptídicos y para el mapeo de epítopes (porción de una macromolécula que es reconocida por el sistema inmunológico, específicamente la secuencia a la que se unen los anticuerpos) [63, 64]. El procedimiento implica entre 2 y 4 rondas iterativas de selección de afinidad y amplificación de fagos seguidas de una detección opcional basada en ELISA y secuenciación de varias docenas de clones positivos [65]. PD se basa fundamentalmente en la naturaleza y en el ciclo

infeccioso de bacteriófagos filamentosos (virus que pueden infectar bacterias) tal como el M13 (Figura 6).

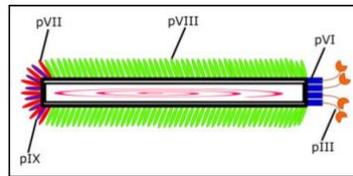


Figura 6. Esquema de bacteriófago filamentosos (cápside M13)

La cápside del M13, puede retener el genoma de ADN monocatenario y consta de 2700 copias de la proteína pVII. Esta proteína principal, se usa comúnmente para exponer péptidos o proteínas exógenas en la superficie del bacteriófago. Aproximadamente 5 copias de las proteínas de recubrimiento pVII y pIX cubren un extremo del bacteriófago, mientras que el otro extremo consiste en 3 o 5 copias de las proteínas pIII y pVI. Una vez dentro de la bacteria, el ADN monocatenario se convierte en ADN bicatenario (la forma replicativa del ADN) por la maquinaria de replicación del organismo huésped. Posteriormente, el ADN se replica mediante replicación en círculo rodante, y el producto resultante es una molécula de ADN monocatenario que codifica las proteínas necesarias para el empaquetamiento del ADN en la cápside del bacteriófago. Finalmente, los bacteriófagos maduros salen de la bacteria sin lisar la célula, lo cual es un rasgo característico de los fagos filamentosos [66]. Esto hace de PD una técnica molecular muy eficiente, en la que péptidos seleccionados se fusionan con las proteínas que recubren el virus para ser expuestas en la superficie de la cápside M13. En el proceso, los péptidos foráneos generalmente se fusionan con el extremo N-terminal de las proteínas pIII y pVIII. Los fragmentos de péptidos foráneos varían de 6 a 43 aminoácidos de longitud, ya que los péptidos que son demasiado grandes pueden interferir potencialmente con la actividad infecciosa del virus o con el ensamblaje de la cápside [66-68].

Un aspecto importante de la tecnología PD es la introducción de mutaciones de ganancia de función (la inserción de una secuencia de interés) en una posición específica dentro de un gen viral que retiene la funcionalidad de su producto proteico y brinda como resultados péptidos modificados que se muestran en la superficie viral. Para las inserciones aleatorias de nucleótidos, las partículas virales resultantes forman una biblioteca de péptidos PD que pueden contener hasta 10^{10} péptidos diferentes construidos simultáneamente [66, 69]. Posteriormente, estas bibliotecas se someten a un procedimiento de selección en el que los clones de unión se separan de los clones que no se unen a través de la purificación por afinidad. Los péptidos que se unen a las moléculas diana se pueden identificar mediante *biopanning* (un tipo de selección por afinidad). La implementación de la tecnología PD para identificar péptidos que se unen a una diana molecular, se debe contar con una biblioteca de péptidos expuestos en la superficie de un bacteriófago [70, 71].

Teniendo en cuenta que la tecnología de PD permite reconocer péptidos que interaccionan con una proteína diana con alta afinidad, en este trabajo, se utilizará una secuencia peptídica capaz de unirse al TNF (GLERWTPWNY). Independientemente de las técnicas *in vitro* que se puedan realizar para la selección de péptidos capaces de unirse a determinados ligandos o biomoléculas dianas, es posible predecir si algún péptido presenta sitios a unión en la superficie de una proteína determinada. Para esto se utilizan herramientas computacionales que se encuentran disponibles en servidores de docking molecular como por ejemplo CABS-dock (biocomp.chem.uw.edu.pl/CABSdock) [72].

La lógica racional en el diseño de este péptido de fusión, además de perseguir un potencial bloqueo del TNF, busca también dirigir el proceso productivo hacia la tecnología recombinante en base a la obtención de un tándem multimérico (Figura), constituido por 15 copias de la secuencia del péptido CBB288, ilustrado en la **Error! Reference source not found.**

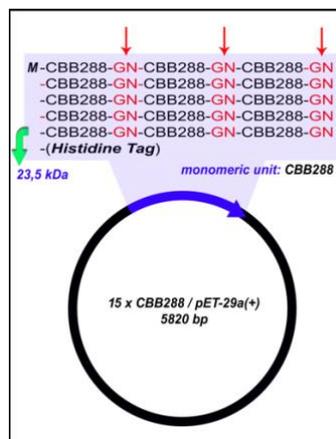


Figura 10. Esquema de tándem multimérico, mediante enlace NG, para promover proteólisis con hidroxilamina (Elaboración propia)

La incorporación de los residuos de glicina (G) y asparagina (N) en los extremos de la estructura, garantiza que la unidad CBB288, pueda ser recuperada del tándem multimérico mediante proteólisis asistida con hidroxilamina (HX) [33, 73]. El tándem, a su vez, será producido como una proteína recombinante en cuerpo de inclusión.

1.3 Producción de péptidos recombinantes

La falta de procesos comercialmente viables para la producción a gran escala de péptidos bioactivos, ha sido un obstáculo importante para la introducción de péptidos en el mercado mundial. Donde existe la necesidad de investigar aspectos básicos relacionados a la optimización de las técnicas de purificación diseñadas específicamente para este fin [12]. La mayoría de los péptidos farmacéuticos fabricados a gran escala se producen utilizando vía química, preferentemente para la obtención de péptidos de pequeño y

mediano tamaño (hasta 35 aminoácidos aproximadamente) [29]. La síntesis química, presenta como principal desventaja el extenso tiempo de desarrollo durante los estudios preclínicos, fase en la cual una rápida producción del candidato terapéutico es crucial [55]. Por otra parte, la síntesis por vía química involucra el consumo de grandes cantidades de disolventes junto a la generación excesiva de residuos tóxicos, haciendo de esta metodología un proceso poco sustentable desde el punto de vista ecológico y económico [28, 74].

Debido al desarrollo de la biotecnología moderna, una alternativa atractiva para la fabricación de péptidos son los sistemas de producción basados en la tecnología recombinante, la cual ha sido utilizada satisfactoriamente para la obtención de péptidos de tamaños superiores a 25 aminoácidos, esta metodología ofrece una buena combinación de costo-efectividad, escalabilidad y sustentabilidad [29, 30]. Dentro de las modalidades utilizadas en la tecnología recombinante la producción de péptidos mediante fermentación microbiana en *Escherichia coli* es la más rápida y económica en comparación al uso de células de mamíferos [29, 31]. La expresión directa de péptidos en *Escherichia coli* puede provocar la degradación citoplasmática del producto y generar toxicidad en el huésped. Para solucionar este problema, se han diseñado estrategias que consideran la producción de péptidos recombinantes fusionados a una proteína con propiedades específicas, como por ejemplo la Inteína [32, 42, 75], o bien, la expresión en forma de tándem multimérico, que contiene varias copias del mismo péptido [33, 34, 76]. Una desventaja que puede presentar la estrategia de péptidos fusionados es precisamente que la porción de péptido de interés es pequeña en comparación a la cantidad de proteína recombinante obtenida, debido al elevado tamaño molecular de estas proteínas de fusión [77]. Por otra parte, se conoce, que la expresión multimérica en forma de tándem puede mejorar los rendimientos a medida que aumenta la relación de masa de péptido a portador. Por ejemplo, en estudios de expresión de péptidos antimicrobianos se obtuvieron rendimientos de 1,4 mg.L⁻¹ cuando el péptido fue expresado como proteína de fusión, mientras que un rendimiento de 12 mg.L⁻¹ fue obtenido para el mismo péptido expresado como un tándem multimérico [29, 35, 78].

Ambas estrategias de expresión requieren de una segunda etapa donde se incluye una proteólisis, la cual permite obtener la unidad monomérica de interés (r-CBB288, en este caso). Para la proteólisis, usualmente se utiliza bromuro de cianógeno para cortar en residuos de Met, o se realiza un corte específico con ácido fórmico en Asp⁺Pro o bien en Asn⁺Gly con HX. El uso de uno u otro agente de incisión es relativo a la estructura de la proteína intacta, ya sea como proteína de fusión o tándem multimérico [33, 34, 73, 79], esta metodología se denomina proteólisis química. Otra manera de realizar la proteólisis es mediante el uso de enzimas (proteólisis enzimática), esta metodología incurre en costos elevados en comparación con la proteólisis química, aunque, entre las proteasas que se han utilizado destaca el uso de Trombina como la

alternativa más económica [75]. De manera específica, la expresión de péptidos recombinantes en *Escherichia coli* realizada a partir de tándem multimérico genera cuerpos de inclusión, lo cual trae como consecuencia que la aplicación de una escisión química sea lo más conveniente [30].

Una tercera etapa durante la obtención recombinante de péptidos, es la purificación del péptido interés, una vez terminada la proteólisis [38]. No obstante, independientemente del “*upstream*” seleccionado, los pasos críticos de un proceso recombinante recaen en las etapas asociadas a la separación y purificación de los péptidos objetivos, debido al impacto negativo que tienen estas operaciones unitarias sobre posibles modificaciones estructurales del producto que pueden reducir la eficacia terapéutica y la viabilidad económica del proceso [12, 55, 80]. Las estrategias convencionales utilizadas hasta el momento para la fabricación recombinante de péptidos ha encontrado dificultades en los bajos rendimientos debido a la implementación de etapas multipasos para lograr la proteólisis de la proteína de fusión o del tándem multimérico y, en las operaciones unitarias necesarias para alcanzar los niveles de pureza requeridos por regulación [28, 39]. La purificación de péptidos con actividad biológica usualmente se realiza mediante técnicas de “*downstream*” basadas en sistemas de filtración por membranas y/o operaciones cromatográficas [12, 39-41]. Las operaciones cromatográficas convencionales utilizadas en las etapas de purificación son, la cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacciones hidrofóbicas y la cromatografía de exclusión molecular (CEM) [42]. Durante la purificación de péptidos, las secuencias de operaciones son implementadas a partir de ensayo y error con el objetivo de obtener un producto con actividad biológica y pureza requerida, haciendo muy lento el desarrollo del fármaco y en ocasiones con costos elevados. De hecho, se ha estimado que alrededor del 70% de los costos de producción en los procesos biotecnológicos están asociados a etapas de purificación [43]. La problemática se agudiza también, cuando se busca la optimización de las operaciones de purificación para péptidos novedosos, cuyas propiedades físico-químicas no han sido estudiadas, aunque en este aspecto, herramientas interactivas como ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/protparam-doc.html>) pueden ser utilizadas para predecir teóricamente parámetros físico-químicos como la talla molecular, punto isoeléctrico, coeficiente de extinción y tiempo de vida media estimado [12, 44, 81, 82].

El proceso propuesto en este trabajo, para la obtención de un novedoso péptido terapéutico, constará de tres etapas productivas principales, la primera etapa será la fermentación microbiana en *Escherichia coli*, donde se obtendrá por vía recombinante copias unidas del CBB288 en forma de tándem multimérico como cuerpos de inclusión. En una segunda etapa se realizará la liberación de la secuencia peptídica de interés, donde, un paso de proteólisis química será aplicado al tándem multimérico previamente aislado y solubilizado, luego

para una tercera etapa se diseñarán las operaciones unitarias necesarias para alcanzar la máxima purificación del péptido.

1.4 Fermentación microbiana en *Escherichia coli* (etapa 1)

En comparación con el aislamiento de fuentes naturales y la síntesis química, el enfoque recombinante ofrece los medios más rentables para la producción de péptidos a gran escala. Entre los sistemas disponibles para la producción de proteínas heterólogas, *Escherichia coli* es el hospedero más utilizado [30, 40, 83-86]. Esto se debe a que este microorganismo ha sido ampliamente estudiado tanto desde el punto de vista genético como fisiológico, y además se disponen de baterías de vectores plasmídicos para expresar moléculas recombinantes en este tipo de sistemas [87, 88]. Entre las ventajas que brinda este microorganismo como hospedero se encuentran: la rápida generación de biomasa (elevada velocidad de crecimiento), la fácil manipulación genética, que no posee requerimientos costosos asociados a medios de cultivo o equipamiento, una alta eficiencia en la incorporación de material genético foráneo y una gran variedad de vectores de expresión. Además, es un microorganismo aprobado por las entidades regulatorias para su utilización como hospedero en la producción de biofármacos para uso en humanos [89].

Las proteínas recombinantes en *Escherichia coli* pueden ser expresadas mediante dos formas fundamentales: secretadas al medio extracelular o expresadas en el interior de la célula, donde pueden ser localizadas en el espacio periplasmático o en el citoplasma celular. Muchos de los polipéptidos recombinantes producidos a altos niveles en *Escherichia coli* se localizan en el citoplasma en forma insoluble y pueden formar cuerpos de inclusión [36, 90, 91]. Los investigadores han descubierto que la expresión de proteínas realizada a una alta concentración y temperatura del inductor conlleva a una velocidad de traducción incrementada y eventualmente puede dar lugar a la formación de cuerpos de inclusión. Los cuerpos de inclusión de proteínas recombinantes se forman a partir de estructuras tipos amiloide, en las cuales las proteínas en una conformación que incluye a los nativos son atrapadas en el interior de la célula, debido a esto muchas proteínas mantienen con frecuencia una similitud estructural secundaria y terciaria, mostrando incluso algún grado de actividad biológica [92]. Los cuerpos de inclusión son estables ante la degradación proteolítica y pueden contener hasta un 90% de la proteína de interés [77]. La formación de cuerpos de inclusión durante la expresión bacteriana en *Escherichia coli* constituye un reto en el recobrado del producto activo, pues los cuerpos de inclusión requieren un proceso de *downstream* que involucra mayormente, aislamiento (ruptura), solubilización, purificación y *refolding* de la proteína [36, 91, 93]. El paradigma de que los cuerpos de inclusión como estrategia de fermentación son residuos biológicos ha sido debatido y refutado durante mucho tiempo. Estos pueden considerarse una ventaja para producir biomoléculas recombinantes de interés que suelen ser tóxicas para el hospedero, como es el caso

de los péptidos y también pueden servir como material de partida relativamente puro para otras proteínas recombinantes. No obstante, todavía no se ha logrado explotar todo su potencial para la producción de proteínas recombinantes en el ámbito biotecnológico [77].

Basado en este enfoque, se han realizado estudios que muestran que para iguales niveles de expresión, un proceso convencional de cuerpo de inclusión resulta menos económico que un proceso convencional basado en proteína soluble [42, 94]. Sin embargo, cuando los niveles de expresión favorecen a los sistemas que forman cuerpos de inclusión, se puede derivar en procesos con un costo productivo en un 80% menor, al compararlos con sistemas basados en proteína soluble, los cuales requieren una capacidad volumétrica sustancial [94]. El atrapamiento de proteínas recombinantes en cuerpos de inclusión ofrece la posibilidad de trabajar con bajos niveles de contaminantes desde las etapas primarias de producción, por lo tanto disminuyen los costos asociados a etapas posteriores de purificación, las cuales influyen negativamente y de forma crítica en la factibilidad del proceso productivo [43, 92].

Por lo tanto, uno de los objetivos de este trabajo, estará centrado en el establecimiento de un sistema de expresión recombinante que facilite amortizar los costos generados durante la etapa de purificación del producto peptídico de interés, para ello se implementará una fermentación microbiana capaz de formar cuerpos de inclusión, por lo tanto, se requiere un elevado nivel de expresión, lo cual pudiera lograrse mediante cultivos de alta densidad celular [95-97].

1.4.1 Cultivos de alta densidad celular

Los niveles de expresión de proteínas en fermentaciones de *Escherichia coli* pueden aumentarse significativamente con estrategias de cultivos de alta densidad celular (CADC), lo cual hace posible alcanzar concentraciones celulares alrededor de los 100 gramos de peso seco por litro. No obstante, un valor exacto de peso de células secas por litro no se ha considerado como representativo de los CADC y diferentes estudios han determinado diversos valores de peso de células secas desde 50 g.L⁻¹ hasta incluso valores en el intervalo de los 20 g.L⁻¹. Los CADC también han mostrado ser útiles para favorecer los indicadores económicos de los procesos recombinantes, mediante la reducción de los volúmenes de operación y la mejora de las etapas de purificación, también influyen en minimizar la generación de residuos y los costos asociados por equipamiento [97]. Para sistemas de expresión extracelular mediante procesos de fermentación, la estrategia de CADC ha sido reportada de manera limitada [98].

Aunque es posible usar *Escherichia coli* como hospedero para la producción de proteínas excretadas al medio, los investigadores prefieren utilizar otros hospederos para este propósito, especialmente, utilizan

microorganismos que carecen de membranas externas como las bacterias gram-positivas o aquellos que presentan mecanismos excretores con mayor disponibilidad, como las levaduras [97, 99, 100].

1.4.2 Proceso fermentativo

Una vez que se desarrolla el sistema de expresión en *Escherichia coli*, la estrategia de CADC se lleva a cabo para aumentar la concentración final del producto proteico. Se ha demostrado que, la composición de nutrientes, modo de alimentación de nutrientes y las variables de fermentación como la temperatura, el pH y el nivel de oxígeno disuelto (OD) pueden afectar la transcripción, la traducción, la actividad proteolítica, los niveles de producción y la estabilidad. Estos parámetros, por lo tanto, pueden ser estudiados para la producción de alto nivel de expresión de la proteína recombinante deseada [97, 100]. La densidad celular está limitada principalmente por la presencia de acetato, el cual es un metabolito inhibidor primario que se acumula en los cultivos de *Escherichia coli* afectando la estabilidad de la proteína [100]. La acumulación de acetato puede ser controlada mediante algunos parámetros de la fermentación, entre los que se encuentran precisamente el valor del pH y el nivel de OD. Se conoce, que a valores extremos de pH de 4,4 y 9,2 las células de *Escherichia coli* liberan varias enzimas vinculadas a la formación de acetato, específicamente a valores de pH entre 6 y 6,5 la concentración de acetato es de 6 g.L⁻¹ y aumenta a 12 g.L⁻¹ cuando el pH es igual a 7,5 [101, 102].

Otro factor de importancia es la temperatura, algunos autores plantean que la temperatura óptima de crecimiento de *Escherichia coli* es $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, la cual coincide con la temperatura de máxima actividad de la enzima T7 RNA polimerasa, pero no es necesariamente la temperatura óptima de producción de proteínas heterólogas [103, 104]. Por ejemplo, en un estudio realizado por Pineda y colaboradores, fermentaciones en *Escherichia coli* fueron comparadas a temperaturas de 39 y 42°C, tanto a escala de laboratorio como a escala productiva, los autores obtuvieron cuerpos de inclusión cuando se trabajó a ambas temperaturas, sin embargo el material resultante de la experimentación a 39°C derivó en un producto susceptible a la degradación proteica debido a un bajo contenido de estructura amiloide, no ocurriendo lo mismo cuando se utilizó una temperatura de 42°C [137]. Contrario a esto, el uso de temperaturas inferiores a la óptima de crecimiento ($37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) puede reducir la velocidad de síntesis de proteínas foráneas, como consecuencia se favorece la solubilidad del producto de interés [103, 105]. No obstante, a una temperatura de 30°C buenos niveles de expresión fueron alcanzados por Gordon y colaboradores durante la fermentación de proteínas de membranas, el nivel de expresión para 30°C fue mayor que cuando se procedió a trabajar a la temperatura óptima [106]. De manera general, un decrecimiento pronunciado de la temperatura óptima genera múltiples cambios celulares, que provocan ineficiencias en el correcto plegamiento de las proteínas [106, 107]. En varios estudios, la temperatura ha sido revelada como el factor de mayor significación estadística en la

producción de proteínas recombinantes, lo cual resulta coherente, debido a que la temperatura de operación desempeña un rol crítico en los procesos de transcripción y de traducción celular [97, 108, 109].

En el caso del nivel de OD, también se reconoce su influencia en la acumulación de acetato y densidad celular, en varios estudios se indica que el incremento de OD disminuye la acumulación de acetato mediante mecanismos metabólicos que involucran a la glucosa como nutriente. Sin embargo, el aumento del nivel de OD también fomenta la acumulación de especies de oxígenos reactivos (*ROS*, de sus siglas en inglés), las cuales pueden ocasionar stress y daño irreversible en componentes celulares del hospedero *Escherichia coli* [110-114]. Se han reportado resultados al respecto, en los cuales, aceptables niveles de concentración celular (35 g.L^{-1} - $51,2 \text{ g.L}^{-1}$) han sido alcanzados al operar el fermentador con un 20% de OD en las primeras 20 horas y un 30% de OD de 20 a 28 horas de fermentación [101, 104].

En el caso de diseños de sistemas de expresión basados en *Escherichia coli*, para un alto rendimiento, la mayoría de los procesos productivos se realizan en modo de lote alimentado (*fed-batch*) [104, 115, 116]. En la siguiente figura se pueden apreciar las diferencias durante el modo de operaciones por lotes (batch), operaciones continuas y operaciones discontinuas tipo lote alimentado (*fed-batch*).

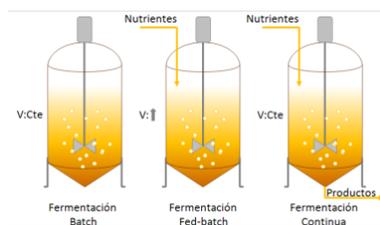


Figura 7. Modos operacionales para sistemas fermentativos, donde V: volúmen

En los procesos de alimentación por lotes, se puede establecer un crecimiento limitado en carbono para generar CADC en *Escherichia coli* de una manera simple y robusta [95, 117]. La limitación de carbono resulta en tasas de crecimiento por debajo de la tasa de crecimiento crítica lo cual evita la formación de acetato [116]. En este sentido, la alimentación de la fuente de carbono desempeña un rol fundamental en el establecimiento de sistemas de expresión de proteínas recombinantes. Las estrategias simples de alimentación tales como alimentación a velocidad constante, alimentación escalonada o alimentación exponencial se han utilizado con éxito para obtener alta densidad celular de *Escherichia coli*. La estrategia de alimentación exponencial en particular permite en la mayoría de los casos, que las células crezcan a una velocidad de crecimiento específica constante mediante el uso de glucosa (u otra fuente de carbono). La no deseada formación de acetato se puede minimizar controlando la velocidad de crecimiento específica por debajo de un cierto valor, por ejemplo, $0,2$ y $0,35 \text{ h}^{-1}$. Además, la concentración de la fuente de carbono (glucosa o glicerol) en el caldo de cultivo se mantiene cerca de cero sin fluctuación durante la alimentación exponencial, y por lo tanto causa una perturbación mínima en el metabolismo celular del carbono [97].

En la mayoría de los procesos fermentativos de proteínas recombinantes, se utiliza el medio complejo LB, el cual contiene: Triptona (10 g.L^{-1}), Extracto de levadura (5 g.L^{-1}) y NaCl (10 g.L^{-1}) [106, 118-121]. Utilizando medios ricos en nutrientes (por ejemplo, *2X YT*, *Terrific Broth*), se pueden producir más células y por lo tanto, más proteínas por unidad de volumen de medio de cultivo. Por ejemplo, según Li y colaboradores con medios enriquecidos en CADC es posible obtener 56 g.L^{-1} de biomasa húmeda, 10 veces más que cuando se utiliza medio LB simple [122]. Este medio puede ser modificado aumentando o disminuyendo la concentración de sus componentes o agregando fuentes de carbono inmediatas tales como glucosa o glicerol, para aumentar la densidad celular final. Se utiliza glicerol, en lugar de glucosa, si se busca evitar reprimir el transporte del inductor lactosa al interior de las células, lo cual es perjudicial en los cultivos inducidos a través de este compuesto [123-125].

Otro aspecto importante de los procesos fermentativos recombinantes involucra la selección de los medios de cultivos. Los medios de cultivo recomendados por los proveedores de sistemas de expresión se pueden mejorar para incrementar la productividad y el rendimiento del proceso productivo. Incluso, algunos proveedores destacan la necesidad de variar las condiciones de crecimiento e inducción, puesto que cambiar uno de estos factores puede influir sobre los niveles de expresión y la solubilidad de la proteína de interés [108, 126-128]. Al realizar una fermentación lo ideal es saber de forma precisa, qué contiene el medio para poder realizar balances de masa apropiados. Para esto es necesario utilizar medios de cultivo de composición definida, los cuales se preparan a partir de sales inorgánicas y una única fuente de carbono [129].

Existen diversas cepas de *Escherichia coli*, con diferentes requerimientos nutricionales. Algunas variantes como TG1, W3110 y B54125 pueden crecer en medios químicamente definidos, pero otras necesitan suplementos de vitaminas, aminoácidos o bases nitrogenadas que no se conocen con precisión sus concentraciones requeridas. En estos casos se emplean medios complejos o medios definidos enriquecidos con hierro, extracto de levadura o triptona [37, 106, 120, 121]. Al comparar el medio de cultivo LB con medios enriquecidos, se ha determinado que aumenta el nivel de biomasa, pero no hay un aumento sustancial en la producción de proteínas recombinantes, es decir en los niveles de expresión [106, 108, 130].

En resumen, existen múltiples factores de entrada con influencia evidente sobre el crecimiento celular y el nivel de expresión en los procesos de fermentación. En este trabajo, algunos parámetros serán fijados, como el caso del uso preferente del IPTG para inducir, el modo de operación será lote alimentado y se utilizará medio de cultivo de composición definida. Bajo este escenario, la optimización de la etapa de fermentación se realizará mediante herramientas de diseño experimental, para la cual se seleccionarán como factores de

entradas: la temperatura de operación, la fuente de carbono, el pH y los niveles de OD. Se pretende encontrar un espacio de diseño óptimo que permita la obtención de un óptimo para el crecimiento celular y los niveles de expresión del proceso fermentativo en el intervalo operacional estudiado.

1.5 Liberación del r-CBB288 (etapa 2)

Para obtener proteínas activas a partir de los cuerpos de inclusión generados mediante tecnología recombinante, se hace necesario mayormente un primer paso de aislamiento, en el cual las células de la fermentación son sometidas a una operación de ruptura celular y los cuerpos de inclusión son separados con una operación de centrifugación [77, 131, 132]. Luego se precisa solubilizar la proteína de interés (en este caso, el tándem multimérico) mediante la adición de agentes desnaturizantes tales como urea o cloruro de guanidinio, lo cual se conoce como paso de solubilización o desnaturalización [92, 133, 134]. Posteriormente un paso de renaturalización es requerido para que la proteína adopte nuevamente niveles superiores de estructuración (estructura nativa), el retorno a la conformación nativa se logra mayormente por dilución, diálisis o renaturalización en columna, en todos los casos eliminando al agente desnaturizante. De manera general un paso final que permita concentrar la proteína de interés es realizado, donde técnicas de separación pueden ser implementadas, como por ejemplo, técnicas cromatográficas o técnicas de filtración tangencial [131, 135-137].

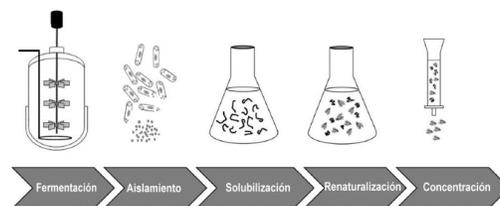


Figura 8. Esquema típico para procesos de proteínas recombinantes a partir de cuerpos de inclusión

El proceso general mostrado en la Figura 8 es representativo de la producción de proteínas recombinantes a partir de cuerpos de inclusión y puede ser utilizado también para la obtención de péptidos, aplicando los pertinentes cambios según el objetivo perseguido y las características del producto de interés final [163]. En el caso de los procesos de obtención de péptidos se requiere adicionar un paso intermedio de proteólisis que tiene como objetivo la liberación de la secuencia peptídica deseada, tanto para péptidos que se encuentran fusionados a una proteína específica, como para un tándem multimérico (copias repetidas de un mismo péptido) [33, 37, 74, 138].

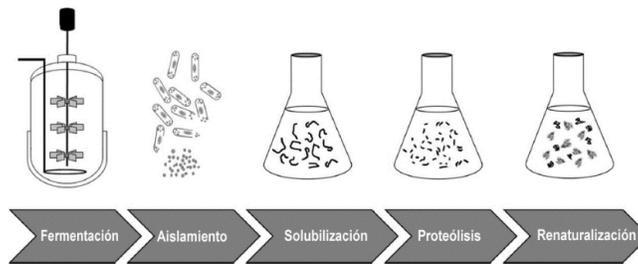


Figura 9. Esquema modificado para procesos de péptidos recombinantes a partir de cuerpos de inclusión

En el esquema mostrado en la Figura 9, un paso de proteólisis es añadido una vez que se obtiene la cadena proteica soluble y desplegada, donde luego el paso de renaturalización tendrá como objetivo eliminar los reactivos utilizados, así como los agentes desnaturalizantes presentes en la solución que contiene la secuencia peptídica objetivo.

1.5.1 Aislamiento

La obtención de proteínas recombinantes mediadas por cuerpos de inclusión comienza con métodos de ruptura celular para separar los cuerpos de inclusión del debris celular. Los métodos de ruptura, también llamados de ruptura celular pueden estar basados en principios físicos, químicos o enzimáticos [139, 140]. Dentro de los métodos físicos sobresalen la homogenización de alta presión (HAP) o el uso de molinos de bolas como los más empleados, esto se debe a que su aplicación a escala industrial no incurre en costos adicionales por concepto de consumibles, agentes químicos o enzimas. Los recobrados de un proceso no varían significativamente al utilizar ambos métodos de manera independiente, pero las características de las soluciones de cuerpos de inclusión procesados si varían en cuanto a distribución de tamaño del debris celular. Pero, es conocido, que cuando se utiliza HAP (100-300 MPa) el tamaño promedio de las partículas del debris celular se reduce considerablemente en comparación al resto de los métodos, facilitando las operaciones posteriores [77].

1.5.2 Solubilización-recuperación

Luego de la ruptura celular, los cuerpos de inclusión expuestos son generalmente solubilizados mediante la adición de soluciones de agentes desnaturalizantes tales como cloruro de guanidina (6 mol.L^{-1}) o urea (8 mol.L^{-1}). Para el caso de proteínas, que contienen cisteínas en su estructura, se adicionan también agentes reductores tales como Ditiotreitól (DTT) o β -mercaptoetanol. Estos agentes reductores se encargan de romper los enlaces S-S a grupos SH en la proteína. Los cuerpos de inclusión solubilizados típicamente contienen proteínas monoméricas desplegadas, desnaturalizantes, tampones, oligómeros de proteínas y algunas proteínas defectuosas [133]. De manera general, en la producción de proteínas recombinantes como cuerpos de inclusión al finalizar la solubilización requiere preferiblemente la eliminación de los

contaminantes anteriormente mencionados, una de las estrategias más utilizadas para eliminar contaminantes en condiciones denaturantes es la separación cromatográfica por afinidad mediada por quelatos metálicos (Ni^{2+}), para esto se hace necesario incorporar por diseño etiquetas de polihistidina a la molécula recombinante (tándem), estas etiquetas son capaces de formar complejos de coordinación con metales (ejemplo Ni^{2+}) previamente cargados en soportes sólidos. Para esta técnica se han reportado niveles de eliminación superiores al 80% para los contaminantes presentes en soluciones proteicas proveniente de pasos de ruptura y solubilización [74, 141, 142].

1.5.3 Proteólisis

Normalmente, las proteínas recombinantes pueden ser sometidas a proteólisis mediante métodos químicos o enzimáticos cuando se busca liberar de manera específica un segmento peptídico requerido. Al respecto, cuando métodos enzimáticos son utilizados, el proceso tiende a ser costoso, de hecho, existe preferencia por parte de los investigadores en utilizar los métodos químicos para escalas productivas [33, 37, 74, 141]. Estudios previous han informado sobre la liberación de péptidos por digestión química con bromuro de cianógeno (CNBr), este reactivo tiene la capacidad de escindir péptidos en los residuos de metionina. No obstante, el CNBr resulta ser altamente tóxico para humanos y los productos peptídicos obtenidos mediante esta vía son típicos de procesos recombinantes de un bajo porcentaje de recobrado final del producto, además los pasos de purificación se dificultan durante la obligatoria eliminación del reactivo. En contraste, se conoce otro reactivo ampliamente utilizado, la hidroxilamina (HX), que resulta ser menos tóxico y más barato [141].

La HX puede escindir enlaces peptídicos de Asn-Gly, constituyendo una buena opción en dependencia de la estructura del tándem multimérico obtenido por diseño. Una reacción con HX de escisión máxima es posible alcanzarla a varias condiciones sugeridas, según Wei y colaboradores, se debe estudiar la reacción a concentraciones de HX entre 0,5 y 2 mol.L⁻¹, la temperatura debe oscilar entre 40 y 55°C, y el pH entre 8,65 y 9 [141]. Otros autores también trabajaron en aras de optimizar una reacción de proteólisis inducida por hidroxilamina, en este contexto, un enfoque cercano a este trabajo lo constituye el estudio realizado por Park y colaboradores, donde la proteólisis de proteínas de fusión fue llevada a cabo con HX para obtener un péptido antimicrobial para fines médicos. La eficiencia de la proteólisis fue considerada como dependiente de la concentración de proteína intacta, del pH del medio y de la presencia de agentes desnaturizantes. La eficiencia de la proteólisis (EP) fue evaluada bajo las siguientes condiciones, (i) concentración de proteína intacta (sustrato) entre 5 y 10 mg.mL⁻¹,(ii) pH entre 8,1 y 9,5, (iii) el uso individual de urea y guanidina como desnaturizantes fueron tomados como variables categóricas del diseño experimental realizado. La concentración de HX para cada experimento fue de 1,7 mol.L⁻¹ y la temperatura se mantuvo constante a 45°C. La eficiencia de la proteólisis fue medida como la relación

existente entre las áreas de los picos cromatográficos en HPLC (del inglés, *High Performance Liquid Chromatographic*) de los péptidos productos y un pico cromatográfico del mismo péptido sintetizado por vía química (control positivo). Los resultados sugieren que, el mejor valor de eficiencia de la proteólisis (95%) en el intervalo estudiado, es posible alcanzarlo con una concentración de proteína intacta igual a $6,7 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, un valor de pH igual a 8,1 y con la presencia de la guanidina ($4,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) como agente desnaturalizante [143].

Otro enfoque pertinente es discutido por Zhou y colaboradores, en este estudio los autores utilizan HX para escindir enlaces peptídicos Asn-Gly de un concatémero proteico (tándem) constituido por 6 péptidos $\text{T}\alpha 1$, es decir $6\times\text{T}\alpha 1$, cuyo objetivo final perseguía la liberación del monómero $\text{T}\alpha 1$. La proteólisis en este caso fue realizada a una concentración de HX de $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, un valor de pH del medio igual a 9 y una temperatura de 45°C . La corriente producto de la proteólisis es luego analizada mediante cromatografía de exclusión molecular con resina *G25 medium*, los resultados de esta técnica fueron tomados como medida del completamiento de la proteólisis, pues el monómero $\text{T}\alpha 1$ de aproximadamente $\sim 3,1 \text{ kDa}$ de peso molecular (según *SDS-PAGE*) podría penetrar la matriz de la columna cromatográfica, mientras que una proteólisis incompleta del concatémero genera subproductos del tipo $2\times\text{T}\alpha 1$ ($\sim 7 \text{ kDa}$), $3\times\text{T}\alpha 1$ ($\sim 11 \text{ kDa}$), $4\times\text{T}\alpha 1$ ($\sim 15 \text{ kDa}$), $5\times\text{T}\alpha 1$ ($\sim 19 \text{ kDa}$), and $6\times\text{T}\alpha 1$ ($\sim 23 \text{ kDa}$) que estéricamente no pueden penetrar los poros de la matriz *G25*, cuya restricción del gel solo permite la entrada de moléculas con un peso molecular inferior a 5 kDa . La eficiencia de la reacción de proteólisis se puede observar en la siguiente figura [46].

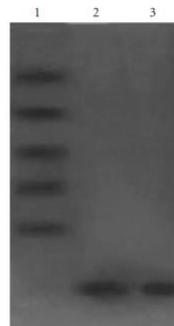


Figura 10. Electroforésis (*SDS-PAGE*), para los distintos picos de elución de la cromatografía *G25*. 1-Pico 1, 2-Pico 2, 3-Control positivo

En Figura 10, se muestran en el primer carril los subproductos no digeridos de manera eficiente, es decir, productos de la proteólisis incompleta, correspondientes a las moléculas con formas desde $2\times\text{T}\alpha 1$ hasta $6\times\text{T}\alpha 1$, las cuales tienen un tamaño molecular superior a 5 kDa , esta banda electroforética corresponde al primer pico de elución de la cromatografía por *G25 medium* y representan las moléculas que son incapaces de penetrar la matriz cromatográfica. En el segundo carril es posible observar moléculas monoméricas ($\text{T}\alpha 1$), productos de la reacción que tienen un tamaño menor a 5 kDa , esta banda electroforética corresponde

a un segundo pico eluido en la columna cromatográfica y por consiguiente su salida de la columna es retrasada por la matriz G25, lo cual implica un recorrido de mayor tortuosidad para las moléculas que sean capaces de penetrar. Por último, un tercer carril es utilizado como control positivo para la comparación del peso molecular del monómero T α 1, se trata de un péptido idéntico al monómero requerido, sintetizado por vía química [46].

En resumen, es posible optimizar el paso correspondiente a la proteólisis mediante el estudio de condiciones tales como, la concentración de hidroxilamina, temperatura de la reacción y pH. Técnicas analíticas pueden ser utilizadas para determinar la eficiencia de la proteólisis como variable dependiente, ya sea mediante la integración de las áreas de los perfiles de elución o mediante la determinación de los tamaños moleculares correspondientes a los productos de la proteólisis, a partir de la combinación de técnicas de electroforesis y cromatografía de exclusión molecular.

1.6 Purificación de péptidos recombinantes (etapa 3)

Generalmente, la industria biotecnológica requiere de procesos de purificación luego de las etapas previas de captura para que los distintos bioproductos alcancen grados de pureza requeridos. Se hace necesario en ocasiones, grados de pureza alrededor del 99,9%, lo cual se logra a partir de operaciones cromatográficas. El diseño de estas operaciones unitarias se basa en el compromiso existente entre el grado de pureza deseado y la resolución del sistema, así como de la actividad final de las biomoléculas obtenidas. Los costos asociados a la obtención de un bioproducto libre de virus y otros contaminantes por concepto de purificación cromatográfica de proteínas y péptidos, pueden constituir alrededor del 40% del costo total de producción, por lo que, estas operaciones deben ser optimizadas cuidadosamente en aras de no incurrir en diseños con factores de costos elevados [144-146].

La purificación de manera específica para proteínas y péptidos, se realiza mediante columnas cromatográficas, la operación consiste en hacer fluir una mezcla de compuestos proteicos y sus contaminantes por una columna rellena de un material sólido y poroso (fase estacionaria) inmerso en un solvente (fase móvil), y en dependencia de la relativa afinidad de los componentes de la mezcla por ambas fases, ocurre o no, la separación de dichos componentes de manera individual [147]. Se puede decir que la cromatografía es un proceso de separación que se basa de forma general en la acumulación o deposición de un soluto en una superficie. La fase estacionaria puede ser porosa o no porosa, arreglada de forma no rígida en la columna o en forma de un bloque monolítico. Estos materiales presentan diferentes propiedades fisicoquímicas que permiten separar los diferentes compuestos presentes en una mezcla, de acuerdo con las características de estos. Los solutos a separar se pueden adsorber o no al material de la matriz o fase

estacionaria, encontrándose en el primer caso las cromatografías de intercambio iónico, de interacciones hidrofóbicas o afinidad y en el segundo caso la cromatografía de exclusión molecular (CEM). Un sistema cromatográfico genérico se puede observar en la Figura 11, este se encuentra constituido fundamentalmente por una columna de plástico, vidrio o acero inoxidable donde se empaca la fase estacionaria (matriz o resina). Además de una bomba para impulsar la fase móvil (muestra que contiene el producto de interés o soluciones de trabajo) y un monitor de luz ultravioleta (UV) acoplado a un registrador en el cual se grafica la concentración a la salida de la columna contra el tiempo o volumen parametrizado del eluyente, conocido por cromatograma [148-150].

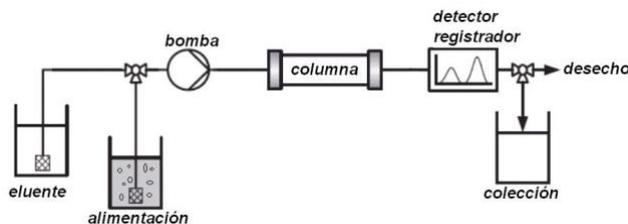


Figura 11. Sistema cromatográfico simple con sus elementos principales (Elaboración propia)

En el caso de la purificación de péptidos han sido utilizados diferentes tipos de cromatografías, las cuales varían en dependencia de la estrategia asumida durante el diseño del vector de expresión en la fermentación. De manera general, se busca facilitar las etapas de purificación mediante la adición de una etiqueta de histidina en la secuencia N-terminal de la proteína expresada, lo cual promueve la utilización de una cromatografía de afinidad mediada por Ni^{2+} con recobrados estimados de proteínas recombinante alrededor del 95%, pero que pocas veces alcanza un 90% de pureza, por lo tanto, ésta técnica cromatográfica es implementada en pasos primarios de captura o aislamiento, preferentemente cuando se obtienen las proteínas y péptidos como cuerpos de inclusión [33, 74, 108, 151].

Para obtener fracciones peptídicas de manera específica, provenientes de pasos de proteólisis, otras técnicas son utilizadas, pues se hace necesario discriminar en cuanto al peso molecular de los péptidos objetivos y los fragmentos peptídicos productos de la proteólisis incompleta [46]. Dentro de las técnicas basadas en la separación a partir del peso molecular, sobresale para la purificación de péptidos recombinantes, la cromatografía de exclusión molecular (CEM), la cual resulta eficiente en la separación de péptidos mezclados, en la eliminación de etiquetas (como la histidina) o cualquier contaminante de bajo peso molecular que esté presente en una determinada preparación peptídica [76, 152-154].

1.6.1 Cromatografía de exclusión molecular

La CEM, también llamada filtración en gel o de tamiz molecular, es una de las operaciones cromatográficas más utilizadas para la separación de proteínas y péptidos. Este tipo de cromatografía se realiza en columnas

cilíndricas rellenas con matrices inertes que se fabrican con este fin y que pueden ser de varios tipos: dextranos con enlaces cruzados (sephadex), agarosa (sepharose, Bio-gel A), poliacrilamida (Bio-gel B), etc. Todos estos geles o matrices (fase estacionaria) están constituidos por gránulos (partículas) de un material esponjoso hidratado, que contiene poros con un tamaño de diámetro determinado. La principal ventaja de la CEM es que puede realizarse en condiciones desnaturalizantes o no desnaturalizantes respecto a la mezcla peptídica y como desventaja se puede señalar la incapacidad de la propia operación para discriminar entre proteínas y péptidos modificados y no modificados estructuralmente, con tamaños moleculares similares [155].

Cuando se hace pasar una mezcla de moléculas de distinto tamaño, a través de una columna de CEM, aquellas moléculas con un tamaño mayor que el diámetro de los poros de las partículas, sólo podrán moverse en su camino, a través de la fase estacionaria, en el espacio que queda entre las partículas, y, por lo tanto, no se verán retrasadas en su descenso. En cambio, aquellas moléculas capaces de penetrar en las partículas se verán retrasadas por la fase estacionaria, en mayor medida, cuanto menor sea su tamaño. Por lo tanto, las moléculas eluyen por orden decreciente de tamaño molecular, en la Figura 12 se muestra de manera gráfica el principio de la operación [148, 149, 156].

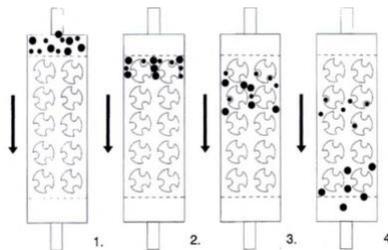


Figura 12. Principio de separación en CEM. (1) Mezcla de dos moléculas antes de entrar al sistema, (2) mezcla en el tope de la columna, (3) Comienzo de la separación, (4) Resolución o separación completa [157]

La salida de las proteínas y/o péptidos de la columna cromatográfica se detecta por absorción de la luz UV, en una longitud de onda de 280 nm, aunque se ha reportado una mayor sensibilidad al usar longitudes de onda bajas (214 o 220 nm) para la detección específica de péptidos. Los datos se registran en lo que se denomina diagrama de elución o cromatograma, e indican la posición en el tiempo de las biomoléculas separadas [150]. Un cromatograma ofrece la información básica sobre el comportamiento de un proceso de separación cromatográfico, los resultados de un cromatograma pueden ser considerados como perfiles de elución, mediante los cuales se puede determinar si la operación alcanza una eficiente resolución, el ejemplo de un cromatograma y la información brindada por el mismo se muestran a continuación [149].

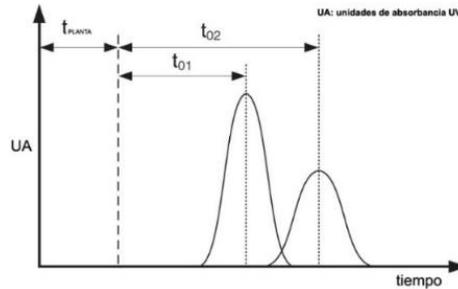


Figura 13. Cromatograma típico durante la separación de dos componentes para la determinación del tiempo de planta y los tiempos de retención [149]

En la Figura 13, el valor de t_{PLANTA} representa el tiempo muerto de la planta, el cual es posible determinar mediante la inyección y detección de un compuesto traza sin columna en el sistema. Por otra parte t_{01} y t_{02} representan los tiempos de retención para cada componente de la mezcla a separar, cuyos valores son proporcionales a la fuerza de interacción de cada componente por la matriz, todos estos valores de tiempos, pueden ser parametrizados al multiplicarlos por el valor del flujo volumétrico de operación, obteniéndose los volúmenes de elución para cada componente (v_{01} y v_{02}), así como el volumen de planta (v_{PLANTA}) [47, 149].

En aras de minimizar los errores asociados a fenómenos de resistencia a la transferencia de masa, durante el estudio de las operaciones cromatográficas, se hace necesario obtener otra información a partir de los perfiles de elución, se trata del volumen muerto de la columna (v_0), el cual es posible determinar, al inyectar al sistema (con columna incluida), un componente que no interaccione con la matriz, es decir, en el caso de CEM, un componente incapaz de penetrar los poros de la partículas que conforman la fase estacionaria. Una vez determinado el v_0 y el v_{PLANTA} , la estimación de los volúmenes de elución para los componentes individuales (v_{01} y v_{02}) adquieren un mayor rigor. Como se puede observar en la Figura 14, se pueden calcular los tiempos de retención netos (t_{01net} y t_{02net}), estos se consideran como los tiempos de retención para cada componente, donde la transferencia de masa no se limita por concepto de volúmenes muertos del sistema (tuberías, bombas) [49, 149, 150].

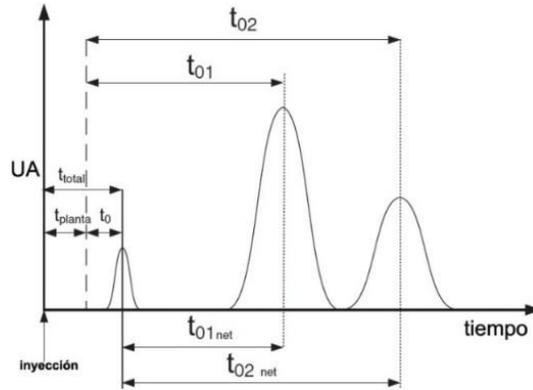


Figura 14. Cromatograma típico durante la separación de tres componentes para la determinación del volumen muerto de la columna y los tiempos de retención netos [149]

Por lo anteriormente mencionado, se puede deducir que el tiempo de retención para cualquier componente involucrado ($t_{R,i}$), depende de la geometría de la columna, así como del flujo de la fase móvil, motivo por cual algunos autores prefieren utilizar un tiempo de retención normalizado mediante una relación directa con el t_0 , el término obtenido de dicha normalización se conoce como factor de capacidad o factor de retención (k'_i), donde el subíndice i representa un componente individual de la mezcla y se define de la siguiente manera:

$$k'_i = \frac{t_{R,i} - t_0}{t_0} \quad \text{ecuación 1}$$

Todo proceso cromatográfico tiene el objetivo de separar un compuesto en específico de una mezcla determinada, por lo que, la distancia entre los máximos de los picos de dos o más componentes es de gran importancia. La habilidad del sistema para separar dos picos o la selectividad de la separación (α) de dos componentes es determinada dividiendo sus factores de retención según la siguiente relación.

$$\alpha = \frac{k'_j}{k'_i} = \frac{t_{R,j} - t_0}{t_{R,i} - t_0} \quad \text{ecuación 2}$$

Por convención, el compuesto más retenido se ubica en el denominador y el menos retenido en el numerador, por tanto la selectividad de dos compuestos que se encuentren separados es mayor que la unidad ($\alpha > 1$), la selectividad α , es también llamada factor de separación, y puede ser tomado como un indicativo de la eficiencia cromatográfica del mismo [146, 148, 149, 158].

1.6.2 Eficiencia de la operación cromatográfica

Uno de los parámetros que se utiliza para caracterizar un proceso de separación cromatográfica es el número de platos teóricos (N), también conocido como eficiencia de la columna. De este parámetro se deriva el concepto de altura equivalente de un plato teórico ($HETP$, de sus siglas en inglés), el cual es muy utilizado

en la ingeniería química y ha sido adaptado para múltiples operaciones unitarias como una medida de la transferencia de masa ideal en lechos empacados, en la siguiente ecuación, L_c representa la longitud de la columna [47, 149].

$$HETP = \frac{L_c}{N} \quad \text{ecuación 3}$$

En cromatografía, el valor de $HETP$ es una medida que agrupa la contribución de las no idealidades de la dinámica del fluido al ensanchamiento de los picos. Se define como la relación de incremento de la gaussiana de un pico (σ) por unidad de longitud (z) de la columna [148, 149, 159, 160].

$$HETP = \frac{\partial \sigma_z^2}{\partial z} = \frac{\sigma_z^2}{L_c} \quad \text{ecuación 4}$$

Cuando la eficiencia de una columna (N) es alta, la forma de los picos se acerca al perfil de elución rectangular correspondiente a un cromatograma ideal y a un pico más estrecho. Debido a los fenómenos de no idealidades de la transferencia de masa y de la dinámica de los fluidos, los picos tienen una eficiencia limitada. Un pico estrecho resulta en una buena resolución, volúmenes de elución pequeños y por lo tanto, altas concentraciones a la salida de la columna, todo esto es favorable en la cromatografía. Para la determinación cuantitativa de la eficiencia de una columna (N), pequeñas cantidades de un compuesto que se retenga son inyectadas y se calcula la eficiencia mediante el cromatograma resultante. En la práctica, para fases estacionarias de alta eficiencia con picos simétricos, la eficiencia N para un componente i , puede ser calculada utilizando el ancho (w) del pico gaussiano resultante de un cromatograma en el tiempo, según la siguiente ecuación.

$$N_i = \left(\frac{t_R}{\sigma_t}\right)^2 = \left(\frac{t_{R,i}}{w_i}\right)^2 \quad \text{ecuación 5}$$

La influencia de diferentes parámetros de la transferencia de masa sobre la N se encuentra expresado en la ecuación de *Van Deemter* (ecuación 6), normalizada como una curva de $HETP$ como se muestra en la Figura 15.

$$HETP = A_i + B_i u_{int} + \frac{C_i}{u_{int}} \quad \text{ecuación 6}$$

Esta ecuación muestra la dependencia del valor de $HETP$ de la velocidad de la fase móvil (u_{int}), la cual se puede definir como velocidad intersticial. Los tres términos de la ecuación describen los diferentes efectos que se deben tener en cuenta al estudiar una fase estacionaria a emplear en una cromatografía determinada. La resistencia a la transferencia de masa de un soluto en la superficie de la fase estacionaria es un factor que contribuye al ensanchamiento del pico y por ende a la disminución de la eficiencia cromatográfica. Conforme la fase móvil se mueva más rápidamente a través de la columna y más lenta sea la transferencia

de masa, más ancho será el pico de elución. De manera general la ecuación de *Van Deemter* adopta la siguiente forma, mostrada en la Figura 15 [45, 47, 149, 161].

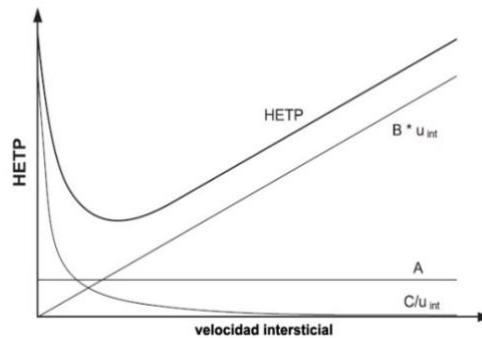


Figura 15. Relación de HEPT y la velocidad intersticial, representativo de la ecuación de *Van Deemter* [149]

El primer término (A_i) es casi siempre constante para todo el intervalo de velocidades, principalmente gobernado por el fenómeno de difusión de *Eddy*, como consecuencia de imperfecciones en el empaque y de fases estacionarias con una distribución no uniforme del tamaño de partículas. El valor absoluto del término A_i es proporcional al diámetro de partícula promedio, por lo que *HETP* puede ser disminuida para asegurar una mayor eficiencia N , usando fases estacionarias con diámetros de partículas pequeños y mediante un correcto protocolo de empaque de la columna.

En el segundo término ($B_i u_{int}$) se encuentra resumido el aumento lineal de *HEPT* a altas velocidades, causado por el incremento de la resistencia a la transferencia de masa a altas velocidades. La resistencia a la transferencia de masa como tal, especialmente dentro del poro, es independiente casi en su totalidad de la velocidad del fluido, sin embargo, si la velocidad del fluido aumenta, se hace dependiente de la relación entre el transporte convectivo axial en la fase móvil de la columna y el transporte de masa hacia y en la fase estacionaria. La pendiente del término $B_i u_{int}$ depende de la naturaleza del material de empaque, mientras más optimizado esté la fase estacionaria en términos de accesibilidad al poro y menor longitud del poro para la difusión, menor será la pendiente del término y mayor la eficiencia de la columna (N) a mayores velocidades de la fase móvil.

Por otra parte, el tercer término (C_i / u_{int}), representa la influencia de la difusión axial de las moléculas de soluto en la fase móvil, solo puede ser observado en los sistemas cromatográficos donde se emplean grandes diámetros de columna a muy bajos flujos. En la mayoría de los casos este puede ser desestimado cuando la u_{int} es elevada. Como la difusión longitudinal depende del coeficiente de difusión del soluto, esta puede afectarse cambiando la composición de la fase móvil. Para obtener altos coeficientes de difusión, los

solventes a emplear deben tener baja viscosidad lo que a su vez conllevaría a trabajar con menor presión en la columna, lo cual es favorable [47, 146, 149, 158].

En resumen, mediante la obtención de la gráfica de *Van Deemter* para determinado componente, es posible establecer un compromiso entre eficiencia cromatográfica N y la velocidad de operación, para esto se hace necesario estimar la u_{int} óptima, correspondiente a un mínimo valor de $HETP$, lo cual se traduce en un valor máximo de N . No obstante, a pesar de la importancia de la información brindada de un estudio de la N y su relación directa con u_{int} desde un punto de vista operacional, se puede plantear que este no ofrece una descripción rigurosa del comportamiento fenomenológico de una operación cromatográfica, lo cual nos plantea la necesidad de estudiar a profundidad los fenómenos de transferencia de masa involucrados para este tipo de operaciones.

1.6.3 Principios de transferencia de masa en operaciones cromatográficas

La mayoría de los procesos que contienen operaciones cromatográficas usan matrices o fases estacionarias en forma de partículas que tienen estructuras porosas bien definidas, debido a la gran accesibilidad que presentan estos materiales comparados con los no porosos.

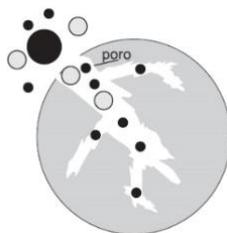


Figura 16. Partícula porosa de una matriz cromatográfica [149]

La accesibilidad, así como la acumulación del compuesto de interés en la superficie interior de estos poros tiene una gran influencia en la eficiencia de la separación (N) (ver Figura 16). Los factores que contribuyen a los efectos de ensanchamiento de los picos (pérdida de N) relacionados a la transferencia de masa y a la dispersión axial son, (i) el transporte convectivo y difusivo hacia la partícula, (ii) difusión de la película, (iii) difusión en el poro y en la superficie, (iv) cinética de adsorción y desorción (en caso de que exista).

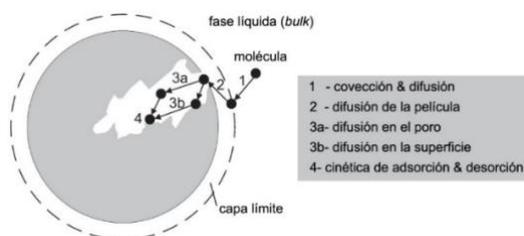


Figura 17. Factores del transporte de materia en la cromatografía líquida

En la Figura 17 se muestran los factores o pasos que influyen directamente en el fenómeno de transferencia de masa desde la fase líquida al interior de la partícula que compone la fase estacionaria, en el caso específico de la CEM el paso 4 no es considerado como determinante en el proceso de separación, debido a que en este tipo de operación cromatográfica la separación de un soluto no es regida por la unión a la fase estacionaria, ya que esta se basa exclusivamente en la separación por tamaños y formas moleculares mediante la difusión intraparticular, de manera específica la CEM se basa fundamentalmente, en la separación de moléculas en la difusión a través de los macroporos [49, 147, 149, 162].

La mayoría de las fases estacionarias comerciales consisten en pequeñas estructuras microporosas formadas en gránulos o partículas macroporosas. Las moléculas de interés o solutos, son transportados a lo largo de la columna por la fase móvil (fase líquida) hacia la superficie externa de la partícula, para luego difundirse dentro de la misma. Dentro de la partícula existen dos tipos de fenómenos de difusión que contribuyen a la resistencia de transferencia de masa, la difusión a través de los macroporos y la difusión a través de los microporos. La importancia relativa de la resistencia de difusión depende de la distribución de tamaño de poro dentro de la partícula, los microporos se consideran que tienen un diámetro menor a los 2 nm y los macroporos superan los 50 nm. Dentro un poro se pueden distinguir tres diferentes tipos de mecanismos de difusión, (i) difusión molecular, que resulta significativa en poros grandes y bajo altas presiones, en este caso, los efectos de colisión moléculas-moléculas son predominantes en comparación a la colisión molécula-pared, pero comparado con la difusión molecular en la fase líquida (interparticular) es mucho menor, (ii) difusión de *Knudsen*, se torna predominante cuando la trayectoria libre media de las moléculas es mayor que el diámetro del poro y por tanto los efectos de las colisiones molécula-pared son importantes, algunos autores prefieren descartar este efecto cuando se trata de operaciones cromatográficas en fase líquida, (iii) difusión superficial, que se tiene en cuenta cuando las moléculas son capaces de adsorberse en la pared del poro, el mecanismo resulta dominante para los microporos y para especies capaces de interactuar fuertemente con la superficie (ejemplo, sitios de adsorción) [47, 146].

Todos los factores que intervienen en la transferencia de masa dependen directamente de la difusividad molecular, excepto los relacionados a la cinética de adsorción-desorción. Es por eso, que se requiere estudiar la difusión en fases líquidas y medios porosos para el real entendimiento de las operaciones cromatográficas [146].

Como se puede observar, la optimización de operaciones cromatográficas en la industria farmacéutica y biotecnológica resulta ser una tarea difícil, pero fundamental, si se tiene en cuenta que la optimización puramente empírica es altamente costosa e incapaz de describir un comportamiento dinámico del sistema,

una alternativa para esta tarea la constituye la modelación matemática, la cual se considera esencial para propósitos similares [47, 49, 149, 162] [54], [56], [181], [194].

1.6.4 Modelos fenomenológicos de transporte en cromatografía

Existen varios enfoques para modelar curvas de elución (perfiles cromatográficos) en operaciones cromatográficas, sin embargo, dos de ellos se han usado con más frecuencia, se trata del modelo de platos teóricos (PM, del inglés *plate model*) y el modelo general (GRM, del inglés *general rate model*). Ambos modelos han sido aplicados a los estudios de aspectos fenomenológicos de los sistemas durante la optimización de la separación de mezclas de proteínas, mediante la descripción de la interacción de la proteína con la fase estacionaria. A pesar de que ambos modelos tienen la capacidad de describir desde un punto de vista fenomenológico la operación, se puede decir que el PM tiene limitaciones durante su implementación, pues se necesitan grandes cantidades de soluto para los ensayos experimentales, lo cual es desfavorable cuando la molécula de interés se encuentra en desarrollo y solo se obtienen pequeñas cantidades en soluciones diluidas. Por otro lado, el GRM es el modelo más completo y exhibe una mayor versatilidad ya que permite describir y simular procesos cromatográficos en condiciones variables de carga de la molécula de interés (cantidad de molécula por unidad de la fase estacionaria). Esta versatilidad se debe a que este modelo está basado en fenómenos de transferencia de momento y masa que ocurren en el interior de la partícula (fase estacionaria) y en la fase móvil [47, 50, 163, 164].

1.6.4.1 Modelo general (GRM)

El GRM para modelar y simular separaciones cromatográficas fue descrito por Gu [47]. Este modelo matemático ofrece varias ventajas porque se basa en principios fundamentales de transferencia de materia. Es capaz de predecir fenómenos de interacción entre proteínas, así como el efecto de diferentes condiciones de proceso y propiedades de las fases estacionarias sobre la separación de proteínas. Para cada componente de una mezcla (proteínas, péptidos, sales u otros reactivos) el modelo consiste en un conjunto de dos ecuaciones diferenciales parciales (PDE) que describen el movimiento de las proteínas y el desplazador (fase móvil) a través del lecho y dentro de las partículas de la fase estacionaria [50, 149, 165].

El GRM generalmente se formula y resuelve considerando varios supuestos y condiciones: la columna es isotérmica, la dispersión radial es insignificante en el lecho (sin gradientes de concentración en la dirección radial), las partículas de la fase estacionaria son esferas de radios constantes (R_p); las porosidades del lecho (ϵ_b) y las partículas (ϵ_p) son constantes, en la entrada de la columna el flujo de dispersión es igual al flujo de masa de entrada y en la columna el flujo de dispersión de proteínas de salida es nulo, la distribución de los diferentes compuestos dentro de las partículas es simétrica, y en la superficie de las partículas, el flujo

difusional (hacia y desde) el interior de la partícula es igual al flujo de transferencia de masa de la fase móvil, antes de cargar la muestra, el sistema no contiene proteínas y el lecho ha sido previamente equilibrado con un tampón que tiene propiedades específicas [50, 166].

Con los requerimientos asumidos, anteriormente mencionados, las siguientes ecuaciones fundamentales pueden ser formuladas partiendo del balance de masa diferencial para un soluto en la fase móvil. El balance de materia se aplica a cada uno de los componentes en la mezcla como un elemento diferencial de longitud de columna, dando lugar a:

$$-D_{Li} \frac{\partial^2 C_{bi}}{\partial Z^2} + v \frac{\partial C_{bi}}{\partial Z} + \frac{\partial C_{bi}}{\partial t} + \frac{3k_i(1-\varepsilon_b)}{\varepsilon_b R_p} (C_{bi} - C_{pi,R=R_p}) = 0 \quad \text{ecuación 7}$$

En la ecuación 7, el primer y segundo término representa el transporte de proteína por dispersión axial y flujo convectivo, respectivamente. El último término de la ecuación 7 es el flujo de transferencia de masa desde la fase móvil hacia la interfase de la partícula de la fase estacionaria, donde k_i es el coeficiente de transferencia de masa para la proteína i . Dentro de las partículas (ecuación 8), las proteínas están en solución (C_{pi}) o adsorbidas en la superficie de la partícula (C_{pi}^*), este último caso solo tiene lugar cuando se trata de cromatografías adsorptivas. La ecuación diferencial parcial para las proteínas dentro de la partícula se muestra a continuación:

$$(1 - \varepsilon_p) \frac{\partial C_{pi}^*}{\partial t} + \varepsilon_p \frac{\partial C_{pi}}{\partial t} - \varepsilon_p D_{pi} \left[\frac{1}{R^2} \frac{\partial}{\partial R} \left(R^2 \frac{\partial C_{pi}}{\partial R} \right) \right] = 0 \quad \text{ecuación 8}$$

La acumulación de proteínas dentro de las partículas de la fase estacionaria se debe a cualquier diferencia entre la difusión del componente a través de la fase líquida estancada. En el caso de componentes capaces de penetrar hacia las partículas, donde se asume que no existen interacciones con la fase estacionaria, algunos autores no consideran el primer término de la ecuación 8, por lo tanto, para CEM, el balance de materia dentro de la partícula se plantea según se describe en la ecuación 9.

$$\frac{\partial C_{pi}}{\partial t} - D_{pi} \left[\frac{1}{R^2} \frac{\partial}{\partial R} \left(R^2 \frac{\partial C_{pi}}{\partial R} \right) \right] = 0 \quad \text{ecuación 9}$$

Donde D_{pi} es el coeficiente efectivo de difusión de poros y R constituye la posición radial dentro de la partícula. El uso de variables adimensionales simplifica la resolución del modelo y también reduce el número de agrupación de parámetros, permitiendo su comparación bajo diferentes condiciones operativas [54], [57], [198]. Con los requerimientos asumidos previamente y determinadas condiciones iniciales y de contorno para un sistema cilíndrico, se introducen las siguientes variables.

$$z = Z/L, \tau = vt/L, r = R/R_p, c_b = C_b/C_0, c_p = C_p/C_0 \quad \text{ecuación 10}$$

Con la introducción de estos términos adimensionales el sistema de ecuaciones diferenciales para el GRM (ecuaciones 7 y 8) se reescriben de la siguiente forma.

$$-\frac{1}{Pe_{Li}} \frac{\partial^2 c_{bi}}{\partial z^2} + \frac{\partial c_{bi}}{\partial z} + \frac{\partial c_{bi}}{\partial \tau} + \xi_i (c_{bi} - c_{pi,r=1}) = 0 \quad \text{ecuación 11}$$

$$\frac{\partial}{\partial \tau} [(1 - \varepsilon_p) c_{pi}^* + \varepsilon_p c_{pi}] - \eta_i \left[\frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial c_{pi}}{\partial r} \right) \right] = 0 \quad \text{ecuación 12}$$

Donde el número de Peclet $Pe_{Li} (= vL/D_{Li})$, $\eta_i = \varepsilon_p D_{pi} L / (R_p^2 v)$, $\xi_i = 3Bi_i \eta_i (1 - \varepsilon_b) / \varepsilon_b$, y el número de Biot $Bi (= k_i R_p / \varepsilon_p D_{pi})$ están presentes. En el caso de componentes capaces de penetrar hacia las partículas, donde se asume que no existen interacciones con la fase estacionaria, como es el caso de la CEM, el balance de materia dentro de la partícula planteado en la ecuación 12 se puede reescribir como se muestra a continuación.

$$\frac{\partial c_{pi}}{\partial \tau} = \frac{\eta_i}{\varepsilon_p} \left[\frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial c_{pi}}{\partial r} \right) \right] \quad \text{ecuación 13}$$

Los sistemas de ecuaciones parciales resultantes del GRM pueden ser resueltos numéricamente utilizando Matlab® (*The MathWorks, Inc., MA, USA*) en una computadora personal. El elemento finito (con elementos cuadráticos) y los métodos de colocación ortogonal a menudo se usan para discretizar las ecuaciones diferenciales de fase parcial y de fase de partículas, respectivamente [47, 49, 149, 166].

A pesar de las pocas correlaciones para estimar los parámetros de transferencia de masa en los procesos cromatográficos, los modelos matemáticos constituyen una herramienta que permitiría definir condiciones operativas en aras de reducir el costo asociado en experimentos de prueba y error. Los métodos numéricos combinados con la alta capacidad de cómputo de ordenadores relativamente económicos permiten resolver modelos complejos como el GRM en segundos o minutos. La mayoría de los estudios informados usan proteínas modelos para describir mezclas complejas para validar las predicciones de modelos matemáticos. Las predicciones a través de modelos matemáticos podrían aplicarse para el diseño de matrices cromatográficas, modificaciones de proteínas y el escalado de los procesos cromatográficos. Pocos trabajos se han llevado a cabo en este aspecto, principalmente debido a la falta de información relacionada con los parámetros de proteínas novedosas y sus contaminantes [47, 50].

1.6.4.2 Modelo general (GRM) para CEM

Para el caso de la CEM, existen pocas aplicaciones del GRM descritas en la literatura [50], al respecto, Li y colaboradores utilizaron el GRM para predecir el escalado de columnas a escala preparativa para la separación de proteínas. En este trabajo se estudiaron los parámetros D_{Pi} y R_p . Los resultados confirmaron una buena predicción de la operación escalada de acuerdo con los tiempos de retención y forma de los picos en eluciones de proteínas, como se puede observar en la Figura 18.

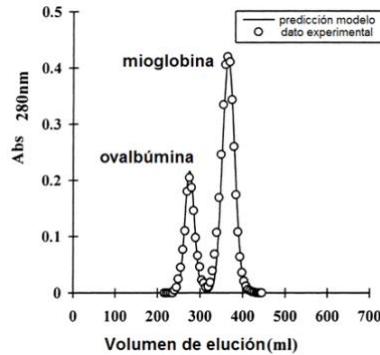


Figura 18. Comparación entre perfil experimental y simulado para una columna grande (5 x 42 cm)

La influencia de D_{Pi} sobre el ensanchamiento de los picos de elución viene dada por su propia definición y su relación directa con la resistencia a la transferencia de masa, como se muestra en la ecuación 14.

$$D_{Pi} = \frac{D_m}{\tau_{tor}} (1 - 2,104\lambda + 2,09\lambda^3 - 0,95\lambda^5) \quad \text{ecuación 14}$$

Donde D_m es la difusividad molecular, τ_{tor} es la tortuosidad de poro y λ representa la relación entre el diámetro molecular del soluto con el diámetro de poro.

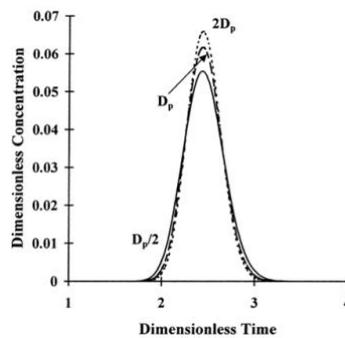


Figura 19. Efecto de D_{Pi} sobre los perfiles de elución

Los resultados obtenidos por los autores son representativos de la propia definición del parámetro Bi ($= k_i R_p / \varepsilon_p D_{Pi}$), en la Figura 19 se muestra como D_{Pi} influye en la forma y ancho de los picos, con impacto en la resolución del sistema. La misma definición del término adimensional Bi puede ser utilizada para el análisis de la influencia de R_p en la resolución del sistema, como se observa a continuación, en la Figura 20.

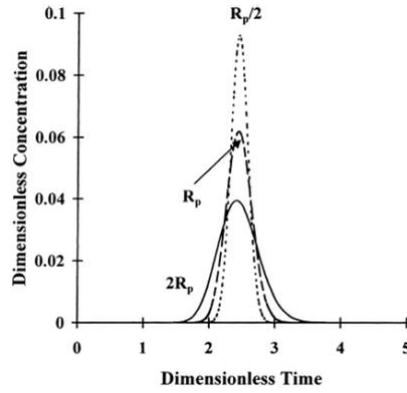


Figura 20. Efecto de R_p sobre los perfiles de elución

El R_p en CEM es un factor muy importante que afecta el ensanchamiento de los picos. En la Figura 20 se puede observar que a valores pequeños de R_p se forman picos afilados que brindan una mejor resolución del sistema. El pico correspondiente a $R_p/2$ significa que este fue calculado usando valores de parámetros adimensionales (Peclet, Biot, η) que reflejan una reducción del 50% en el radio de partícula. La desventaja de un pequeño tamaño de partícula es que aumenta la presión en la columna, lo cual puede resultar en una excesiva compresión de la cama.

Otro trabajo que utiliza el GRM para predecir el comportamiento de proteínas en CEM fue realizado por Pavlov y colaboradores [48], para las simulaciones se utilizó una mezcla de dextrana, BSA y fenilalanina para demostrar el cambio de la resolución del sistema con los parámetros R_p y la velocidad (v), los resultados obtenidos son consistentes con la literatura, pues, la disminución del R_p y la velocidad (v) impactan de manera positiva en la resolución cromatográfica.

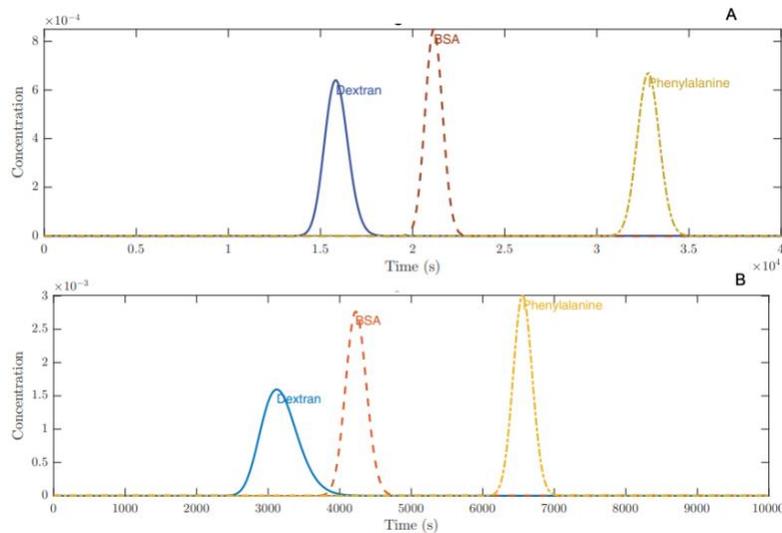


Figura 21. Perfiles de elución a velocidad de 0,01 cm/s (A) y a velocidad de 0,05 cm/s (B), para $R_p = 45\mu\text{m}$

La velocidad (v) es considerada un factor importante en la CEM, esta tendencia se justifica principalmente debido a la influencia que tiene este parámetro sobre la resistencia a la transferencia de masa según la ecuación de *Van Deemter* mostrada anteriormente.

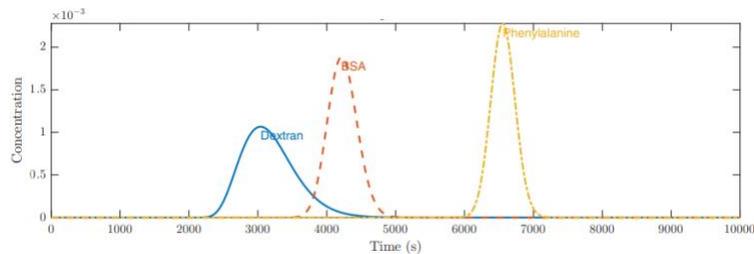


Figura 22. Perfil de elución a velocidad de 0,05 cm/s, para $R_p = 70 \mu\text{m}$

Los resultados obtenidos en este trabajo al aumentar el tamaño de la partícula coinciden con los resultados de GRM anteriores según la Figura 22. Esto además, es consecuente con lo descrito en la literatura y se ajusta al comportamiento esperado según la teoría de *Van Deemter*, donde se conoce que es preciso disminuir R_p para asegurar un mayor valor de HPTE y por consiguiente una mejor resolución cromatográfica [47, 48, 146].

El desarrollo de un modelo fenomenológico dinámico para la purificación de un candidato terapéutico novedoso, que permita predecir el comportamiento de la operación cromatográfica a distintas escalas, constituye una herramienta útil y práctica en aras de diseñar escalas productivas de dimensiones deseadas. Los resultados obtenidos durante la modelación pueden ser introducidos en los pertinentes análisis de balance de masa y energía, de esta manera los indicadores económicos dependientes de esta operación pueden ser estimados con mayor rigor.

1.7 Simulación técnica-económica del proceso

Los simuladores de procesos ofrecen la oportunidad de acortar el tiempo requerido para el desarrollo de procesos. También permiten la comparación ordenada para que varias alternativas de proceso puedan sintetizarse y analizarse interactivamente en poco tiempo. La simulación de las distintas operaciones de un determinado proceso también permite el estudio de las interacciones que existen entre las etapas de *upstream* y *downstream* [44].

En este contexto, la herramienta SuperPro Designer (*Intelligen Inc., Scotch Plains, NJ*) ha sido utilizada para realizar simulaciones de procesos, balances de masa & energía y análisis de costos. Los datos de proceso a escala de laboratorio pueden ser utilizados en esta plataforma computacional como datos iniciales para simular plantas biotecnológicas durante la fabricación de biofármacos [51]. La estrategia comúnmente utilizada para estos análisis en Superpro Designer consiste en la comparación de parámetros tecnológicos

y económicos entre dos o más escenarios productivos, donde uno de estos escenarios se denomina “proceso de referencia” [86].

Según la FDA, en la actualidad, los medicamentos que se utilizan para el tratamiento de patologías asociadas a la inflamación crónica son biomoléculas que corresponden a anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpos [7]. Por lo tanto, una estrategia coherente de simulación, para el caso de un péptido candidato anti-TNF, puede estar constituida por un proceso de referencia basado en la producción genérica de anticuerpos monoclonales, este proceso de referencia puede ser tomado de la información brindada por el mismo programa, el cual dispone en su biblioteca de diversas plantillas de procesos productivos genéricos actualizados, entre los que se encuentra la producción de anticuerpos monoclonales [167].

Basado en el marco teórico expuesto, se procederá experimentalmente según se detalla a continuación.

2. Materiales y métodos

En la Figura 23 se muestra un esquema resumen de la metodología a utilizar en esta investigación, la cual se divide en 4 acápites.

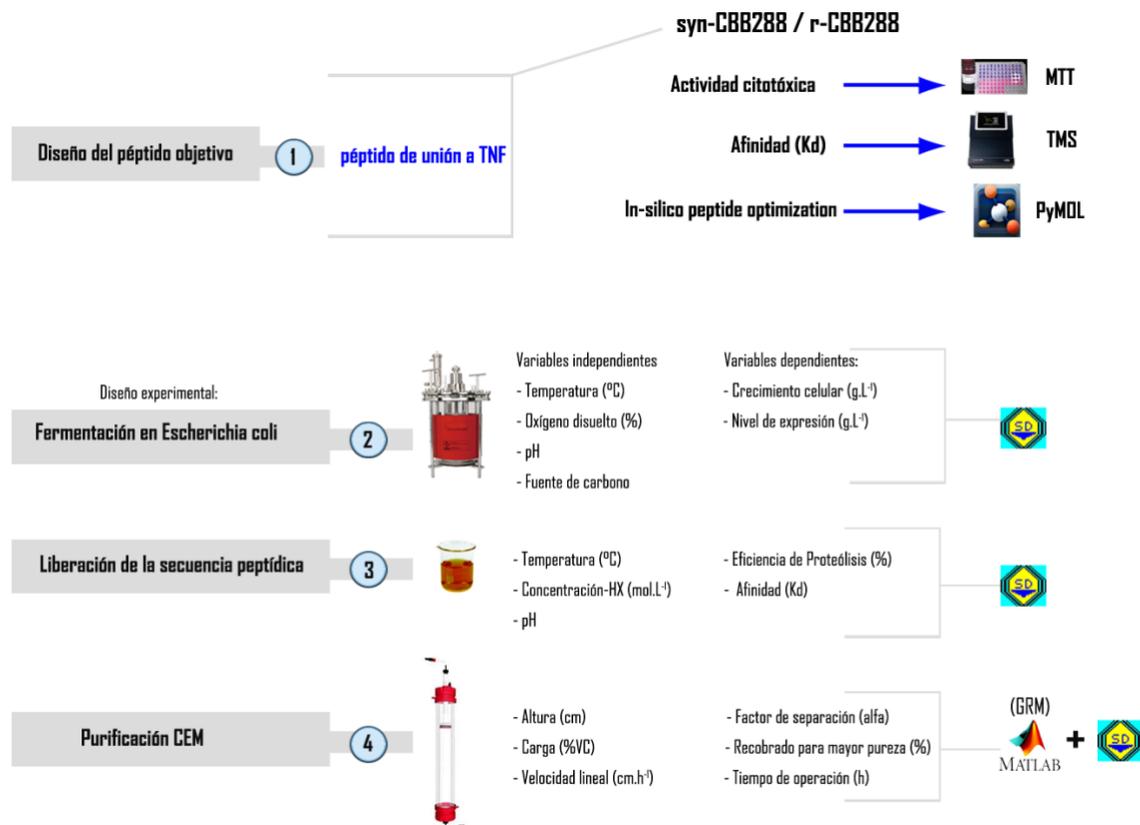


Figura 23. Esquema resumen de la metodología experimental (Elaboración propia)

En el acápite 1, el péptido CBB288 será sintetizado por la empresa *GenScript*. El péptido resultante (syn-CBB288) será analizado a partir de ensayos MTT, para demostrar que la estructura peptídica diseñada bloquea la actividad citotóxica del TNF en una línea celular L929, la cual es susceptible a la presencia de TNF [60]. Una vez demostrada la capacidad bloqueadora de la actividad citotóxica del TNF *in vitro*, se evaluarán mediante ensayos de TMS las respectivas Kd para cuantificar la afinidad del prototipo sintético hacia la diana molecular TNF. Como último criterio de funcionabilidad, se tendrán en cuenta los resultados de un estudio de dinámica molecular ejecutado en PyMOL para inferir distintos niveles de afinidad [168]. En el acápite 2, se utilizará una metodología de diseño experimental para establecer el proceso fermentativo del tándem multimérico, los resultados de este acápite se introducirán en SPD para simular la operación a una escala operativa requerida. La misma metodología será aplicada en el acápite 3 para obtener la secuencia peptídica de interés (CBB288), en este caso mediante una operación de proteólisis química, igualmente la operación será simulada en SPD. En el acápite 4, se estudiará la CEM, a partir de los parámetros de operación descritos en la Figura 23, utilizando, en una primera instancia metodología de

diseño experimental. Los resultados del diseño experimental se usarán como información primaria para desarrollar un modelo fenomenológico (GRM), que nos permitirá describir el comportamiento de la operación cromatográfica e inferir perfiles de elución a distintas escalas productivas. Esta operación también será simulada en SPD y anexada al resto de las operaciones, para un estudio de prefactibilidad técnico-económico. Cualquier resultado derivado de la metodología propuesta, solo se tomará en cuenta una vez que el producto peptídico final sea evaluado a partir de los ensayos analíticos descritos en el objetivo 1.

2.1 Diseño y síntesis del prototipo syn-CBB288

El péptido identificado mediante PD para el bloqueo de TNF serán sintetizado por vía química en la empresa *GenScript*. Para validar que la lógica racional utilizada en el diseño ofrece potencialidades para el uso terapéutico propuesto, el syn-CBB288 será caracterizado mediante los siguientes ensayos *in vitro*.

2.1.1 Evaluación de la actividad bloqueadora de TNF mediante ensayo de MTT

Células L929 [60] serán sembradas en una placa de 96 pocillos a densidad de 2×10^4 células/pocillo y cultivadas en RPMI-1640 con suero bovino fetal (FBS) al 10%, 1% de estreptomycin y 1% de penicilina, con 5% de CO₂ a 37°C. Luego de 24 horas, el medio de cultivo será removido y reemplazado por medio con Actinomicina D a una concentración de $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $25 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ de TNF y diferentes concentraciones de péptido. Luego de 20 horas, se determinará viabilidad celular mediante ensayo MTT, para esto el medio será reemplazado por 100 μL RPMI y se añadirán 10 μL de MTT $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ por pocillo. Después de 4 horas de incubación a 37°C, 75 μL de sobrenadante serán removidos y se añadirán 100 μL de DMSO por pocillo y se incubará a 37°C hasta disolver los cristales de formazán. Se registrará densidad óptica (DO) a 540 nm, los resultados se expresarán como porcentaje de viabilidad calculado según la siguiente relación [24].

$$\%viabilidad = \frac{DO_{muestras}}{DO_{control}} * 100 \quad \text{ecuación 16}$$

Donde, $DO_{muestras}$ representa los resultados para ensayos con muestras de péptidos y $DO_{control}$ representa ensayos de control, en los cuales no se añaden péptidos a los pocillos.

2.1.2 Determinación de la K_D mediante Termoforesis en Microescala TMS)

Para el estudio de la interacción, la biomoléculas diana TNF será marcada con la sonda fluorescente NT-647 (*NanoTemper Technology*). Para los análisis se utilizarán concentraciones constantes ($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) de TNF marcado y se enfrentará a soluciones de concentraciones variables de los péptidos preparadas por diluciones seriadas, se utilizará como solución de interacción Tris-HCl $0,05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ a pH 7,4, NaCl $0,150$

mol.L⁻¹, MgCl₂ 0,010 mol.L⁻¹ y 0,05% de Tween-20. Luego de 5 minutos de incubación, las muestras preparadas serán puestas en capilares de vidrio hidrofílicos y se procederá a realizar las mediciones en el equipo Monolith NT.115 [23]. El análisis de los datos y el cálculo de la K_d para cada interacción se realizarán utilizando el programa del equipo. Estos ensayos se realizarán por triplicado.

2.1.3 Optimización de péptidos CBB288 *in-silico*

Como estructuras iniciales para los ligandos, se utilizaron las coordenadas atómicas de la posición de acoplamiento CBB288 (obtenidas a partir de la optimización de péptidos *in silico*) y la versión modificada del péptido r-CBB288 (G-CBB288-GN) modelada con PyMOL [168]. Para el receptor, se utilizó una estructura de dímero TNF α , el script MMPBSA.py.MPI [169] de la suite AMBER20 [170] realiza la estimación de la energía libre de unión ($\Delta G_{\text{binding}}$) basada en esta estrategia de punto final [171]. Los parámetros, las topologías, el sistema inicial de los complejos proteína-péptido y sus componentes individuales se procesaron con *tleap* utilizando el campo de fuerza Amberff14SB [171]. El modelo de solvatación implícita PBradii mbondi3 [171] se definió para el solvente continuo. Se incorporaron los puentes disulfuro presentes en el TNF α dimérico (C64-C96, C216-C248). Los sistemas solvatados utilizaron el modelo de agua TIP3P [172], con relleno de caja de 12,0 Å del complejo y neutralizado con iones de NaCl. Para los parámetros generales, se utilizó un paso de tiempo de integración de 2 fs y el algoritmo SHAKE [173] para imponer restricciones sobre los enlaces H. Para el tratamiento de interacciones de largo alcance, se aplicó el método Ewald de malla de partículas con un corte de 8,0 Å. El protocolo de simulación fue el siguiente: (i) Minimización de la energía del sistema. 2000 pasos (1000 descenso más empinado, 1000 gradiente conjugado). Restricciones armónicas débiles aplicadas en el complejo (2,0 kcal/mol*Å²). (ii) Sistema de calentamiento a 298 K en conjunto NVT por 10 ps. Dinámica de Langevin con índice de frecuencia de colisión de 2,0 ps⁻¹. Restricciones armónicas débiles en el complejo (2,0 kcal/mol Å²). (iii) Equilibrio de densidad del sistema en conjunto NPT a 1,0 atm durante 50 ps. Escalado de posición isotrópica usando barostato Berendsen con tiempo de relajación de presión de 2,0 ps. Restricciones armónicas débiles en el complejo. (iv) Sistema de equilibrio sin restricciones en conjunto NPT a 1,0 atm y 298 K para 500 ps. (v) Corrida de producción. 20 réplicas de 5 ns en conjunto NPT a 1,0 atm y 298 K (100 ns de simulación agregada). (vi) Cálculo de MM-PB (GB) SA para 20 réplicas con 400 instantáneas como muestra (extraído de 2-5 ns). El componente entrópico no se incorporó al cálculo. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de Mann-Whitney [174] para dos muestras independientes, al 95% de confianza con n=20 réplicas.

2.2 Metodología experimental para el proceso recombinante del CBB288

2.2.1 Proceso fermentativo con *Escherichia coli*

Para el diseño experimental de esta etapa, se seleccionarán como factores de entradas: la temperatura de operación, el pH y el nivel de OD. Los distintos intervalos de escrutinio, así como las unidades de trabajo se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Factores de entrada para el estudio de la fermentación microbiana

Factores	Intervalos	Unidades	Referencias
Temperatura de operación	32 - 42	°C	[103-105]
pH	5 - 7	-	[44, 101, 102]
OD	20 - 30	%	[101, 104]

Para el procesamiento de la información, se utilizará el programa Statgraphics Centurion XVI versión 16.1.18. La base del diseño experimental será del tipo cribado, para estudiar las posibles interacciones entre los distintos factores de entrada y la influencia de estos sobre las variables respuestas seleccionadas.

Tabla 2. Variables respuestas seleccionadas para el diseño experimental en fermentación microbiana

Respuesta	Unidades	Referencia
Concentración celular	g.L ⁻¹	[29, 100, 101]
Expresión	%	

Para un diseño base de tipo cribado factorial 2³, agrupado y aleatorizado en 2 bloques, el programa planifica la ejecución de 18 corridas experimentales que incluyen 2 puntos centrales, las corridas experimentales se organizan en la Tabla 3.

Tabla 3. Corridas experimentales planificadas para la fermentación microbiana

No. experimento	Temperatura (°C)	pH	OD (%)
1	37.0	6	25.0
2	37.0	6	25.0
3	32.0	5	20.0
4	42.0	7	30.0
5	32.0	5	30.0
6	32.0	7	20.0

7	32.0	7	30.0
8	42.0	5	20.0
9	42.0	5	30.0
10	42.0	7	30.0
11	42.0	7	20.0
12	32.0	7	30.0
13	32.0	7	20.0
14	42.0	7	20.0
15	32.0	5	30.0
16	42.0	5	30.0
17	32.0	5	20.0
18	42.0	5	20.0

Una vez realizadas las corridas experimentales e introducidas las variables respuestas correspondientes, la función de optimización de respuesta múltiple (ORM) será utilizada para obtener la superficie de respuesta estimada y la combinación de factores de entrada que garanticen valores máximos (*función deseabilidad*) de las variables respuestas para el intervalo de operación estudiado.

Para realizar los experimentos, se utilizará una metodología similar a la propuesta por Li y colaboradores [122], Espinosa Pérez y colaboradores [130] y Hebbi y colaboradores [44]. Se emplearán erlenmeyes de 1 L con 100 mL de medio LB para la fermentación discontinua de los inóculos, con una concentración final de kanamicina igual a 50 mg.L⁻¹. Se inocularán con 1 mL de bacteria transformada (cepa BL-21 y vector pET29a) con la secuencia del tándem multimérico seleccionado. Luego se incubará a 35°C durante 6 horas con agitación de 20 r.p.m, se añadirá al fermentador (*Evo System*) de 5 L (efectivo para 3 L) cuando alcance 0,1 unidades de densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm (*Spectronic Genesys*). En el fermentador se mantendrá una agitación de 450 rpm y la inducción será realizada con IPTG durante la fase de crecimiento exponencial. El control y ajuste del pH se realizará mediante el bombeo automático de amoníaco 6 N y ácido fosfórico 3 N. El fermentador estará sincronizado a un programa de control y monitoreo diseñado para este tipo de operaciones (*Winpact Scada*). En todos los casos, la operación se evaluará durante de 6-7 horas [44, 143]. Para dar seguimiento a la concentración celular (cinética de crecimiento), una de las variables respuestas seleccionadas en el diseño experimental propuesto, monitoreos de la densidad óptica basado en un método turbidimétrico serán realizados mediante la lectura periódica de absorbancia a longitud de onda igual a 600 nm. A partir de los valores de absorbancia se calculará el peso celular seco (DCW), utilizando la relación que la unidad de DO es igual a 0,49 g de biomasa seca por litro.

La otra variable respuesta, el nivel de expresión del tándem multimérico, será monitoreada a partir de muestras de las fermentaciones que alcancen 2 unidades de densidad óptica y que posteriormente se aplicarán en electroforesis de geles de poliacrilamida al 12%, en presencia de SDS. Los resultados de las electroforesis serán analizados mediante densitometría de imagen, esta herramienta (*ImageJ*) permite determinar el porcentaje de la proteína de interés respecto al total de proteínas contaminantes [44, 130].

2.2.2 Aislamiento-Solubilización-Recuperación de los cuerpos de inclusión

Una vez establecida la fermentación, la biomasa obtenida es centrifugada (11,5 x g) y lavada con NaCl 1% (10 mL por gramo de biomasa). La biomasa lavada se colocará en frascos de 500 mL y resuspenderá en tampón de ruptura (Tris 0,1 mol.L⁻¹, EDTA 0,005 mol.L⁻¹, NaCl 0,1 mol.L⁻¹, a pH 8) para romper los cuerpos de inclusión mediante se ejecutarán 6 pases en Microfluidizer M-110Y a un flujo volumétrico de 450 mL.min⁻¹ y 100 mPa. Luego, la biomasa se centrifugará (11,5 x g) a una temperatura de 4°C durante 15 minutos para posteriormente ser solubilizada usando tampón de solubilización (Tris 0,1 mol.L⁻¹, urea 6 mol.L⁻¹, pH 8) en una relación de 20 mL de tampón por 1 g de biomasa, la mezcla se agitará a temperatura ambiente durante 2 horas. Después, se ajusta el pH a 3, utilizando HCl (5,5 mol.L⁻¹) para remover impurezas relativas al proceso. En este punto, la recuperación del tándem multimérico se realizará en cromatografía por afinidad mediada por quelatos metálicos (Ni²⁺), la resina IMAC usada fue *Chelating Sepharose Fast Flow* (Amersham Bioscience, UK). La columna fue cargada con ZnSO₄ a 100 mmol.L⁻¹ y lavada con Tris 10 mmol.L⁻¹, NaCl 200 mmol.L⁻¹, imidazole 250 mmol.L⁻¹, pH 8 (tampón de elución) y luego equilibrada con Tris 10 mmol.L⁻¹, NaCl 200 mmol.L⁻¹, pH 8 (tampón de equilibrio). El producto de ruptura se aplicó a la columna y se lavó con Tris 10 mmol.L⁻¹, NaCl 200 mmol.L⁻¹ y imidazole 50 mmol.L⁻¹, pH 8 (4 VC). La proteína fue eluida usando tampón aumentado a imidazole 250 mmol.L⁻¹ [37, 93, 175, 176].

2.2.3 Proteólisis del tándem multimérico

Para el diseño experimental de esta etapa, se seleccionarán como variables de entradas: la concentración de hidroxilamina (HX), la temperatura de la reacción y el pH. Los distintos intervalos de escrutinio, así como las unidades de trabajo se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Intervalo de las variables de entrada para el estudio de la proteólisis

Factores	Intervalos	Unidades	Referencias
Concentración HX	0,5 – 2,5	mol.L ⁻¹	[46, 141, 143]
Temperatura	40 – 60	°C	
pH	8 - 9	-	

Para el procesamiento de la información, se utilizará el programa Statgraphics Centurion XVI versión 16.1.18. La base del diseño experimental será del tipo cribado, para estudiar las posibles interacciones entre los distintos factores de entrada y la influencia de estos sobre el porcentaje de la eficiencia de la proteólisis (EP).

Tabla 5. Variables respuestas seleccionadas para el diseño experimental en proteólisis

Respuestas	Unidades	Referencias
EP	%	[23, 46, 141]

Para un diseño base de tipo cribado factorial 2^3 , agrupado y aleatorizado en un bloque 1, el programa planifica la ejecución de 18 corridas experimentales que incluyen 1 punto central y un bloque de réplicas, las corridas experimentales se organizan en la Tabla 6.

Tabla 6. Corridas experimentales planificadas para la proteólisis

No. experimento	Concentración HX (mol.L⁻¹)	Temperatura (°C)	pH
1	2.5	40.0	8.0
2	2.5	40.0	9.0
3	0.5	60.0	8.0
4	0.5	40.0	9.0
5	1.5	50.0	8.5
6	2.5	60.0	8.0
7	0.5	60.0	9.0
8	2.5	60.0	9.0
9	2.5	60	8.0
10	2.5	40.0	8.0
11	2.5	40.0	9.0
12	0.5	60.0	8.0
13	0.5	40.0	9.0
14	1.5	50.0	8.5
15	0.5	40	8.0
16	0.5	60.0	9.0
17	2.5	60.0	9.0
18	0.5	40.0	8.0

Una vez ejecutadas las corridas experimentales e introducidas las variables respuestas correspondientes, la función de optimización de respuesta múltiple (ORM) será utilizada para obtener la superficie de respuesta estimada y la combinación de factores de entrada que garanticen valores máximos (*función deseabilidad*) de las variables respuestas para el intervalo de operación estudiado.

Para realizar las corridas experimentales, se utilizarán metodologías similares a la propuestas por Zhou y colaboradores [46] y Park y colaboradores [143]. Para cada experimento se utilizará un tampón de proteólisis que contiene 0,22 mol.L⁻¹ de trizma (Tris-hidroximetil-aminometano), urea 6 mol.L⁻¹, guanidina 4,5 mol.L⁻¹ y una concentración de HX relativa a los intervalos que se usarán durante el desarrollo del diseño experimental. El pH del tampón de proteólisis dependerá del valor requerido según diseño experimental, este será ajustado a conveniencia utilizando NaOH 5 mol.L⁻¹ y HCl 1 mol.L⁻¹. Iguales volúmenes del tampón de proteólisis y de la solución que contiene la proteína recombinante (tándem multimérico solubilizado) serán mezclados. La concentración inicial del tándem multimérico (proteína) se mantendrá en 6 mg.mL⁻¹. A las 4 horas, se detiene la reacción, ajustando el sistema a un valor de pH 4,0 con ácido fórmico concentrado y disminuyendo la temperatura a 4°C.

El seguimiento de las variables respuestas seleccionadas en el diseño experimental se realizará mediante la siguiente estrategia. Para medir la EP de cada experimento, se usará una columna analítica de gel filtración *Cytiva HiPrep™ Sephacryl™ S-100 HR Columns*, se aplicará de cada reacción el 5% de volumen de columna, las fracciones serán colectadas. Para estimar la talla molecular, las muestras colectadas se analizarán mediante SDS-PAGE de bajo peso molecular (4%T, 3%C para el gel concentrador, 10%T, 3%C para el gel espaciador y 16.5%T, 6%C el gel separador)[177] y se incluirá como control positivo el syn-CBB288. La EP será medida como el porcentaje de la masa del r-CBB288 existente en relación a la masa inicial de proteína intacta, para estimar la masa de las distintas especies involucradas se utilizará el concepto del área bajo la curva de los perfiles cromatográficos. Como análisis complementario, la afinidad (K_D) del monómero r-CBB288 de mayor pureza será determinada mediante la metodología de TMS descrita en el acápite 3.1.9.

2.2.4 Purificación del péptido objetivo r-CBB288

2.2.4.1 Caracterización del sistema cromatográfico

Para caracterizar la operación se estudió a pequeña escala (columna XK 26/40) la relación de número de platos teóricos (HEPT) respecto al flujo de operación (v), con el objetivo de conocer la región de la gráfica de *Van Deemter* para el sistema cuando se utiliza la resina del tipo *Sephadex-G25 Medium* para una operación de CEM [47]. Para conocer la distribución de los flujos de operaciones y su relación con la

eficiencia del proceso de transferencia de masa, se utilizará una metodología similar a la descrita por Faraji y colaboradores [45], acetona al 3% se empleará como analito traza capaz de penetrar los poros de la resina (excluyente para pesos moleculares de 5000 Da). Para este estudio la velocidad lineal máxima evaluada será de 200 cm.h⁻¹. La obtención de la gráfica de *Van Deemter*, proporcionará información necesaria para la realización de un diseño experimental que contemple valores de velocidad lineal cercanos a la velocidad lineal óptima de operación (a menor HPTE). Para esta tarea, se utilizará agua como fase móvil y el volumen de acetona a 3% que se inyectará al sistema debe ser equivalente al 2% del volumen de columna.

Tabla 7. Datos del sistema y condiciones para determinar la velocidad lineal óptima

Datos del sistema XK26/40- G25 Medium	
Longitud columna (cm)	14
Diámetro de columna (cm)	2,6
Área (cm ²)	5,311
Volumen columna (VC) (mL)	74,29
Concentración de acetona (%)	3
Volumen aplicado de acetona (% de VC)	2

2.2.4.2 Diseño experimental para la operación de CEM

Para el diseño experimental de esta etapa, se seleccionarán como factores de entradas: la altura de la cama (L_c), la carga de muestra (carga) expresada en %VC y la velocidad lineal de operación (VL). Los distintos intervalos de escrutinio, así como las unidades de trabajo se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Intervalo de las variables de entrada para el estudio de la CEM

Factores	Intervalos	Unidades	Referencias
L_c	7 – 14	cm	[45, 47, 158, 178]
carga	18 – 38	%VC	
VL	12 – 200	cm.h ⁻¹	

El procesamiento de la información se realizará con el programa Statgraphics Centurion XVI versión 16.1.18. La base del diseño experimental será del tipo cribado, para estudiar las posibles interacciones entre los distintos factores de entrada y la influencia de estos sobre el recobrado para asegurar una pureza superior al 99% (Rec_ 99) directamente proporcional a la Resolución y el tiempo de la operación (t), que será analizado como el inverso del tiempo como referente de la productividad.

Tabla 9. Variables respuestas seleccionadas para el diseño experimental en CEM

Respuesta	Unidades	Referencia
Rec_ 99	%	[47, 149, 158]
Tiempo (t)	min	

Para un diseño base de tipo cribado factorial 2^3 , agrupado y aleatorizado en un bloque, el programa planifica la ejecución de 11 corridas experimentales que incluyen 3 puntos centrales, las corridas experimentales se organizan en la Tabla 10.

Tabla 10. Corridas experimentales planificadas para la CEM

No. experimento	carga (%)	VL (cm.h ⁻¹)	L _c (cm)
1	18	200	7
2	38	12	14
3	38	200	14
4	28	106	10.5
5	38	12	7
6	18	12	7
7	28	106	10.5
8	18	200	14
9	18	12	14
10	38	200	7
11	28	106	10.5

Una vez ejecutadas las corridas experimentales e introducidas las variables respuestas correspondientes, la función de optimización de respuesta múltiple (ORM) será utilizada para obtener la superficie de respuesta estimada y la combinación de factores de entrada que garanticen valores máximos (*función deseabilidad*) de las variables respuestas α y $Rec_{99\%pureza}$ y un mínimo (*función deseabilidad*) para la variable respuesta t , en el intervalo de operación estudiado.

Para ejecutar las corridas experimentales, se utilizará una metodología similar a la propuesta por Faraji y colaboradores [45], en la cual se emplea tampón fosfato salino (PBS) ajustando el pH a 6,7 con NaCl 1 mol.L⁻¹. Los experimentos se realizarán en un equipo ÄKTA purifier 100 system (*GE Healthcare Life Sciences*), con un sistema de doble-bomba y múltiple monitoreo de señal que permitirá realizar ensayos simultáneos. También cuenta con un colector automático de fracciones y control de pH-conductividad. La adquisición de datos y el control del sistema se realizará mediante el programa del equipo (UNICORN™ 5.31).

2.2.5 Modelación GRM para CEM

La modelación matemática de la operación CEM se realizará teniendo en cuenta las mejores condiciones de operación obtenidas del diseño experimental propuesto. Los parámetros de la simulación del GRM serán estimados utilizando los valores de L_c , carga y flujo volumétrico (Q) que aseguran la mayor eficiencia en la separación, la mayor pureza y productividad, al menos, dentro del intervalo estudiado.

Los sistemas de ecuaciones parciales del GRM serán resueltos numéricamente utilizando Matlab® (*The MathWorks, Inc., MA, USA*). El elemento finito (con elementos cuadráticos) y los métodos de colocación ortogonal se usarán para discretizar las ecuaciones diferenciales de fase parcial (ecuación 11) y de fase de partículas (ecuación 12), respectivamente [47, 49, 149, 166]. Los parámetros necesarios para la resolución del modelo se estimarán basado en lo descrito en la literatura [47-49] [178].

2.2.5.1 Determinación de las velocidades lineales del microsoluta (v_1) y macrosoluta (v_0)

Una vez determinados los tiempos de retención para el macrosoluta (t_0) y el microsoluta (t_1), es posible determinar las velocidades lineales a partir de las siguientes relaciones, expresadas en $m.s^{-1}$ [47-49] [178].

$$v_{macro} = \frac{L_c}{t_0} \quad v_{micro} = \frac{L_c}{t_1} \quad \text{ecuación 17-18}$$

2.2.5.2 Determinación de la porosidad del lecho (ϵ_b) y la porosidad de la partícula (ϵ_p)

$$\epsilon_b = \frac{4Qt_0}{\pi d^2 L_c} \quad \epsilon_p = \frac{\left[\left(\frac{t_1}{t_0}\right) - 1\right] \epsilon_b}{1 - \epsilon_b} \quad \text{ecuación 19-20}$$

Donde, Q representa el flujo volumétrico de la fase móvil ($m^3.s^{-1}$), L_c es la longitud de la columna (m) y d representa el diámetro interno de la columna (m) [47-49] [178].

2.2.5.3 Determinación de fracción de porosidad accesible de partícula (ϵ_p^a)

Este parámetro se calcula para ambos solutos y representa la fracción de volumen interno de partícula a la cual tienen acceso los solutos involucrados

$$\epsilon_p^a = \epsilon_p F^{ex} \quad \text{ecuación 21}$$

Donde, F^{ex} es el porcentaje de accesibilidad (%), igual a 99% para un microsoluta capaz de penetrar hacia la partícula y 1% para un macrosoluta incapaz de penetrar hacia la partícula [47, 49].

2.2.5.4 Determinación del coeficiente de dispersión axial D_{Li} ($m^2.s^{-1}$)

$$D_{Li} = \frac{v_{macro} L_c}{Pe_L} \quad \text{ecuación 22}$$

Donde, Pe_L representa el número de Peclet (adimensional) y se determina mediante la siguiente ecuación.

$$Pe_L = \frac{L_c}{2R_p \varepsilon_b} (0,2 + 0,01Re^{0,48}) \quad \text{ecuación 23}$$

Donde, R_p es el radio de la partícula porosa (μm) y Re (número de Reynolds) puede ser determinado mediante la siguiente ecuación.

$$Re = (2R_p)v_{macro} \frac{\rho}{\mu} \quad \text{ecuación 24}$$

En la ecuación 24, ρ representa la densidad de la fase móvil ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$) y μ es la viscosidad de la fase móvil (Pa.s), esta ecuación está definida para un intervalo de valores de Re entre 10^{-3} y 10^3 (típico de estos sistemas). Para un valor de $Re \leq 0,02$ la eliminación del segundo término de la ecuación 23 produce un error del 0,08% [47-49] [178].

2.2.5.5 Determinación del número η

Para determinar el valor de η se utilizará la siguiente ecuación.

$$\eta = \frac{\varepsilon_p^a D_{pi} L_c}{R_p^2 v_{micro}} \quad \text{ecuación 25}$$

Donde, D_{pi} representa el valor de la difusividad efectiva ($\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$) y puede ser determinada por la siguiente expresión.

$$D_{pi} = \frac{D_m}{\tau_{tor}} (1 - 2,104\lambda + 2,09\lambda^3 - 0,95\lambda^5) \quad \text{ecuación 26}$$

En la ecuación 26, D_m es la difusividad molecular ($\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$) y puede ser determinada a partir de la ecuación 27 (derivada de Stoke Einstein), asumiendo que las moléculas son esféricas.

$$D_m [\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}] = C (MW)^{-\frac{1}{3}} \quad \text{ecuación 27}$$

Donde $C = 2,74 \cdot 10^{-9}$, siendo C una constante de correlación determinada experimentalmente para sustancias orgánicas con valores de talla molecular (MW) mayores que 1000 Da (ambos componentes de la mezcla superan los 1000 Da). Por otra parte, la variable λ , representa la relación entre diámetro de la molécula (d_m) y diámetro de poro (d_{poro}), la cual se determina a partir de la ecuación 28.

$$\lambda = \frac{d_m}{d_{poro}} = \lambda_0 \left[\frac{MW}{MW_{LE}} \right]^{\frac{1}{3}} \quad \text{ecuación 28}$$

Donde, la constante $\lambda_0 = 0,35$ y MW_{LE} representa la talla molecular del límite de exclusión. Para el caso de τ_{tor} (tortuosidad), ninguna expresión con rigor es aceptable para líquidos, esto hace que deba ser ajustada

de manera experimental, valores iniciales para el ajuste pueden ser tomados de estudios similares, por ejemplo, $\tau_{tor} = 2$ es utilizada en ocasiones para comenzar simulaciones de CEM [47, 49].

2.2.5.6 Número de Biot (Bi) para transferencia de masa

$$Bi = \frac{k_i R_p}{\varepsilon_p^0 D_{pi}} \quad \text{ecuación 29}$$

El valor de Bi se calcula a partir del coeficiente de transferencia de masa (k_i). Bajo condiciones experimentales normales de una columna CEM, el Re es relativamente muy pequeño, en ese caso la correlación mostrada en la ecuación 30 puede servir para estimar el valor de k_i en términos del número de Sherwood (Sh) para un valor de Re pequeño [47, 49].

$$Sh = \frac{1,09}{\varepsilon_b} (Re Sc)^{0,33} = 1,37 \frac{(v R_p)^{0,33}}{\varepsilon_b} \quad \text{ecuación 30}$$

$$0,0015 \leq Re \leq 55$$

Donde, Sc es el número de Schmidt, el cual se relaciona de la siguiente manera.

$$Sc = \frac{\mu}{D_m \rho} \quad \text{ecuación 31}$$

Luego de obtenido el valor de Sc, un estimado de k_i puede ser calculado de la siguiente manera.

$$k_i = \frac{Sh D_m}{2 R_p} \quad \text{ecuación 32}$$

2.2.6 Simulación en SuperPro Designer

El análisis técnico y económico del proceso propuesto, tendrá una estructura similar al utilizado por Hebbi y colaboradores. La simulación del proceso se realizará mediante el programa SuperPro Designer V9 (Intelligen Inc., Scotch Plains, NJ), los datos del proceso a escala experimental de laboratorio serán usados como plantilla para simular un proceso comercial capaz de producir 2 g de producto final (péptido objetivo purificado) por lote, el análisis de factibilidad será realizado para un año y el tiempo de cada lote se ajustará según los resultados experimentales obtenidos. Los ajustes de las escalas (Design Mode) para cada operación se basarán en el balance de materia realizado por el programa (http://www.intelligen.com/superpro_features.html) [44].

En un inicio, la etapa de fermentación se simulará en condición aeróbica para producir el tándem multimérico como cuerpos de inclusión. La operación con código FR-101, será alimentada con medio de cultivo, aire estéril, agua y el inóculo. El tiempo de operación y la temperatura se introducirán en dependencia de los resultados experimentales obtenidos. El producto de FR-101 (caldo de biomasa) será transferido a un tanque de almacenamiento con código V-101 y se empleará una operación de centrifugación (disc stack) con código DS-101 para remover el líquido y cosechar la biomasa. Luego, un

homogeneizador celular con código HG-101 tendrá el objetivo de romper las células para liberar los cuerpos de inclusión y debrís celular, la temperatura de operación se mantuvo sobre los 10°C. Posterior a la homogenización el debrís es removido mediante centrifugación (DS-101). Los cuerpos de inclusión aislados serán transferidos a un tanque de almacenamiento V-102 para recibir el tratamiento de solubilización. El producto intermedio de V-102 será trasladado a un reactor con código R-101 que tendrá parámetros relativos a los resultados experimentales previamente obtenidos. El producto de la reacción se someterá a una operación cromatográfica con código definido C-101.

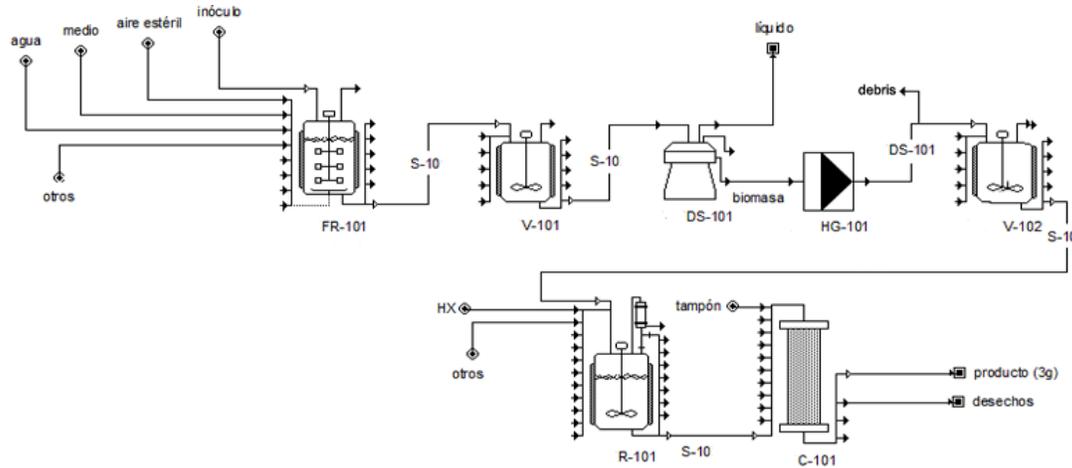


Figura 24. Esquema propuesto inicialmente para la simulación del proceso en Superpro Designer

El análisis de factibilidad económica para el esquema propuesto en la Figura 24, estará basado en el precio actual del tratamiento con Adalimumab (potencial competidor y fármaco más vendido para el bloqueo del TNF), el costo de este medicamento se estima cercano a unos 38 000 dólares (\$) por año y en las dosis promedios necesarias (40 mg/semana) [10, 11]. La información brinda un margen estimado de precio de venta para el producto peptídico entre 15 000 y 18 000 \$/g producto. Bajo este supuesto, se realizará la simulación del proceso tecnológico propuesto.

3. Resultados y discusión

3.1 Caracterización mediante TMS de la afinidad de syn-CBB288 respecto al TNF

El prototipo syn-CBB288 fue obtenido mediante síntesis química, la que fue subcontratada a la empresa Genscript (China), para luego realizar su caracterización. En primer lugar, se realizaron estudios de TMS para evaluar la afinidad durante la interacción del péptido (ligando) con la diana molecular TNF previamente marcado con etiqueta fluorescente. Los ensayos termoforéticos permitieron describir la interacción de TNF frente a concentraciones variables de syn-CBB288, en la Figura 25 los valores son representados como el promedio \pm desviación estándar de tres réplicas de muestra. El análisis de los cambios de fluorescencia del TNF marcado frente a concentraciones variables del péptido permitió determinar un valor de la K_D igual a $1,03 \times 10^{-5} \pm 0,05 \text{ mol.L}^{-1}$.

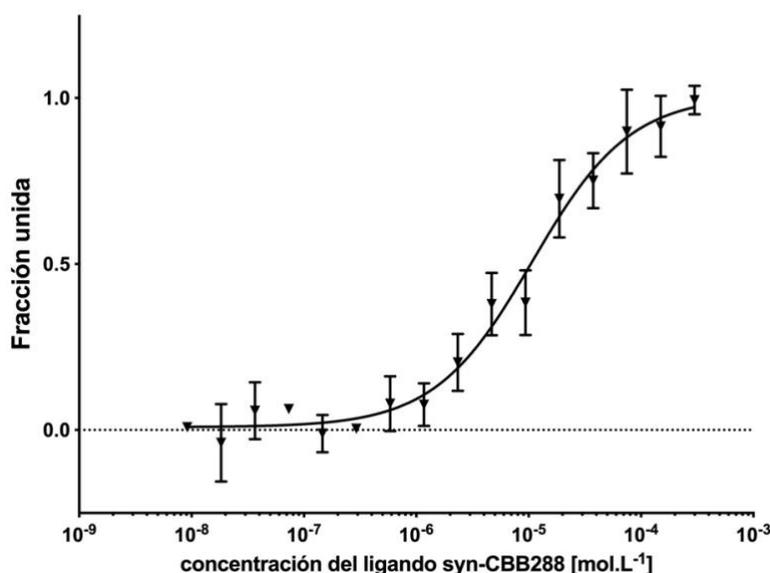


Figura 25. Curva de afinidad syn-CBB288 respecto al TNF (con $K_D = 1,03 \times 10^{-5} \pm 0,05 \text{ mol.L}^{-1}$)

Los resultados de K_D para la interacción del péptido con el TNF se hallan en el intervalo bajo de concentración, similar a estudios realizados para el desarrollo de péptidos lineales con condiciones fisicoquímicas que favorecen la interacción con el TNF e impiden la formación del complejo citoquina-receptor [61].

3.2 Efecto neutralizante de syn-CBB288 sobre la actividad citotóxica inducida por el TNF

Se procedió a analizar la capacidad del syn-CBB288 para neutralizar la actividad citotóxica del TNF *in vitro*. Para esto se realizó un ensayo de neutralización de citotoxicidad de TNF en células L929 utilizando el prototipo sintético. Los resultados mostrados en la Figura 26 sugieren que el péptido sintético a bajas concentraciones es capaz de neutralizar con efectividad la actividad del TNF, logrando una recuperación

aproximada del 80% en la viabilidad celular de los cultivos, respecto al aproximado del 20% de viabilidad celular inicial, cuando las células no contenían el péptido.

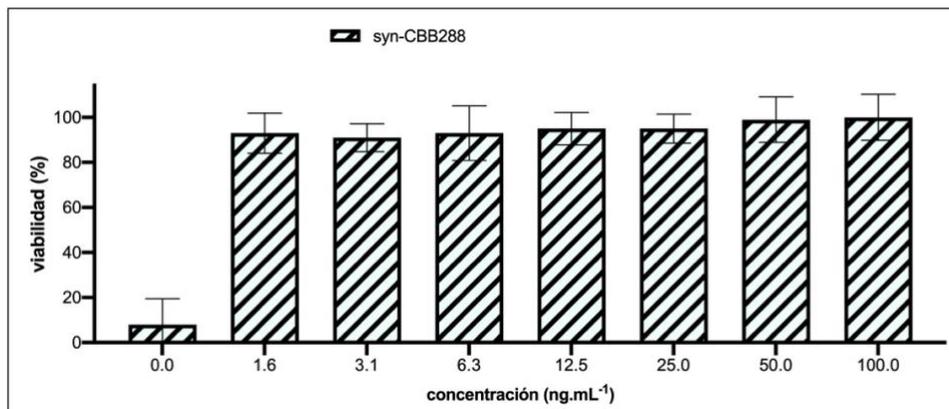


Figura 26. Ensayo de neutralización de citotoxicidad de TNF en células L929, eje X: concentración del syn-CBB288, eje Y: viabilidad celular

Estos resultados superan los niveles de neutralización obtenidos por Tong y colaboradores durante el estudio de la viabilidad de un modelo celular en presencia de TNF, en el cual, la adición de un péptido natural (AAGALPS) provocó la recuperación de la viabilidad celular en un 40% aproximadamente [25]. El porcentaje de recuperación de la viabilidad celular de la Figura 26 también es comparable con los resultados reportados por Qin y colaboradores (aproximadamente 65%) durante la evaluación de la actividad citotoxicidad inducida por el TNF en células sensibles L929 en presencia de un novedoso péptido [26]. Por lo tanto, los valores alcanzados permiten sugerir que el diseño inicial del péptido tiene la capacidad de proteger a las células L929 de los efectos citotóxicos originados por el TNF.

3.3 Desarrollo de un modelo *in-silico* para predecir la afinidad de syn-CBB288 y r-CBB288 hacia el TNF

La configuración final de los complejos TNF-péptido después de un breve equilibrio de 0,5 ns mostró diferencias mínimas entre ellos (figura 31, superior). El extremo C-terminal de r-CBB288 está expuesto principalmente a solventes (recuadro negro), sin interacción con ninguno de los monómeros de TNF. Esto no está presente en syn-CBB288, con un grupo terminal Carboxi estrechamente unido a la proteína. El residuo de glicina agregado en la región N-terminal del r-CBB288 contribuye a una mayor superficie de contacto con el TNF.

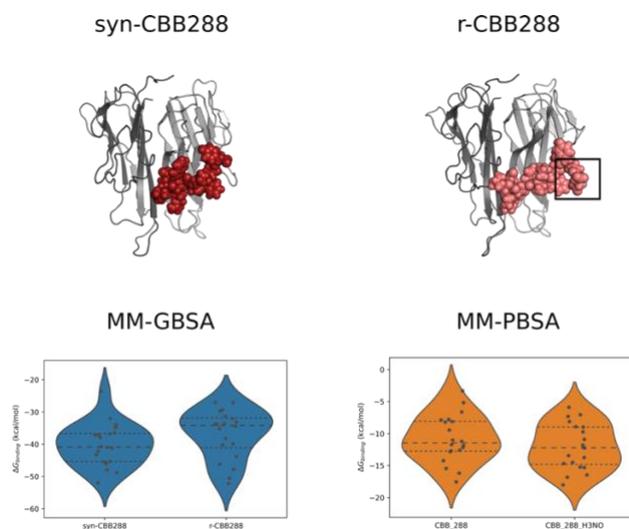


Figura 31. Cálculos de energía libre de unión de hTNF α -péptidos. Superior: Configuraciones finales de syn-CBB288 (esferas rojas) y r-CBB288 (esferas rosas) en complejo con dímero hTNF α (dibujo gris) después de 0,5 ns de equilibrio. Se omitieron las moléculas de disolvente para su visualización. Abajo: Distribuciones de energía libre vinculantes obtenidas de los cálculos de MM-PB(GB)SA. Cada punto representa una réplica independiente. Las líneas punteadas representan los cuartiles medio, superior e inferior.

A pesar de estas diferencias, los sitios de unión de los residuos de anclaje del receptor no cambiaron, lo que sugiere que se deben mantener las propiedades de unión de r-CBB288. En términos energéticos, los cálculos de MM-GBSA y MM-PBSA (Figura 31, abajo) no mostraron diferencias significativas entre complejos, con valores medios: $-40,20 \pm 6,47$ kcal/mol (syn-CBB288), $-36,98 \pm 7,43$ kcal/mol (r-CBB288) en MM-GBSA; $-10,80 \pm 3,61$ kcal/mol (syn-CBB288), $-12,07 \pm 3,48$ kcal/mol (r-CBB288) en MM-PBSA. Bajo este enfoque, ambos péptidos tienen modos de unión similares a hTNF α y las modificaciones peptídicas entre ambos prototipos (sintético y recombinante) no evidencian alteraciones de la afinidad de unión predicha para proteína diana.

3.4 Proceso recombinante para producir péptido r-CBB288

3.4.1 Desarrollo y optimización de la operación de fermentación

De acuerdo a la metodología detallada en el acápite 2.2.4.2, en la tabla 11 se muestran los resultados obtenidos para los 18 experimentos propuestos.

Tabla 11. Resultados del diseño experimental propuesto para la operación de fermentación

No. experimento	Temperatura (°C)	pH	OD (%)	Concentración celular (g.L⁻¹)	Expresión (%)
1	32.0	7.0	20.0	9.3	32
2	42.0	7.0	30.0	10.4	22
3	42.0	7.0	20.0	15.1	34
4	32.0	7.0	30.0	4.45	32
5	32.0	5.0	30.0	9.0	25
6	42.0	5.0	20.0	5.9	33
7	32.0	5.0	20.0	3.2	29
8	42.0	5.0	30.0	11.2	18
9	37.0	6.0	25.0	9.0	35
10	32.0	7.0	20.0	10.0	30
11	42.0	7.0	30.0	11.3	21
12	42.0	7.0	20.0	16.5	32
13	32.0	7.0	30.0	4.4	32
14	32.0	5.0	30.0	8.7	26
15	42.0	5.0	20.0	6.1	33
16	32.0	5.0	20.0	3.3	30
17	42.0	5.0	30.0	10.1	18
18	37.0	6.0	25.0	12.0	41

El modelo resultó por defecto cuadrático para las dos variables respuestas y los tres factores experimentales. Para el caso de la “concentración celular” el estadístico R-cuadrada ajustada explica un 94,97% de la variabilidad de este factor experimental. Por otra parte, cinco efectos con P-valor menor que 0,05 demuestran la significancia estadística con un nivel de confianza del 95%. Para el segundo factor experimental “expresión”, el estadístico R-cuadrada ajustada representa un 93,75% de la variabilidad existente, con seis efectos que tienen P-valor menor que 0,05, lo cual también denota la significancia estadística para esta variable de salida. En ambos casos los efectos estimados y las interacciones se realizaron sobre una base de 10 grados de libertad. Para toda las variables respuestas se obtienen modelos de buena regresión, lo cual permite analizar la influencia de estos factores a partir de los siguientes diagramas de Pareto.

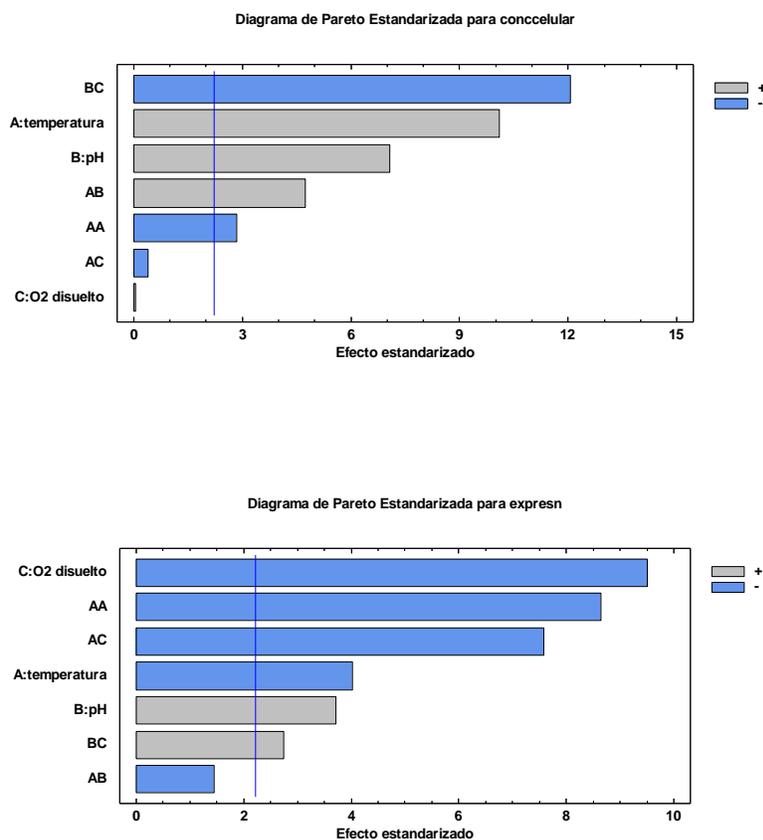


Figura 32. Diagramas de Pareto Estandarizada para los factores experimentales. Arriba, “concentración celular”; Abajo, “expresión”

Obsérvese que de manera general el pH juega un papel fundamental y positivo para la concentración celular y la expresión, pues a valores inferiores de pH, el acetato se protona y atraviesa la membrana citoplasmática, afectando la síntesis de ATP disminuyendo la energía destinada al crecimiento e incluso la supervivencia celular [179]. Estos aspectos son conocidos, pero demuestra que el diseño experimental realizado logra reproducir las condiciones en el intervalo de estudio y su relación cuantitativa en el sistema analizado. Para el caso del “oxígeno disuelto”, se muestra que respecto a la “concentración celular” juega un rol positivo pero no influye de manera significativa en el crecimiento celular, al menos dentro del espacio de diseño analizado. Sin embargo, para el factor “expresión” resulta significativa la variación del nivel de oxígeno disuelto, afectando negativamente la expresión celular. Esto último también valida la capacidad del diseño experimental para reproducir parcialmente la operación estudiada, teniendo en cuenta que si bien se trata de una operación aeróbica, la cual debe ser favorecida con la presencia de O_2 , en la práctica no ocurre del todo así, pues un aumento del nivel de oxígeno en el sistema puede promover la formación de ROS (especies de oxígeno reactivas) que limitan la actividad celular por acumulación de acetato [180].

También para la “temperatura” los resultados difieren de una variable respuesta a otra, lo cual resulta entendible, si se tiene en cuenta que existe un intervalo límite de temperatura que debe ser respetado, pues,

al alejarse del punto de temperatura óptima ($=37^{\circ}\text{C}$) se podría afectar la actividad máxima de la enzima T7 RNA-polimerasa afectando de esta manera el proceso de transcripción celular [181, 182].

Para obtener las mejores condiciones de la operación de fermentación se definió un función deseo donde se maximizaran los factores del diseño experimental, alcanzando una deseabilidad igual a 0,92 para la respuesta “concentración celular” y para la respuesta “expresión” la deseabilidad igual a 1, lo cual se resume en una deseabilidad optimizada igual a 0,96. El espacio y el óptimo de trabajo se reproduce en la figura 33, el espacio de la función deseo muestra lo más relevante, la intersección de las respuestas para las distintas variables de entrada.

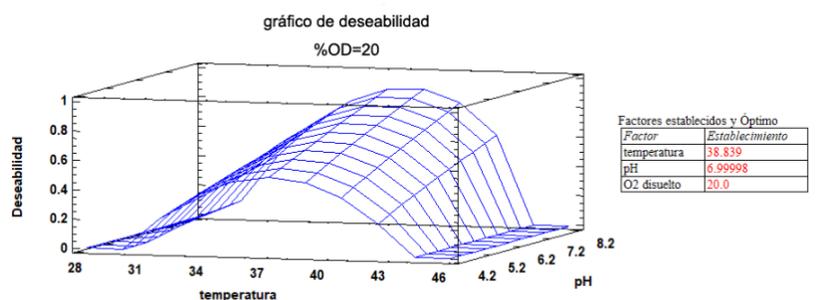


Figura 33. Superficie de respuesta estimada para maximizar los factores respuestas “concentración celular” y “expresión”

Es de notar la importancia de minimizar los niveles de O₂ en el intervalo de trabajo propuesto y ejecutar la operación en un intervalo de temperatura ligeramente superior a la temperatura de crecimiento óptica de la bacteria hospedera y a una condición de pH máxima en el intervalo analizado. Para corroborar el modelo obtenido por diseño experimental se ejecutó el experimento sugerido por la función deseo en la optimización y se determinaron las variables dependientes reales para una posterior comparación con las predichas por el modelo para un máximo de respuesta.

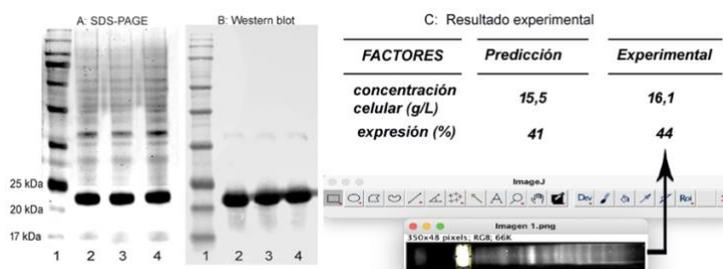


Figura 34. Resultados de la función deseabilidad sugerida por el programa y resultado experimental. (A) Electroforesis SDS-PAGE, geles de poliacrilamida al 12%, carril 1: Marcador de talla molecular (Tris-glycine 4-20%), carril 2,3 and 4: Muestras replicadas de pellet celular obtenido en operación de fermentación bajo las condiciones optimizadas sugeridas por el modelo experimental. (B) Análisis mediante técnica de Wester Blot para la detección específica de la proteína de interés. carril 1: Marcador de talla molecular (Tris-glycine 4-20%), carril 2,3 and 4: Muestras replicadas de pellet celular obtenido en operación de fermentación bajo las condiciones optimizadas sugeridas por el modelo

A partir del valor de absorbancia se calculó el peso celular seco, utilizando la relación empírica $1DO = 0,49 \text{ g.L}^{-1}$, se realizó la medición por triplicado y se obtuvo una concentración celular promedio de $16,1 \text{ g.L}^{-1}$. Lo cual resulta notorio, si se tiene en cuenta que no existen reportes de valores exactos de concentración celular que sean representativos de los CADC y diferentes estudios han determinado diversos valores de peso de células secas desde 50 g.L^{-1} hasta incluso valores en el intervalo de los 20 g.L^{-1} [97]. Si bien, el resultado de optimización obtenido para el intervalo analizado es ligeramente inferior a lo señalado con anterioridad, es aún favorable, pues al constituir un valor cercano al intervalo reportado, a futuro podría ser utilizado como valor de referencia para una optimización más rigurosa que incluya variables independientes de carácter dinámico.

La otra variable respuesta, el nivel de expresión, se determinó mediante electroforesis de geles de poliacrilamida al 12%, en presencia de SDS (figura 34A). Los resultados de las electroforesis se analizaron mediante densitometría de imagen, esta herramienta permite determinar el porcentaje de la proteína de interés (23,5 kDa) respecto al total de proteínas contaminantes, teniendo en cuenta el área e intensidad de la señal electroforética para cada especie presente en un carril. En este caso, la medición se realizó por triplicado utilizando las réplicas de los carriles 2, 3 y 4 respectivamente, como resultado se obtiene un promedio de porcentaje de expresión celular igual a 44%. Al no contar con un control positivo de la proteína tándem, se hace necesario comprobar la presencia específica de la proteína de interés, por lo cual se transfirió el material de una electroforesis idéntica a una membrana de nitrocelulosa para la detección de la proteína mediante el *Wester Blot* mostrado en la figura 34B, este ensayo asegura que la señal electroforética a la altura aproximada de 23,5 KDa la cual fue utilizada para la determinación del factor “expresión” corresponde a la proteína de interés.

De manera general se puede plantear que los resultados mostrados en la figura 34 demuestran que el diseño experimental junto a la estrategia de optimización ejecutada pueden ser utilizados para una correcta predicción de las variables respuesta en el intervalo estudiado de la operación de fermentación.

Otro detalle importante consistía en determinar el tipo de expresión desarrollado en la fermentación, es decir, si la proteína tándem expresaba de manera soluble o insoluble. Para dar respuesta a esta interrogante el material celular cosechado en este experimento se centrifugó a 6000 r.p.m durante 10 minutos. El pellet celular fue resuspendido en 800 mL de buffer de ruptura y lisado en operación de ruptura celular según la metodología descrita en acápite 2.2.2. Todo el material celular lisado (muestra de ruptura) se centrifugó para separar la porción insoluble y soluble. La muestra ruptura y ambas porciones de la centrifugación se analizaron en la electroforesis mostrada en la figura 35.

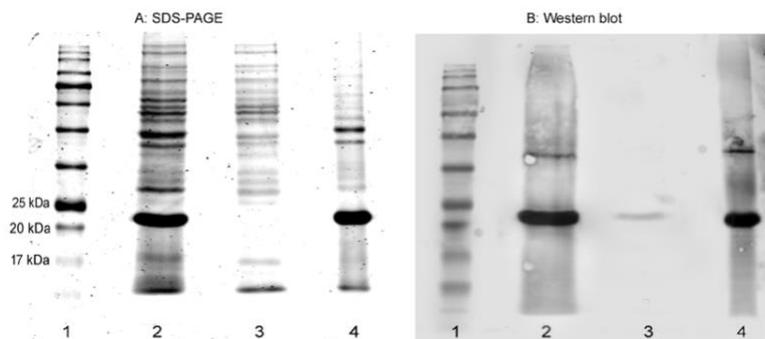


Figura 35. Resultados del paso de ruptura celular, (A) Electroforesis SDS-PAGE, geles de poliacrilamida al 12%, carril 1: marcador de talla molecular, carril 2: muestra de ruptura, carril 3: porción soluble, carril 4: porción insoluble; (B) Análisis mediante técnica de Western Blot para la detección específica de la proteína de interés, carril 1: marcador de talla molecular, carril 2: muestra de ruptura, carril 3: porción soluble, carril 4: porción insoluble.

Como resultado se identificó una mayor presencia de la proteína tándem en la porción insoluble. Siendo esto de vital importancia, pues parte de la investigación está dirigida al establecimiento de una fermentación microbiana usando *Escherichia coli* como hospedero, donde se requiere expresar un tándem que contiene 15 copias del péptido de interés. El espacio de trabajo evaluado en el diseño experimental para la operación de fermentación se seleccionó con la intención de favorecer condiciones necesarias que fomentaran la formación de cuerpos de inclusión. Pues es conocido que muchos polipéptidos recombinantes producidos en *Escherichia coli* se localizan en el citoplasma en la porción insoluble y pueden formar cuerpos de inclusión [36, 90, 91]. Los cuerpos de inclusión se forman a partir de estructuras tipos amiloide, en las cuales las proteínas en una conformación que incluye a los nativos son atrapadas en el interior de la célula, debido a esto muchas proteínas mantienen con frecuencia una similitud estructural secundaria y terciaria, mostrando incluso algún grado de actividad biológica [92]. Este resultado reviste gran importancia, pues los cuerpos de inclusión presentan estabilidad ante la degradación proteica y pueden contener hasta un 90% de la proteína de interés [77].

Para dar continuidad al desarrollo y optimización del proceso general, la porción insoluble (figura 35A-carril 4) contenedora de los cuerpos de inclusión se lavó, solubilizó y filtró según la metodología descrita en el acápite 2.2.2, el material resultante fue purificado mediante cromatografía de afinidad por quelatos metálicos. Cada una de las muestras obtenidas en estos pasos fueron analizadas en el ensayo electroforético mostrada en la figura 36.

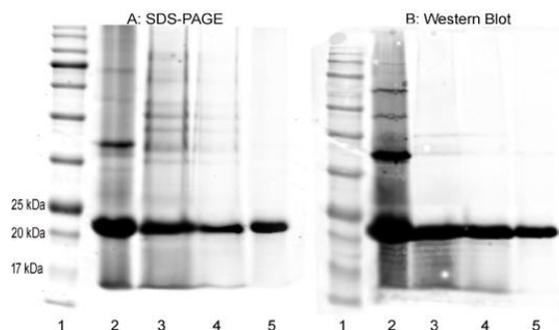


Figura 36. Pasos de lavado, solubilización, filtrado y purificación de la proteína tándem; (A) Electroforesis SDS-PAGE, geles de poliacrilamida al 12%, carril 1: marcador de talla molecular, carril 2: muestra de lavado, carril 3: muestra solubilizada, carril 4: muestra solubilizada filtrada, carril 5: muestra solubilizada, filtrada y purificada mediante cromatografía Ni-NTA. (B) Análisis mediante técnica de Wester Blot para la detección específica de la proteína de interés, carril 1: marcador de talla molecular, carril 2: muestra de lavado, carril 3: muestra solubilizada, carril 4: muestra solubilizada filtrada, carril 5: muestra solubilizada, filtrada y purificada mediante cromatografía Ni-NTA.

En la figura 36A, se puede observar la señal de proteína tándem obtenida una vez realizado el paso de purificación por afinidad, la señal electroforética mayoritaria se encuentra a una altura aproximada de 23,5kDa lo cual coincide con la talla molecular de la proteína de interés diseñada al comienzo de esta investigación. Por otra parte, en la figura 36B, se advierte que la señal analizada en electroforesis es específica para la proteína de interés y no contiene otras especies a la altura de los 23,5kDa y por lo tanto puede ser utilizada la señal electroforética para la determinación del nivel de pureza del tándem multimérico. El análisis por densitometría en gel indicó una pureza del 97% para la proteína de interés, esta pureza es suficiente para el estudio experimental y desarrollo de la operación de proteólisis con hidroxilamina, operación necesaria para desintegrar la proteína tándem formada por las unidades monoméricas r-CBB288 que constituyen el producto final de esta investigación.

3.4.2 Desarrollo y optimización de la operación de proteólisis con hidroxilamina

Acorde a la metodología detallada en el acápite 2.2.3, en la tabla 12 se muestran los resultados obtenidos para los 18 experimentos propuestos.

Tabla 12. Resultados del diseño experimental propuesto para la operación de proteólisis con hidroxilamina

No. experimento	Concentración HX (mol.L ⁻¹)	Temperatura (°C)	pH	EP (%)
1	2.5	40.0	8.0	45
2	2.5	40.0	9.0	48
3	0.5	60.0	8.0	64
4	0.5	40.0	9.0	33

5	1.5	50.0	8.5	62
6	2.5	60.0	8.0	81
7	0.5	60.0	9.0	63
8	2.5	60.0	9.0	78
9	2.5	60	8.0	80
10	2.5	40.0	8.0	44
11	2.5	40.0	9.0	50
12	0.5	60.0	8.0	66
13	0.5	40.0	9.0	31
14	1.5	50.0	8.5	66
15	0.5	40	8.0	45
16	0.5	60.0	9.0	54
17	2.5	60.0	9.0	69
18	0.5	40.0	8.0	50

Los datos experimentales se ajustan a un modelo cuadrático de siete coeficientes. El análisis de varianza para EP muestra un estadístico R-cuadrada ajustada que confirma que los datos experimentales son representativos en un 90,14% de la variabilidad de la respuesta. Las efectos de las variables independientes seleccionadas tienen P-valor menor que 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95%. Los efectos estimados y las interacciones se realizaron sobre una base de 9 grados de libertad. El modelo obtenido presenta una aceptable regresión y puede ser utilizado analizar la influencia de estos factores sobre la EP mediante el siguiente diagrama de Pareto.

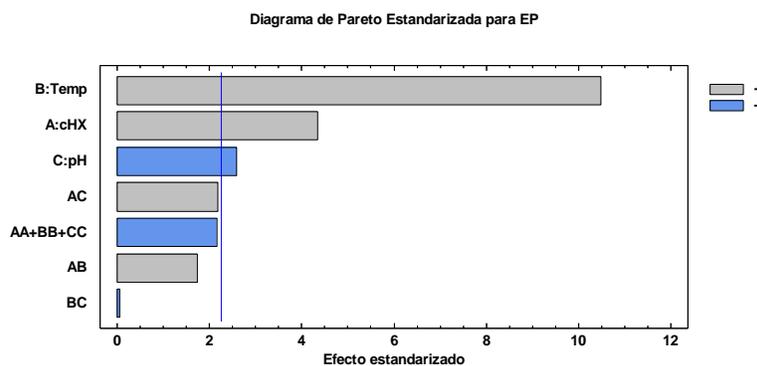


Figura 37. Diagrama de Pareto Estandarizada para la EP

En la figura 37 se puede observar el rol significativamente positivo de la temperatura sobre la EP, lo cual se debe en parte a la naturaleza exotérmica de esta reacción proteolítica. Empíricamente se ha demostrado

que una temperatura aproximada de 50°C es suficiente para dar lugar a la reacción [73, 143, 183], aspecto que coincide con los resultados del modelo y relaciona cuantitativamente los datos experimentales con la operación en estudio. Si bien la temperatura es el factor de mayor influencia en la respuesta, la concentración de hidroxilamina (cHX) también lo hace de manera positiva y significativa, lo cual resulta lógico teniendo en cuenta que la reacción de corte con HX es una reacción de sustitución nucleofílica de segundo orden, en la cual la velocidad de reacción es función de la concentración del sustrato proteico y de la concentración del nucleófilo, y la etapa limitante depende de la concentración del nucleófilo, que a los efectos de esta reacción es aportado por el grupo amino presente en la estructura de la hidroxilamina [46]. El factor pH resultó tener una influencia negativa aunque en menor magnitud al resto. El bajo impacto del pH sobre la respuesta del sistema podría estar dado por el intervalo restringido que se seleccionó, pues la HX es una amina primaria de reacción básica, por lo tanto la velocidad de reacción se favorece a valores de pH superiores a 7. Pero en el caso de que el sustrato sea una proteína, resulta poco práctico aumentar el pH más allá de 9, ya que a estos valores de pH las proteínas y péptidos pueden precipitar y perder actividad biológica o simplemente se pueden desnaturalizar. Por este motivo, a pesar de que resultaba conveniente estudiar un intervalo de pH mayor, experimentalmente resultaba poco práctico.

Para obtener las mejores condiciones de la operación de proteólisis se definió un función deseo donde se maximizó la EP, alcanzando una deseabilidad igual a 0,82 correspondiente a una EP estimada de 81%. El espacio y el óptimo de trabajo se reproduce en la figura 38 el espacio de la función deseo para mostrar la intersección de las respuestas según las distintas variables.

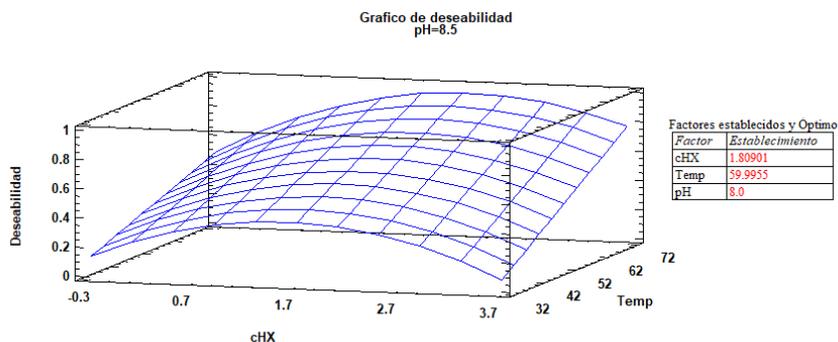


Figura 38. Superficie de respuesta estimada para maximizar factor EP

Los resultados destacan la necesidad de trabajar en el intervalo bajo de pH y ejecutar la operación a la mayor temperatura del diseño experimental. Por otra parte la concentración de hidroxilamina optimizada ligeramente sobre valor central (1,81 mol.L⁻¹) debe utilizarse si se busca proyectar un máximo de EP dentro del espacio de diseño estudiado. Para comprobar la funcionalidad del modelo se procedió con la proteólisis utilizando la condición experimental optimizada (reacción OPT: cHX=1,81 mol.L⁻¹; Temp=59,99°C; pH=8) y sugerida por la función deseabilidad, para corroborar que el modelo es capaz de reproducir otras

condiciones dentro del propio espacio se repitieron dos condiciones no óptimas del propio diseño experimental, (reacción A: $c_{HX}=2,5 \text{ mol.L}^{-1}$; $Temp=40^{\circ}\text{C}$; $pH=8$) y (reacción B: $c_{HX}=0,5 \text{ mol.L}^{-1}$; $Temp=60^{\circ}\text{C}$; $pH=9$). Para ejecutar los ensayos de proteólisis y determinar las variables respuestas se utilizó la metodología descrita en el acápite 2.2.3. Los correspondientes perfiles cromatográficos que se usaron para determinar la EP se muestran en la figura 39.

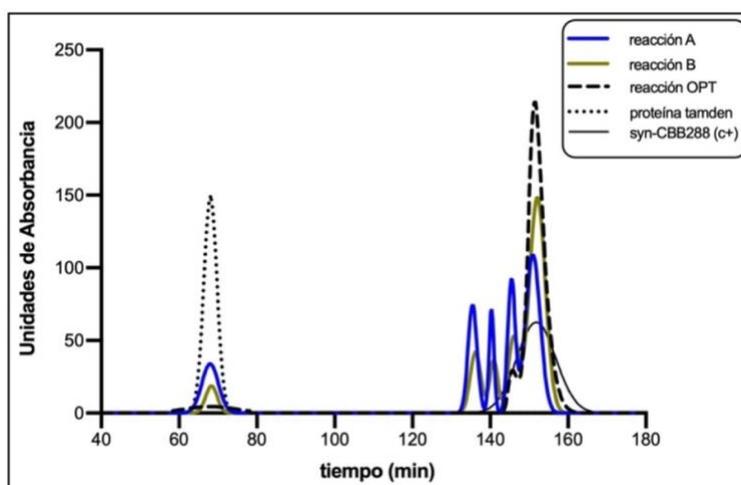


Figura 39. Perfiles cromatográficos en CEM para la determinación de la EP

Mediante la aplicación del prototipo sintético syn-CBB288 como control positivo se hizo posible determinar el tiempo de retención (t_r) en el cual la señal cromatográfica indica posible presencia de la unidad monomérica r-CBB288, es decir la forma 1xCBB288. Contrario a esto, una muestra de la proteína tándem purificada fue utilizada como control negativo para estimar la región del cromatograma representativa de especies de la mezcla producto de una proteólisis incompleta, es decir la forma 15xCBB288.

Tabla 13. Resumen de valores de área y tiempos de retención (t_r) para las determinación de EP a partir de los perfiles cromatográficos

	tándem	reacción A	reacción B	reacción OPT	syn-CBB288
Área pico 1	1263,640	180,1285	70,1764	76,6285	-
Área pico 2	-	216,7377	143,3993	-	-
Área pico 3	-	113,0913	97,2981	-	-
Área pico 4	-	217,2348	168,8881	118,4346	-
Área pico 5	-	515,6398	770,5124	1052,1514	-
Área total	1263,640	1242,8321	1250,2743	1247,2145	-
EP (%)	-	41,4890	61,6275	84,3601	-
t_r -tándem (min)	67,0	-	-	-	-
t_r -CBB288 (min)	-	151,0	152,1	152,3	152,0

Una vez identificados los principales de t_r para las especies más importantes, dígame tándem (67min) y unidad monomérica CBB288 (151,9 min promedio), se pudo estimar la EP para cada ensayo a partir de la

relación $EP = (\text{Área pico } 5 / \text{Área total}) \times 100$. La tabla 13 agrupa los parámetros principales extraídos de la figura 39 necesarios para determinar la variable EP. Para la reacción A se obtiene un 41,5% de EP y para la reacción B la EP fue de 61,6%, estos resultados validan la reproducibilidad del modelo y la metodología establecida, pues durante el desarrollo del modelo experimental, estos puntos fueron evaluados por duplicados obteniéndose valores promedios de EP de 44,5% y 58,5% respectivamente. En el caso de la reacción OPT se obtuvo una EP de 84,4%, valor el cual no dista de la predicción del modelo para un 0,82 de deseabilidad correspondiente a una EP igual a 81%.

Para complementar este resultado se estableció una técnica analítica basado en electroforesis de bajo peso para ratificar la presencia de la unidad monomérica r-CBB288 en las distintas muestras de reacción analizadas en la figura 39 y discutidas en la tabla 13.

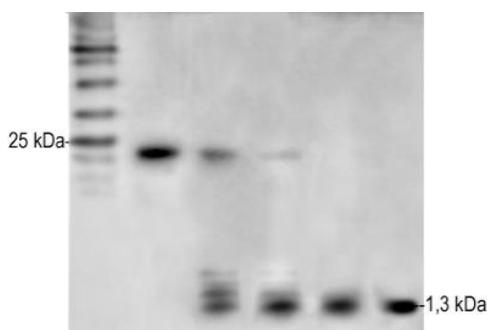


Figura 40. Análisis en gel SDS-PAGE Tris-Tricina de las muestras colectadas en la figura 39. Carril 1: marcador de talla molecular, carril 2: proteína tándem, carril 3: reacción A, carril 4: reacción B, carril 5: control positivo syn-CBB288

Las colecciones de los cinco perfiles cromatográficos observados fueron analizados en gel SDS-PAGE Tris-Tricina cuyas condiciones se encuentran establecidas en el acápite 2.2.3. En correspondencia con el análisis cromatográfico, en la figura 40 se puede observar una señal electroforética para cada reacción a la misma altura que el control positivo syn-CBB288 (aproximadamente 1,3 kDa), con la mejor proporción del péptido ubicada en el carril 5 perteneciente al r-CBB288 obtenido a partir de la reacción OPT. Las señales electroforéticas obtenidas se realizaron en forma de análisis complementario para verificar la presencia de r-CBB288 en las muestras obtenidas posterior a la proteólisis a falta de un anticuerpo específico contra el péptido que permitiera un análisis de *Wester blot*.

Hasta este punto los resultados alcanzados sugieren que, efectivamente el péptido previamente diseñado CBB288 puede ser obtenido utilizando tecnología recombinante en fermentación microbiana de *Escherichia coli* a través de la expresión de una proteína tándem compuesta de copias repetidas del péptido y que las unidades monoméricas de la estructura inicial pueden ser liberadas mediante una operación de proteólisis usando hidroxilamina como agente de corte, lo cual puede ser comprobado analíticamente mediante cromatografía de exclusión molecular y SDS-PAGE Tris Tricina.

3.4.3 Desarrollo y optimización de la operación cromatográfica para la purificación del r-CBB288.

3.4.3.1 Análisis de la gráfica de *Van Deemter*

Para obtener la gráfica de *Van Deemter* se utilizó la metodología descrita en el acápite 2.2.4.1, el objetivo de esta actividad es identificar la relación del número de platos teóricos (HEPT) respecto al flujo de operación (v), lo cual permite la conocer la distribución óptima de la velocidad lineal (VL) y la relación existente con los fenómenos de transferencia de masa implicados en la operación. El sistema seleccionado para este estudio comprende una columna XK26/40 con resina cromatográfica G25 Medium, las características y datos del sistema se muestran en la tabla 7. Para esta tarea, se utilizó agua como fase móvil e inyecciones de volúmenes equivalentes al 2% VC de acetona al 3%.

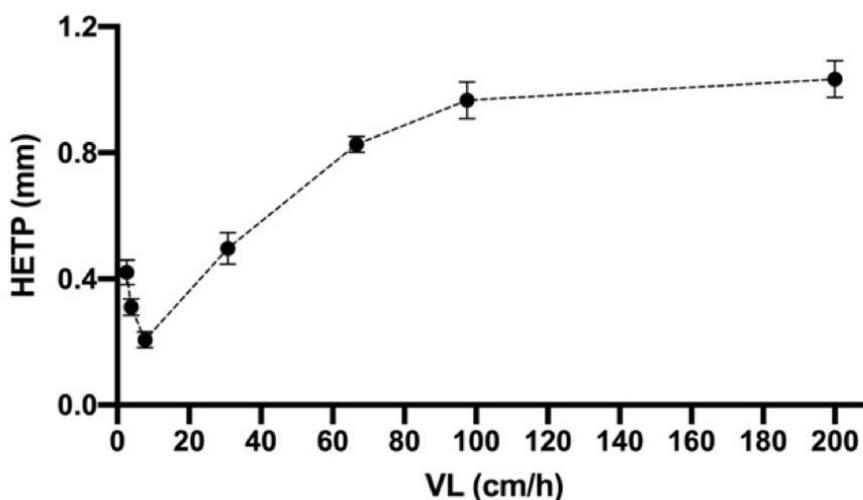


Figura 41. Gráfica de *Van Deemter* obtenida para el sistema propuesto

Como se puede observar en la figura 41, el comportamiento es similar al clásico predicho por la ecuación de *Van Deemter* con una velocidad lineal óptima alrededor de los 10 $\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$. El flujo máximo evaluado es de 200 $\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$ y es el punto más elevado del gráfico que corresponde a la región de la curva influenciada por la resistencia a la transferencia de masa. Para el resto de los valores de velocidad evaluados esta influencia negativa comienza a disminuir hasta alcanzar la velocidad óptima que corresponde a la transferencia de masa ideal. Esta gráfica reviste de gran importancia a la hora de realizar diseños experimentales que involucren a la velocidad lineal como variable del sistema, pues puede utilizarse como delimitante del intervalo de flujo a estudiar. Si bien, la operación a altas velocidades afecta el desempeño del sistema cromatográfico, en producciones masivas no es posible operar a velocidades cercanas al punto óptimo por cuestiones prácticas, ya que operacionalmente se afectaría la productividad de manera notable.

3.4.3.2 Evaluación de CEM mediante diseño experimental

De acuerdo a la metodología detallada en el acápite 2.2.4.2, en la tabla 14 se muestran los resultados obtenidos para las 11 corridas cromatográficas propuestas.

Tabla 14. Resultados del diseño experimental propuesto para la operación CEM

carga	VL	L_c	Rec_99	tiempo⁻¹
18	200	7	0.79	0.332225913621
38	12	14	0.84	0.010416666667
38	200	14	0.66	0.169491525424
28	106	10.5	0.86	0.131578947368
38	12	7	0.61	0.016949152542
18	12	7	0.98	0.019011406844
28	106	10.5	0.84	0.128205128205
18	200	14	0.99	0.196078431373
18	12	14	1	0.012195121951
38	200	7	0.37	0.285714285714
28	106	10.5	0.82	0.128040973111

Dada la necesidad de explorar diversas variables y su impacto en la separación surge la necesidad de implementar un sistema a escala de laboratorio con una altura de cama variable (entre 7 y 14 cm) ya que las corridas se podían realizar en un tiempo razonable y con un consumo de muestra que no implicara una afectación económica seria de la experimentación [184]. Además se pretendía realizar una modelación fenomenológica de la cromatografía y esto permitiría manejar cualquier escala en simulaciones “*in silico*” de la operación siempre que se demostrase su equivalencia.

El modelo resultó por defecto cuadrático para las dos variables respuestas y las tres variables experimentales. Para el caso del “Rec-99” el estadístico R-cuadrada ajustada explica un 92,66% de la variabilidad de este factor experimental. Por otra parte, efectos con P-valor menor que 0,05 demuestran la significancia estadística con un nivel de confianza del 95%. Para el segundo factor experimental “tiempo⁻¹”, el estadístico R-cuadrada ajustada representa un 99,97% de la variabilidad existente, con efectos de P-valor menor que 0,05, lo cual denota la significancia estadística para esta variable de salida. Los efectos estimados y las interacciones se realizaron sobre una base de 4 y 10 grados de libertad respectivamente. Para toda las variables respuestas se obtienen modelos de buena regresión, lo cual permite analizar la influencia de estos factores a partir de los siguientes diagramas de Pareto.

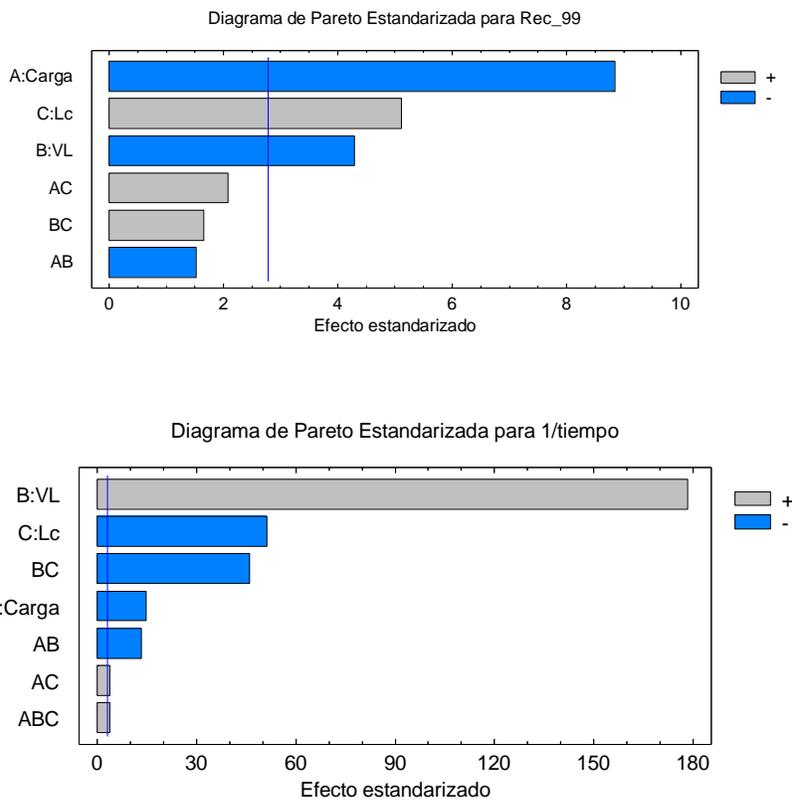


Figura 42. Diagrama de Pareto Estandarizada para los factores experimentales CEM. Arriba, “Rec_99”; Abajo, “ tiempo^{-1} ”

En la figura 42 se puede observar que la carga juega un papel fundamental y negativo para ambas respuestas, en el caso del Rec_99 se debe a que, un aumento de la carga conlleva implícitamente un mayor requerimiento de cantidad de platos teóricos para el completo procesamiento de un determinado diferencial de muestra, afectando la resolución y por ende la separación de las especies involucradas. Para la respuesta tiempo^{-1} la carga también influye negativamente pero en menor magnitud en relación a otras variables, pues como sucede en la práctica, al aumentar la carga se necesitaría mayor tiempo de aplicación.

Por otra parte, la variable independiente VL impacta de manera negativa en el Rec_99, lo cual está directamente relacionado con el análisis de la gráfica de *Van Deemter* desarrollado previamente, el cual señala que los flujos elevados pueden limitar la efectiva transferencia de masa para un sistema. En cuanto al factor de productividad tiempo^{-1} , el modelo es capaz de representar lo que sucede técnicamente, resulta lógico que la velocidad sea la variable de mayor influencia positiva en aras de obtener menores tiempos de operaciones, pero, a su vez puede limitar la separación, recobrado y pureza. Por este motivo se debe encontrar un compromiso para establecer el flujo de operación final.

Para la variable L_c se muestra que la misma influye de manera significativa y positiva en el factor Rec_99, esto puede ser explicado mediante la ecuación 3, donde si aumenta la longitud del sistema manteniendo

una calidad de empaque constante (HPTE), aumentan los números de platos teóricos (N) resultando en una mayor cantidad de unidades capaces de garantizar una transferencia de masa ideal.

Si bien, todos los aspectos mencionados son conocidos [185], pueden ser utilizados para justificar parcialmente el modelo empírico desarrollado a partir del diseño experimental. Pues, este modelo demuestra que es capaz de reproducir condiciones operativas reales y mantener una relación cuantitativa del sistema cromatográfico estudiado.

Llegado a este punto se definió un función deseo para obtener las mejores condiciones de la cromatografía, al menos dentro del intervalo analizado, donde se maximizara el Rec₉₉ y se minimizara el tiempo de operación o lo que lo mismo se maximizara tiempo⁻¹, confiriéndole un mayor peso al Rec₉₉. El espacio y el óptimo de operación para una deseabilidad de 0,82 se muestran en la figura 43, en la cual se reproduce la función que describe la intersección de las respuestas para las variables del experimento.

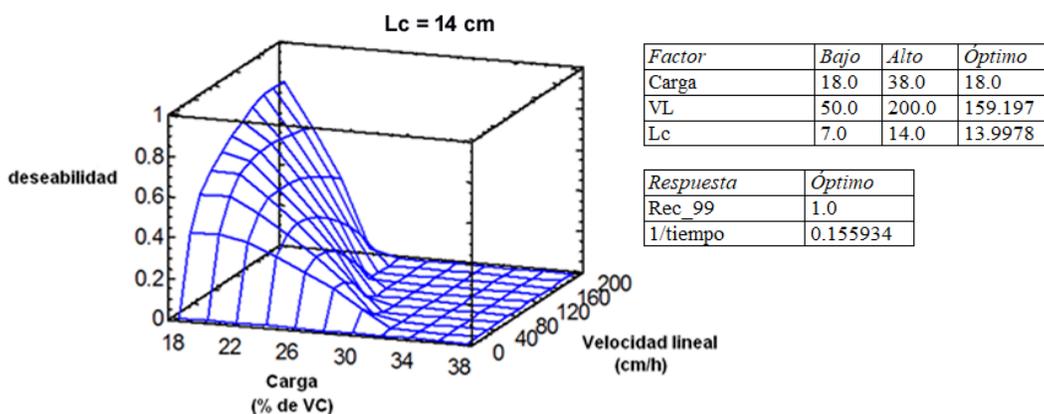


Figura 43. Superficie de respuesta estimada para optimización de operación CEM

Es de notar la importancia de minimizar la carga cuando se aumenta la velocidad de operación, lo que es consistente con un aumento de productividad pero a costa de una pérdida de eficiencia cromatográfica como fue mostrado anteriormente en este trabajo en el estudio de la dependencia de la altura del plato teórico respecto a la velocidad. Para corroborar el modelo obtenido por diseño experimental se ejecutó la corrida sugerida por la función deseo en la optimización y se determinaron las variables respuestas para la comparación con las predichas por el modelo. Para ello se sugirió en el programa estadístico maximizar tanto el Rec₉₉ como el inverso del tiempo y conferir mayor peso al recobrado para una pureza del 99%.

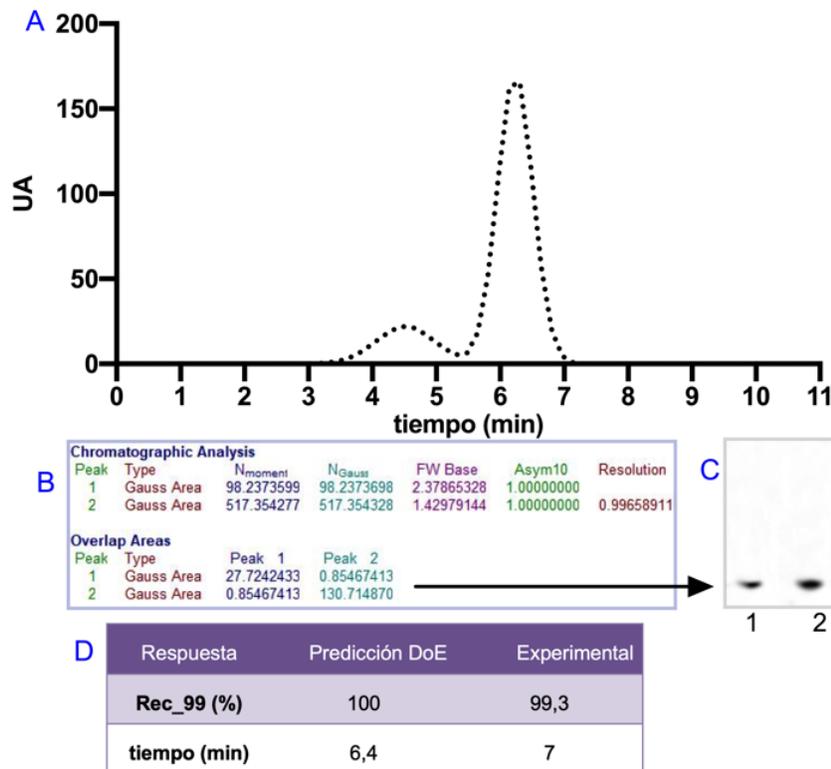


Figura 44. A: Perfil cromatográfico experimental sugerido por la función deseo; B: Análisis cromatográfico para determinar resolución del sistema y pureza de la especie r-CBB288; C: SDS-PAGE Tris-Tricina, carril 1: r-CBB288 purificado, carril 2: control positivo syn-CBB28

Las mejores condiciones proporcionadas por la función deseo fueron, carga de 18% VC, velocidad de 167,1 cm/h y una altura de cama de 14 cm. En la figura 44A se puede observar dicha corrida que a priori denota una buena separación de componentes, el análisis cromatográfico mostrado en la figura 44B permite determinar cuantitativamente la resolución del sistema, que para las condiciones evaluadas resultó ser de 0,9966, a su vez, utilizando las relaciones de sobre-solapamiento de áreas (*overlap areas*) se estimó una Rec₉₉ del 93,3% para el pico 2, el cual fue colectado y aplicado en el carril 1 del gel SDS-PAGE Tris-Tricina expuesto en la figura 44C, lo cual permite verificar que el análisis de pureza estimado mediante la gráfica experimental se realizó específicamente en relación al analito de interés r-CBB288. Como se puede observar, la señal electroforética del carril 1 correspondiente a la colección del pico 2 se encuentra a la misma altura del control positivo syn-CBB288, indicando que el análisis estimado y relativo al nivel de pureza describe al péptido de interés. Para facilitar el análisis se agrupan los resultados en la figura 44D, los mismos sugieren que el modelo empírico obtenido mediante diseño experimental presenta una aceptable predicción de las variables respuestas estudiadas para este sistema de purificación.

3.4.3.3 Modelación de la CEM utilizando el GRM

3.4.3.3.1 Caracterización del sistema cromatográfico para la modelación GRM

Para la caracterización del sistema se tomó en cuenta la misma escala donde se ejecutaron las corridas experimentales previas. Los datos y mediciones experimentales que se describen en la tabla 15 se utilizaron para estimar los parámetros iniciales del modelo matemático.

Tabla 15. Característica del sistema cromatográfico en desescalado económico para modelación GRM en etapa primaria

Características del sistema	desescalado económico
macrosoluto	4 x r-CBB288
microsoluto	1 x r-CBB288
Longitud cama (m)	0,14
Diámetro cama (m)	0,026
Flujo volumétrico (m³/s)	1,5330.10 ⁻⁷
Radio partícula (m)	8,5.10 ⁻⁵
Volumen cama (m³)	7,4292.10 ⁻⁵
Volumen de muestra aplicada (m³)	1,3373.10 ⁻⁵
Límite exclusión resina G25M (Da)	5000
Talla molecular del 4 x r-CBB288 (Da)	5200
Talla molecular del r-CBB288 (Da)	1300
Peso molecular del H₂O (Da)	18
Densidad fase móvil (kg/m³)	998
Viscosidad fase móvil (Pa.s)	0,001
τ_{or}(tortuosidad)	2
λ_0 (constante)	0,35
Volumen molar r-CBB288 (cm³/mol)	10,4
Viscosidad H₂O (cP)	1
Ψ H₂O (constante)	2,6

Introducir a la modelación parámetros iniciales calculados a partir de datos experimentales, brinda mayor exactitud a la hora del ajuste de parámetros y la validación final del modelo. Comenzar dichas estimaciones con valores cercanos a la realidad constituye un ahorro considerable de tiempo y recursos.

3.4.3.3.2 Estimación inicial de parámetros para modelo GRM

A partir de los datos mostrados en la tabla 15 se calcularon los parámetros de entrada al modelo, estos cálculos fueron realizados según la metodología descrita en el acápite 2.2.5.

Tabla 16. Resumen de los parámetros calculados para modelo GRM utilizando sistema cromatográfico en desescalado económico

Parámetros calculados	Desescalado económico
v_{macro} (m/s)	0,00053
v_{micro} (m/s)	0,00036
ϵ_b	0,54
ϵ_p	0,57
P_{eL}	307,57
D_b (según Li [49]) m^2/s	$2,41 \cdot 10^{-7}$
D_b (según Schmidt [149]) m^2/s	$9,03 \cdot 10^{-8}$
Re	0,09
ϵ_p^a (macrosoluto)	0,0057
ϵ_p^a (microsoluto)	0,5654
D_m (macrosoluto) m^2/s	$1,58 \cdot 10^{-10}$
D_m (microsoluto) m^2/s	$2,51 \cdot 10^{-10}$
D_p (macrosoluto) m^2/s	$2,70 \cdot 10^{-11}$
D_p (microsoluto) m^2/s	$1,02 \cdot 10^{-9}$
$k_{macrosoluto}$ m/s	$1,51 \cdot 10^{-5}$
$k_{microsoluto}$ m/s	$12,50 \cdot 10^{-5}$

Experimentalmente los valores de velocidades para los solutos involucrados dentro del sistema son esperados, siguiendo la lógica de que un macrosoluto con talla molecular de 5200 Da tiene menor probabilidad de penetrar los poros de la partícula de esta resina (5000 Da), abandonando el sistema mucho más rápido que un microsoluto de 1300 Da con mayor facilidad de penetración y obligado a recorrer una trayectoria más tortuosa hasta la salida del sistema. Por otra parte, la literatura indica la posibilidad de estimar a priori un valor de ϵ_b cercano a 0,4 cuando no se tienen datos experimentales, en este caso se contaba con perfiles de elución que hicieron posible determinar al menos por correlación, la fracción de porosidad externa, el resultado fue de $\epsilon_b = 0,54$. En cuanto a la fracción de porosidad interna se han reportado valores de ϵ_p mayores de 0,66 [49], para el sistema estudiado se obtuvo una menor $\epsilon_p = 0,57$ que se puede justificar debido al uso variado y prolongado de la matriz utilizada, esto puede variar la rigidez en el tiempo de las partículas porosas afectando la estructura interna original. El número de Reynold para este tipo de sistema incluye un intervalo de $10^{-3} \sim 10^3$ y el valor calculado experimental es de 0,09, este resultado

permite utilizar la correlación sugerida por Li y Gu [47, 49] para determinar el número de Peclet (ecuación 23). Con el valor de $Pe_L=307,57$ se determinó un coeficiente de dispersión axial (D_b según Li) igual a $2,41 \cdot 10^{-7} \text{ m}^2/\text{s}$. Este valor de D_b no resulta fácil de medir experimentalmente y para asegurar una correcta estimación se calculó también mediante una correlación sugerida por Schmidt [149], obteniéndose un coeficiente D_b igual a $9,03 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2/\text{s}$. Ambos valores iniciales son comparables y podrían ser utilizados para la modelación, pero analizando que el término de dispersión axial influye negativamente en la resolución cromatográfica [49] se decidió sobreestimar el modelo seleccionando la mayor dispersión axial, en este caso la calculada a partir de la correlación de Li.

Los coeficientes de difusividad molar fueron determinados a partir de la correlación que se describe en la ecuación 27, y puede ser usada para compuestos orgánicos y proteínas que tengan una talla molecular superior a los 1000 Da. Para el caso del macrosoluto, el valor de difusividad molecular fue de $1,58 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ y para el microsolutos de $2,51 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$, ambos en coincidencia con otras proteínas estudiadas para sistemas similares ($\sim 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$) [49, 146]. La acumulación de moléculas dentro de las partículas es dependiente de D_p (difusividad efectiva de poros) y se relaciona directamente con el coeficiente de difusividad molecular y la tortuosidad del sistema. Los resultados calculados y mostrados en la tabla 16 para la difusividad efectiva de poros se encuentran acorde al sistema en estudio, pues era de esperar que el coeficiente D_p para el macrosoluto tenga un valor menor ($2,70 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$) en relación al coeficiente D_p para el microsolutos ($1,02 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$), pues como se ha discutido, tiene mayor probabilidad de acceder a los poros de las partículas y una mayor difusividad molecular. Lo comentado, puede ser analizado de una mejor manera a continuación, cuando se expliquen los parámetros factor de exclusión (F^{ex}) y porosidad accesible de partícula (\mathcal{E}_p^a).

En este tipo de estudios la accesibilidad de moléculas se representa mediante el F^{ex} , como variable de la función \mathcal{E}_p^a , un valor lógico de F^{ex} para el macrosoluto estudiado sería igual a 0%, lo cual indica la imposibilidad de penetrar al interior de la partícula, teniendo en cuenta la talla molecular del macrosoluto. Para el microsolutos, un valor lógico sería $F^{ex}=100\%$, lo cual indica que la totalidad de las moléculas son capaces de penetrar la partícula porosa. Estos factores de exclusión fueron utilizados para estimar el parámetro \mathcal{E}_p^a para ambos solutos, según la metodología descrita en acápite 2.2.5.3. Para evitar singularidades matemáticas durante la modelación se hizo necesario redefinir los valores de F^{ex} a 1% y 99% respectivamente, se obtuvo entonces un valor de \mathcal{E}_p^a para el macrosoluto igual a 0,0057 lo cual significa que solamente un 0,57% del volumen ocupado por los poros dentro de la partícula es destinado a la partición del macrosoluto. Resulta evidente, que el valor de \mathcal{E}_p^a para un microsolutos sea mucho mayor, en este caso $\mathcal{E}_p^a=0,5654$ lo que significa que aproximadamente el 56,54% de los sitios destinados a la partición pueden

ser ocupados por el microsoluto [47, 146, 149]. Esto último es de gran importancia, pues está directamente relacionado con la separación y la resolución del sistema cromatográfico.

El resultado del coeficiente pelicular de transferencia de masa para el macrosoluto ($k_{\text{macrosoluto}}=1,51 \cdot 10^{-5}$ m/s) coincide con valores reportados para polipéptidos de talla molecular mayores a 5000 Da en sistemas similares [47, 149]. Sin embargo no existe en la literatura referencia de valores de coeficiente pelicular de transferencia de masa para un microsoluto orgánico del tipo r-CBB288, pues se trata de una molécula novedosa, no obstante el valor calculado fue de $k_{\text{microsoluto}}=12,50 \cdot 10^{-5}$ m/s. Al respecto, se ha reportado que la estimación experimental de los coeficientes ($k_{\text{microsoluto}}$) es sumamente difícil, motivo por el cual pueden ser ajustados mediante corridas *in-silico* [49].

Como resultado parcial se puede plantear que, los parámetros hasta el momento calculados son equivalentes con los resultados experimentales obtenidos anteriormente, se muestra también, dada la comparación del coeficiente D_p para el microsoluto ($1,02 \cdot 10^{-9}$ m²/s) con el coeficiente $k_{\text{microsoluto}}=12,50 \cdot 10^{-5}$ m/s, aún sin ajustar, se puede especular que la transferencia de masa es limitada por la difusividad efectiva intraparticular.

3.4.3.3 Simulación primaria de la operación CEM

Con los parámetros calculados en el acápite anterior se procede a la resolución del modelo matemático utilizando las ecuaciones 7 y 9. Para resolver este sistema de ecuaciones parciales, se utilizaron dos algoritmos en Matlab® (*The MathWorks, Inc., MA, USA*), para discretizar la ecuación 7 se estableció un algoritmo de elementos finitos (con elementos cuadráticos) y para resolver la ecuación 9 se utilizó un método de colocación ortogonal [47, 49, 149, 166]. El perfil virtual de la simulación primaria y su comparación con el perfil experimental de la figura 44A se puede observar en la figura 45. Si bien se pueden apreciar diferenciar notables en los niveles de residuo, el perfil virtual obtenido describe la operación optimizada con equivalencia aceptable.

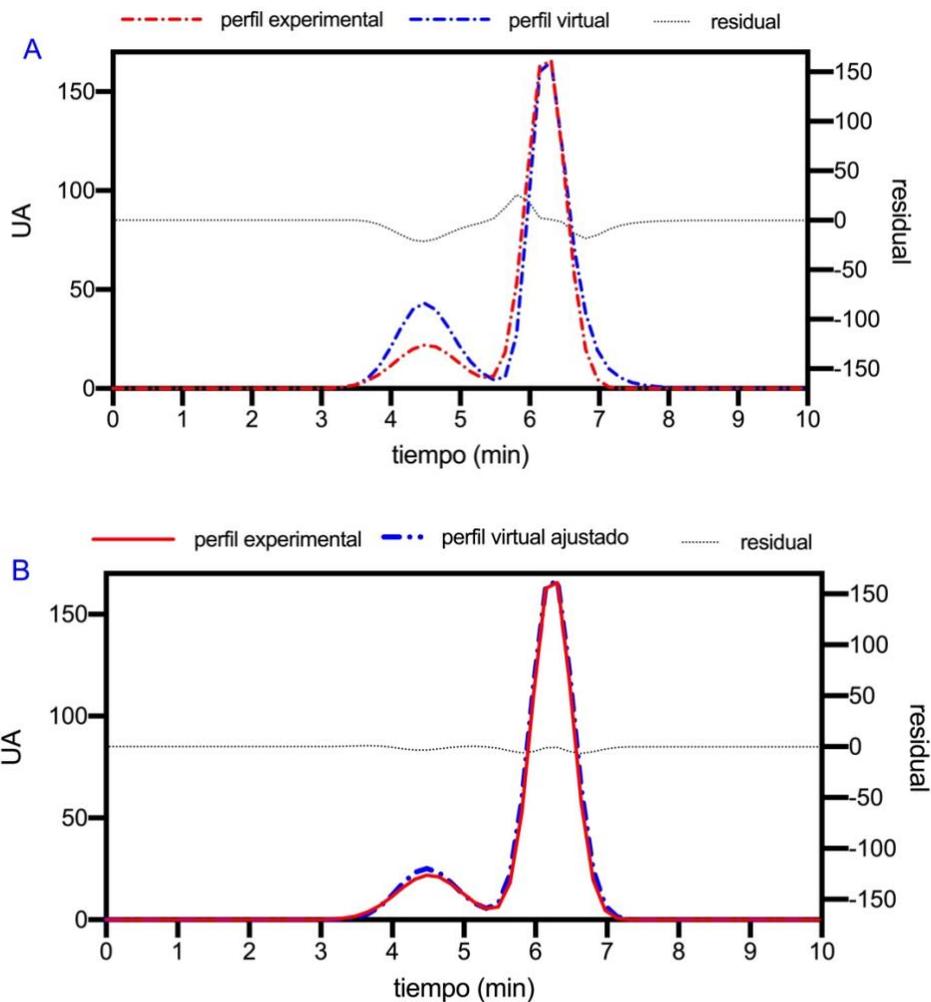


Figura 45. Figura A, comparación del perfil virtual obtenido en la simulación primaria frente al perfil experimental optimizado en el diseño experimental. Figura B, perfil virtual ajustado en simulación primaria.

Para disminuir el error en pasos posteriores y obtener parámetros del modelo refinados, se procedió al ajuste del modelo (figura 45B). En este paso los parámetros y coeficientes no resultaron sensibles al ajuste realizado, lo cual puede deberse a la simpleza de la estrategia utilizada. Pues los valores de entrada para el modelo primario fueron determinados a partir del mismo cromatograma experimental para el cual se ajustó la simulación. No obstante, se pudo comprobar que el modelo primario es representativo de la operación CEM propuesta, de acuerdo a la equivalencia gráfica mostrada, pero se requiere de una estrategia experimental de mayor rigor para refinar analíticamente los parámetros virtuales.

3.4.3.3.4 Simulación final de la operación CEM

Para alcanzar rigurosidad en el ajuste final del modelo se hace necesario mitigar el error experimental implícito en los perfiles de elución del laboratorio, por este motivo, nos dimos a la tarea de determinar la

dispersión neta ocasionada por la instalación o planta (dígase sistema sin columna cromatográfica), permitiendo de esta manera estimar los tiempos de retención con mayor exactitud.

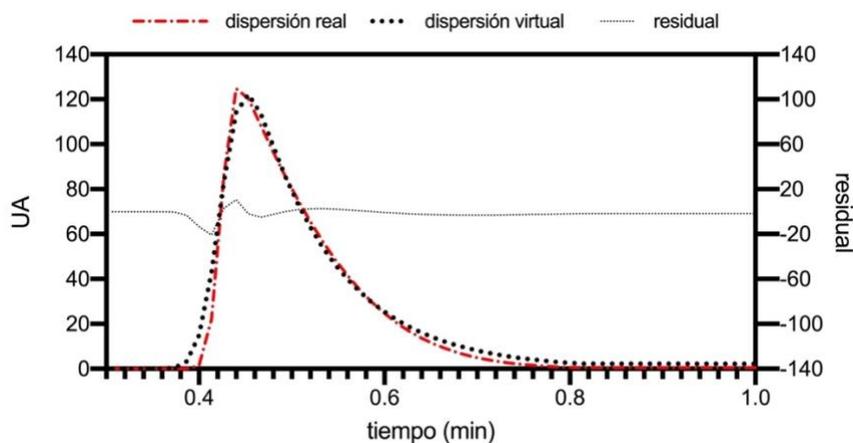


Figura 46. Perfil real de la dispersión generada por la instalación, perfil virtual de la dispersión generada por la instalación y perfil residual del ajuste.

En la figura 46 se observa el perfil real sin columna cromatográfica para la determinación del volumen de planta ó de instalación y el perfil simulado, así como el perfil residual obtenido. La instalación donde se realizan los experimentos tiene un tiempo de planta de 0,8 minutos, la velocidad de la fase móvil fue de $110 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$ correspondiente a un flujo volumétrico de $9,7 \text{ cm}^3\cdot\text{min}^{-1}$, obteniéndose un volumen del sistema sin columna es de $7,78 \text{ cm}^3$. Como se puede observar, existe buena correspondencia entre la dispersión real y la virtual, estos datos se utilizaron para la refinación del modelo primario.

Para el ajuste final se tuvo en cuenta una corrida experimental en condiciones analíticas, el perfil analítico resultante (figura 47A) se modificó según la información obtenida sobre el volumen muerto del sistema. Se inyectó a la columna una carga de muestra igual al 50% de la carga optimizada en diseño experimental, se operó a una VL de $110 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$ y se mantuvo una L_c constante. La disminución de las condiciones carga y VL se realizaron en base a la influencia que tienen estas variables sobre la respuesta del sistema para obtener una mayor separación y resolución cromatográfica.

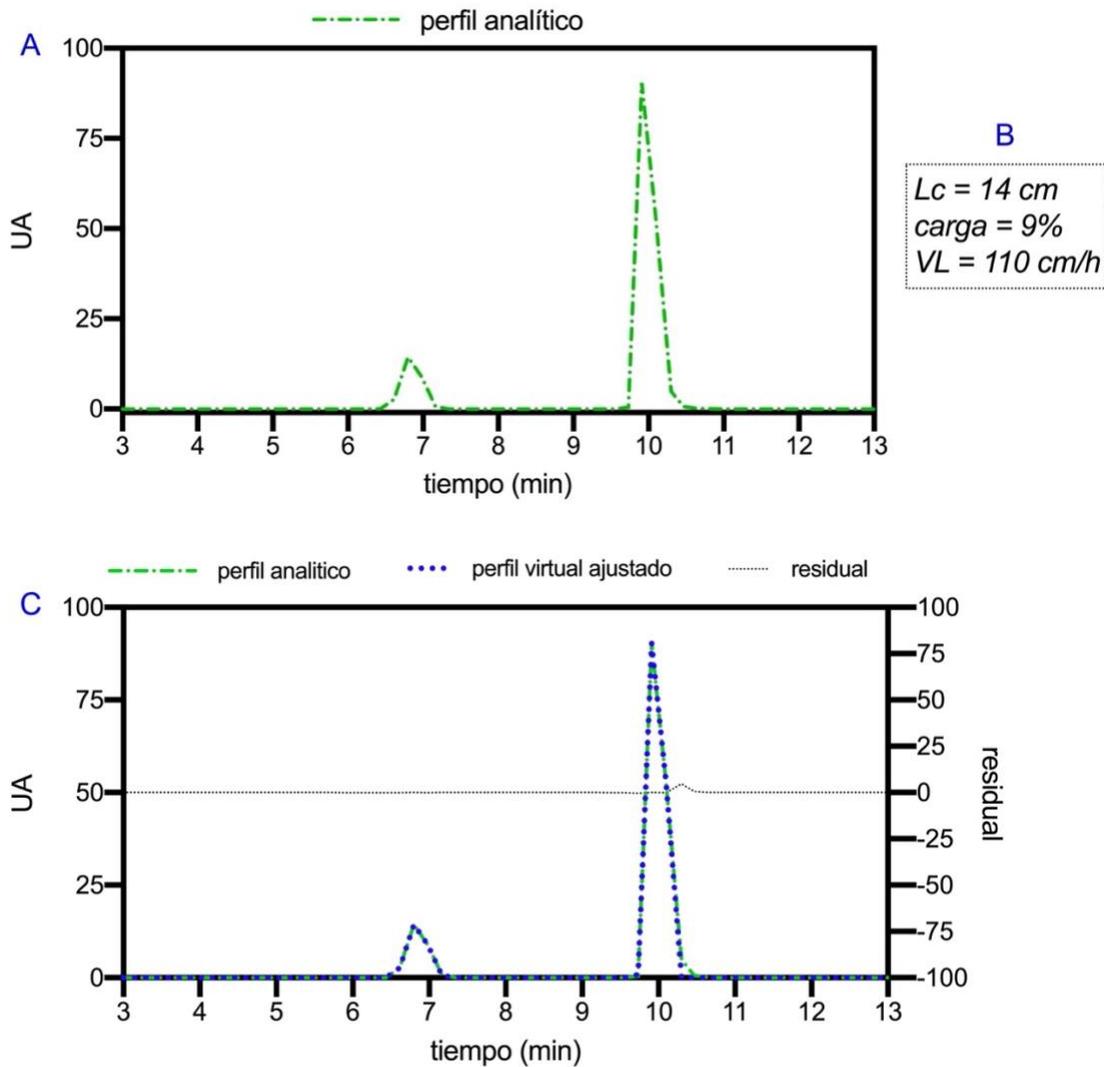


Figura 47. A, perfil de operación a condiciones analíticas. B, condiciones de operación para corrida analítica. C, perfil virtual ajustado a la operación en condiciones analíticas (ajuste final).

Como se puede observar en la figura 47C, no existen diferencias cromatográficas entre el perfil analítico experimental y la corrida virtual. En este punto se puede plantear, que el modelo nuevamente ajustado también describe las características de la operación para las condiciones analíticas ensayadas. En la tabla 17 se resumen los parámetros resultante del ajuste final del modelo.

Tabla 17. Parámetros resultante del ajuste final del modelo GRM mediante inyección analítica al sistema cromatográfico

Parámetro ajustado	Valor	descripción	Unidad
ϵ_b	0,4853	Volumen muerto	fracción
ϵ_p	0,7714	Porosidad interna	
ϵ_p^a macrosoluto	0,0386	Porosidad de partícula accesible para un soluto	
ϵ_p^a microsolutos	0,6943		
F^{ex} microsolutos	90	Factor de exclusión	%
F^{ex} macrosoluto	5		
PeL	350	Número de Peclet	adimensional

D_b	$8,7686 \cdot 10^{-8}$	Coefficiente de dispersión	$m^2 \cdot \text{seg}^{-1}$
D_p macrosoluto	$1,8810 \cdot 10^{-11}$	Difusividad efectiva intraparticular	$m^2 \cdot \text{seg}^{-1}$
D_p microsolutos	$3,2537 \cdot 10^{-9}$		
k macrosoluto	$2,0277 \cdot 10^{-5}$	Coefficiente pelicular de transferencia de masa	$m \cdot \text{seg}^{-1}$
k microsolutos	$2,2115 \cdot 10^{-4}$		

La sensibilidad de algunos parámetros durante el ajuste parece ser promovida por la integración al modelo de la dispersión real ocasionada por la instalación cromatográfica, al respecto, se puede observar la disminución del parámetro ϵ_b y el aumento de ϵ_p en relación al modelo primario que se ajustó inicialmente al perfil experimental de la figura 45 sin contemplar el volumen muerto de planta. La porosidad de partícula accesible ϵ_p^a tanto para el macro y microsolutos se relacionan directamente con el coeficiente ϵ_p , mediante el cual también se refinó el parámetro F^{ex} para ambos componentes, inicialmente introducidos al modelo con un error considerable.

Como se ha mencionado, la operación CEM ensayada en condiciones analíticas favoreció la separación y resolución mediante la disminución de la velocidad, esto se encuentra justificado en el estudio de la gráfica de *Van Deemter* y reflejado en los resultados del diseño experimental ejecutado. El aporte de disminuir la carga durante la inyección, es notable en cuanto a la obtención de picos cromatográficos más afilados, es decir, menos dispersos (ver figura 47), lo cual es característico de un aumento del número de *Peclet* [47, 49], cuya magnitud es inversamente proporcional al coeficiente D_b . La velocidad y ϵ_b también aportan a la sensibilidad de la dispersión, esto puede ser constatado en la ecuación 23, para este caso, PeL aumenta con la disminución de ϵ_b . El coeficiente D_b antes del ajuste ($2,41 \cdot 10^{-7} m^2 \cdot \text{seg}^{-1}$) fue estimado a partir de la correlación de Li y el valor final luego del ajuste fue de $8,77 \cdot 10^{-8} m^2 \cdot \text{seg}^{-1}$, este valor coincide con la estimación inicial del coeficiente realizada a partir de la correlación de Schmidt ($9,03 \cdot 10^{-8} m^2 \cdot \text{seg}^{-1}$), pero no seleccionada para la simulación inicial.

Como era de esperar, los parámetros menos sensibles a la optimización fueron, en primer lugar, la difusividad efectiva de poro (D_p) y el coeficiente pelicular (k) para los macrosolutos, pues durante este trabajo se ha mencionado en varias ocasiones el bajo porcentaje de posibilidad de que estas especies polipeptídicas penetren la partícula, al respecto, en la tabla 17 se puede consultar el valor ajustado de F^{ex} , así como la accesibilidad a las partículas porosas expresado como la fracción ϵ_p^a . Por otra parte, la baja sensibilidad del coeficiente D_p para el microsolutos puede estar relacionada al parámetro τ_{tor} , pues estimar la tortuosidad de un poro no es fácil de medir experimentalmente, para realizar estudios de estimación de τ_{tor} se requiere el uso de diferentes tipos de partículas porosas y normalmente se realizan en columnas de L_c superiores a 30 cm [49, 146, 164]. Es conocida la relación directa que tiene la velocidad, la difusividad molecular, la porosidad externa ϵ_b y el tamaño de la partícula porosa (R_p) con el coeficiente pelicular k (ver ecuaciones 30, 31 y 32), Estas ecuaciones describen la relación de estas variables cuando se opera a flujos

bajos con valores de Reynolds entre 0,0015 y 55, (valor de Re ajustado en inyección analítica igual a 0,07), estos valores son comunes en operaciones cromatográficas líquidas de proteínas [49], en estas condiciones se requieren perturbaciones notables de velocidades para visualizar un cambio en el coeficiente k . Durante el ajuste tampoco resultó sensible la D_m , lo cual puede deberse a una correcta estimación inicial de este parámetro y en el caso del R_p , el valor se mantuvo constante durante toda la experimentación.

No obstante, los resultados alcanzados sugieren que se realizó una acertada estimación inicial del coeficiente pelicular de transferencia de masa para el microsoluta, según los niveles de separación y resolución cromatográfica alcanzados, incluso en etapas tempranas de la simulación, cuando algunos parámetros de entrada no estaban estimados con exactitud. Esto resulta coherente si se tiene en cuenta que durante toda la etapa de simulación la comparación de los respectivos valores de D_p y k para el microsoluta sugieren que la resistencia a la transferencia de masa ocurre mayoritariamente durante el paso de difusión intraparticular o difusión en el poro (ver figura 21).

Los resultados obtenidos reflejan en una primera instancia la importancia de utilizar corridas experimentales en condiciones analíticas que favorezcan la correcta estimación de parámetros. Es recomendable también reducir los errores asociados a la dispersión mediante la inyección de una sustancia traza al sistema sin columna. En otra instancia, si bien, el modelo final ajustado es capaz de describir los perfiles de elución de la operación CEM propuesta con un mínimo error, se hace necesario validar el modelo explorando espacios de trabajos diferentes y en condiciones extremas que no se tuvieron en cuenta durante la modelación matemática.

3.4.3.3.5 Validación del modelo GRM para la operación CEM

Para validar el modelo final ajustado se ejecutaron corridas virtuales a condiciones extremas ensayadas en el diseño experimental desarrollado. Esto permite asegurar que la equivalencia del modelo en condiciones de operación externas al espacio experimental en el cual fue procesado. Las condiciones de la validación, así como la comparación de los perfiles experimentales y virtuales se muestran en la figura 48.

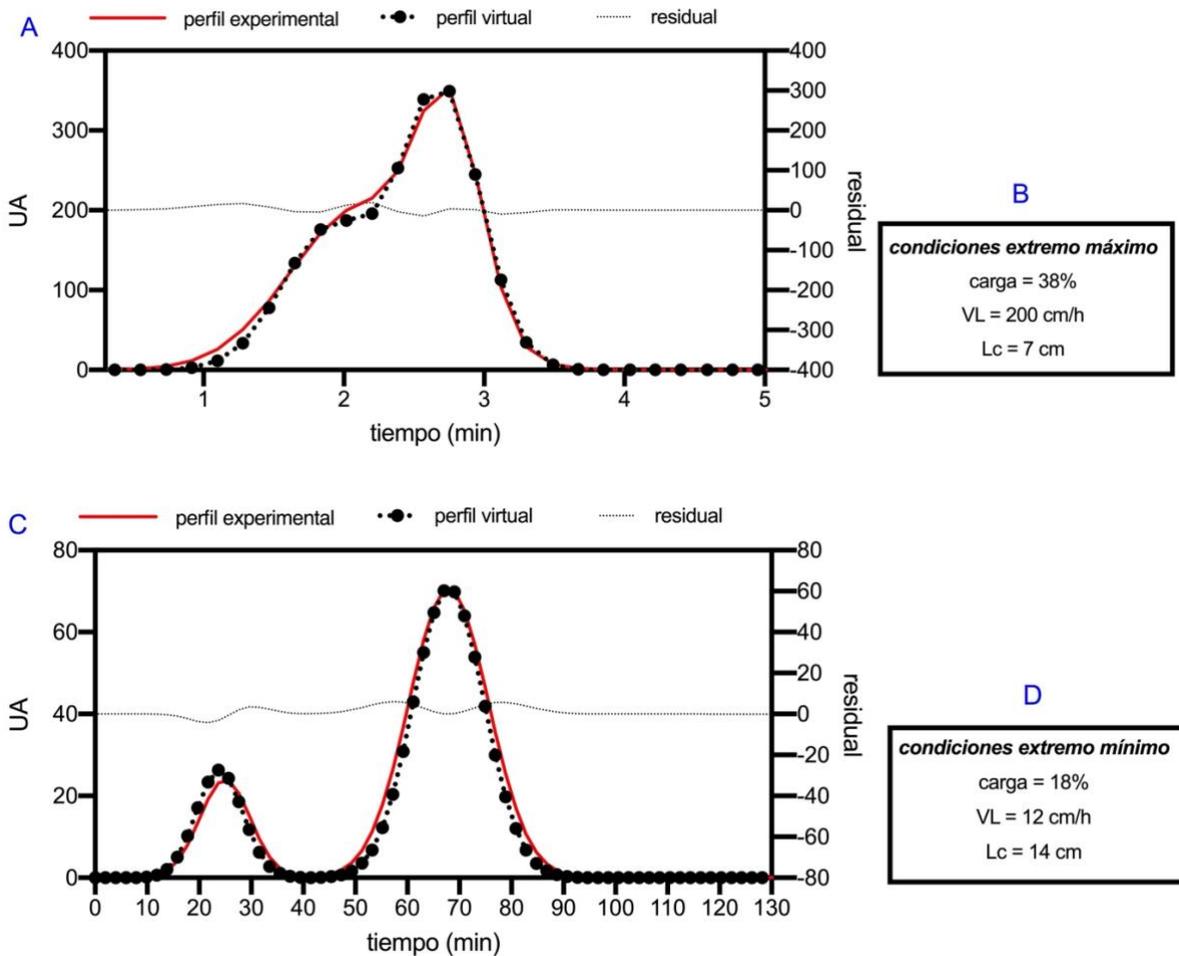


Figura 48. Comparación de perfiles experimentales y los correspondientes perfiles virtuales .A, perfil experimental vs perfil virtual en “extremo máximo” del diseño experimental. B, condiciones del punto experimental “extremo máximo”. C, perfil experimental vs perfil virtual en “extremo mínimo”. D, condiciones del punto experimental “extremo mínimo”.

Como se puede apreciar el modelo final ajustado describe el comportamiento de la separación entre las especies peptídicas en distintas condiciones de operación. Esto reviste suma importancia ya que al ser un modelo dinámico permite extrapolar sus predicciones hacia regiones de operación disímiles y de mayor conveniencia para futuras escalas productivas del péptido de interés r-CBB288.

3.4.4 Caracterización del producto r-CBB288 mediante TMS y MTT

Una vez desarrollado y optimizado el proceso recombinante propuesto para la obtención del péptido de interés r-CBB288, se procede a comprobar la funcionalidad del producto final a partir de la comparación con el homólogo sintético syn-CBB288, para lo cual se utilizaron las técnicas de TMS y MTT previamente establecidas en los acápites 3.1 y 3.2 como medidas de la afinidad y la neutralización de la actividad citotóxica inducida por el TNF.

De manera particular para r-CBB288, los perfiles o curvas de afinidad resultantes de la técnica TMS (figura 49) describen la interacción del péptido en el intervalo micromolar. En este caso, el ensayo indica una K_D de $2,39 \times 10^{-5} \pm 0,15 \text{ mol.L}^{-1}$ en correspondencia con el perfil de afinidad obtenido en la figura 29 para el syn-CBB288 ($1,03 \times 10^{-5} \pm 0,05 \text{ mol.L}^{-1}$), cuando la misma técnica fue establecida para analizar al prototipo sintético syn-CBB288, de forma tal que pudiese ser utilizado como control positivo durante toda la investigación.

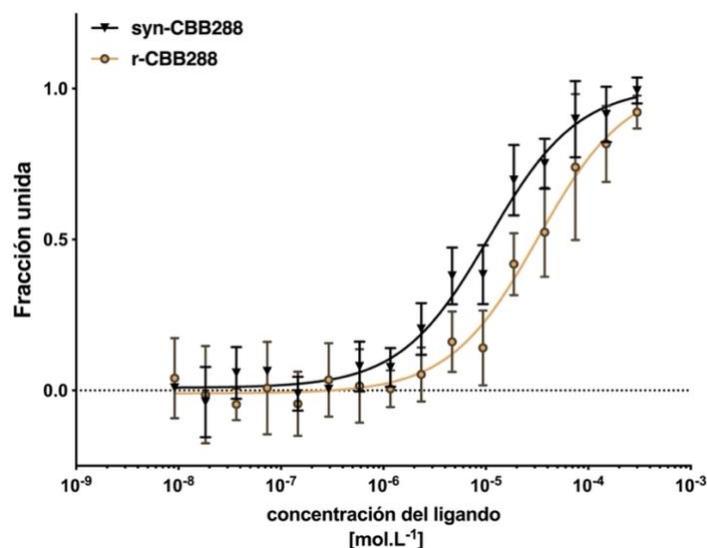


Figura 49. Comparación de las curvas de afinidad del péptido r-CBB288 y syn-CBB288 respecto al blanco molecular TNF. La TMS fue desarrollada usando TNF marcado con fluorescencia y la interacción transcurrió a una concentración variable de los péptidos ligandos. Los datos se presentan como la desviación estándar de tres réplicas ensayadas. La curva de afinidad individual para el prototipo sintético syn-CBB288 puede ser analizada en la figura 29.

El intervalo de concentración del ligando que asegura un 50% de la fracción unida, descrito tanto para syn-CBB288 como para r-CBB288, guardan semejanza con estudios realizados durante el diseño de moléculas que interaccionan efectivamente con el TNF, cuyas características fisicoquímicas no solo favorecen la unión, sino que también son capaces de interferir en la formación del complejo citoquina-receptor, neutralizando la actividad citotóxica inducida del TNF [56, 61, 186]. La similitud entre los perfiles de afinidad mostrados en la figura 49 fueron esperados, de acuerdo a los cálculos de energía libre de unión determinados mediante el análisis de dinámica molecular de los complejos TNF/r-CBB288 y TNF/syn-CBB288. Este análisis computacional puede ser consultado en el acápite 3.3, el estudio concluye en que ambos péptidos (sintético y recombinante) presentan modos de unión similares y las modificaciones peptídicas descritas entre ambos no alteran la afinidad hacia la diana molecular TNF.

Para verificar si el r-CBB288 presenta actividad neutralizante de la citotoxicidad inducida por el TNF se realizó el ensayo de MTT que se muestra en figura 50, esta técnica *in vitro* también fue previamente mostrada en el acápite 3.2 para determinar la actividad neutralizante del prototipo sintético syn-CBB288 y decidir usarlo o no como control positivo.

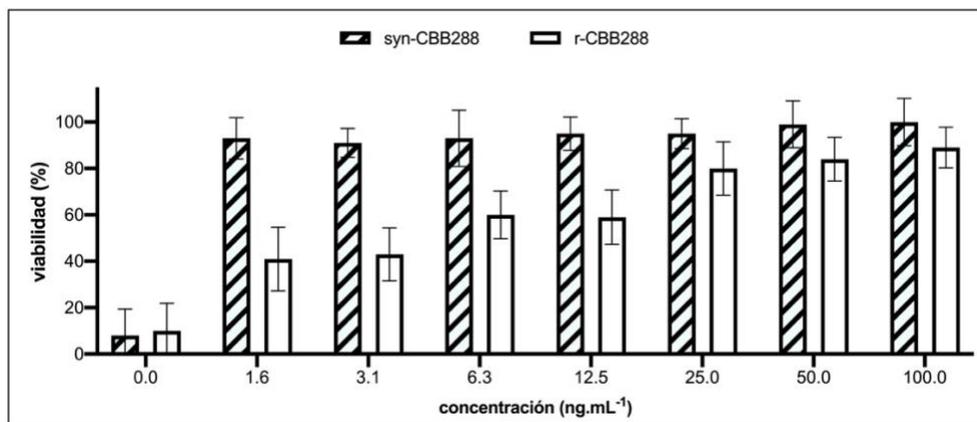


Figura 50. Ensayos de neutralización de citotoxicidad inducida con TNF (25 ng.mL⁻¹) en células L929 a diferentes concentraciones de los péptidos (r-CBB288 y syn-CBB288). Eje X, representa la concentración de los péptidos y el eje Y indica el porcentaje de viabilidad celular determinado después de 24 horas. El porcentaje de viabilidad celular fue calculado mediante la ecuación 16, donde para el grupo control las células fueron tratadas con medio RPMI y solamente D-Actinomycin. Todos los datos se presentan como la desviación estándar de tres réplicas experimentales.

Los resultados de la actividad neutralizante *in vitro* mostrado en la figura 50 sugieren que el intervalo de concentraciones evaluado, específicamente a una concentración de 100 ng.mL⁻¹, r-CBB288 neutraliza parcialmente la actividad citotóxica inducida por el TNF, alcanzando niveles de recuperación de la actividad celular próximos al 79%. Bajo las mismas condiciones experimentales el prototipo sintético syn-CBB288 alcanza niveles cercanos al 100% de citoprotección. A pesar de que la viabilidad celular recuperada por el péptido recombinante r-CBB288 es ligeramente inferior a la del control positivo syn-CBB288, los resultados obtenidos son aceptables si se tienen en cuenta que estos llegan a superar algunos niveles de viabilidad celular descritos en la literatura sobre análisis de los efectos neutralizantes de péptidos frente a la actividad del TNF [25, 26].

En resumen, hasta este punto, los resultados alcanzados demuestran la producción recombinante exitosa del péptido r-CBB288. Los perfiles termoforéticos del producto final se encuentran en correspondencia con el perfil del control positivo. Las curvas de afinidad obtenidas se complementan con la estimación de la energía libre en el estudio de dinámica molecular. Las constantes de afinidad obtenidas para el prototipo sintético y el recombinante son comparables con valores de K_D reportado para péptidos anti-TNF y además r-CBB288 demuestra actividad biológica para proteger células sensibles de los efectos del TNF.

3.5 Factibilidad técnico-económica del proceso recombinante

3.5.1 Simulación general del proceso recombinante

El proceso recombinante con las operaciones optimizadas a escala de laboratorio se simuló para una obtención final de 2 gramos de r-CBB288 por lote y para determinar las dimensiones de las distintas operaciones unitarias involucradas, se procedió en “modo diseño” para simular el completo procesamiento de 40,5 g de biomasa proveniente de la etapa de fermentación. La simulación mostrada en la figura 51 se realizó utilizando la herramienta computacional *SuperPro Designer* versión 10.

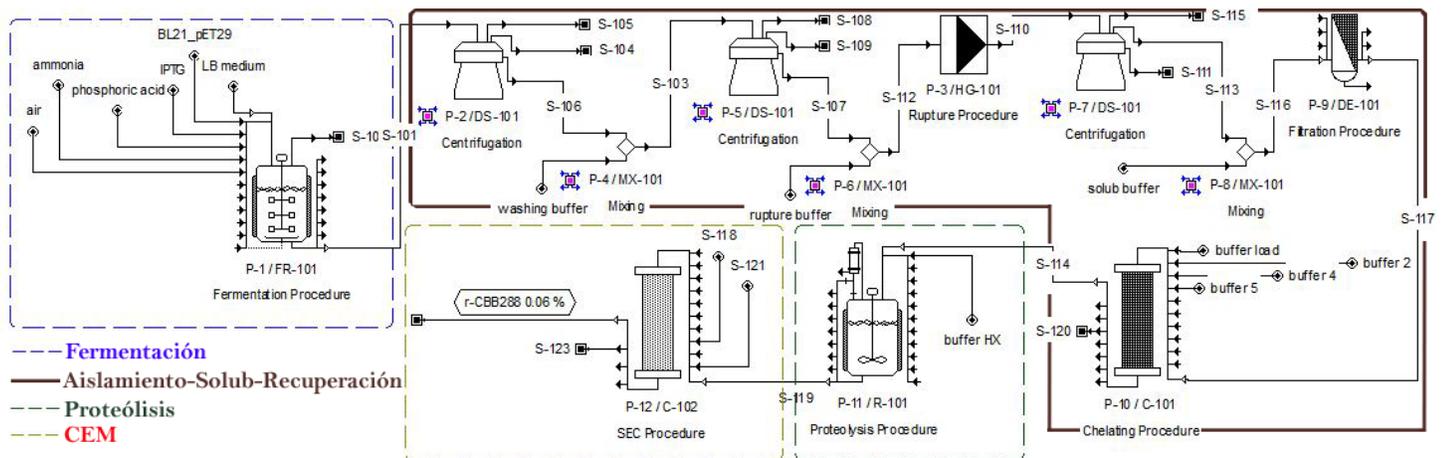


Figura 51. Diagrama de flujo correspondiente a la simulación en *SuperPro Designer* del proceso recombinante para la obtención de 2 gramos de producto de interés. Representación realizada en modo de operación por lote, las operaciones se activaron en modo diseño y se programó un tiempo de operación disponible para un año de campaña (7920 horas).

La mismos niveles de recobrado (tabla 18) y condiciones de operación estudiados a escala de laboratorio se introdujeron a la simulación, cada operación fue ajustada para representar los recobrados reales obtenidos durante la experimentación. Sin embargo, los tiempos de operación aumentaron con la adición de actividades de índole productivo, dígame tiempos de esperas relacionados con la preparación de muestras (*hold*), acondicionamientos de equipos (*setup time*), higienizaciones (*CIP*) y esterilizaciones (*SIP*).

Esto no solo aporta realismo desde la perspectiva del tiempo, también permite estimar los costos operativos relacionados al consumo de materias primas y energía con mayor exactitud. La distribución final del tiempo del proceso recombinante para un lote productivo se muestra en la figura 52.

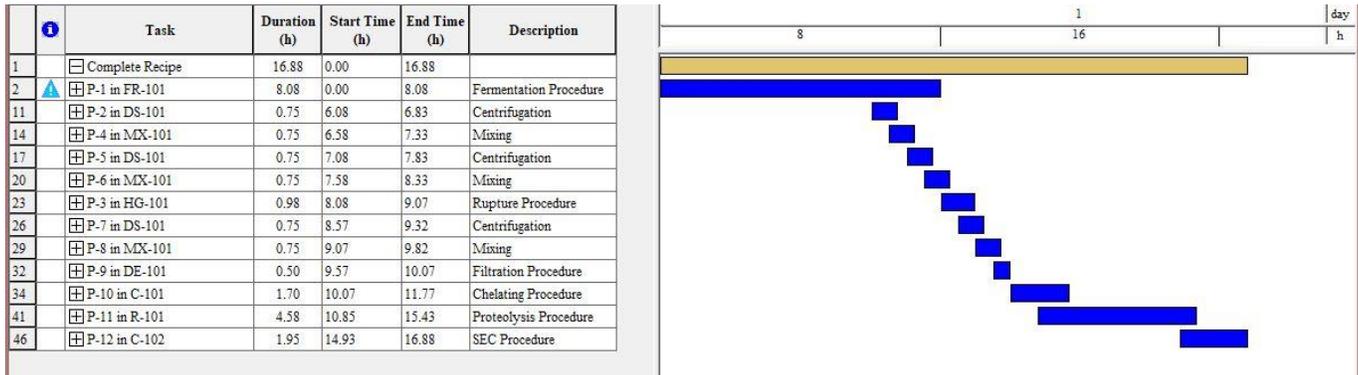


Figura 52. Diagrama Gantt del proceso simulado para un lote productivo

Como bien se muestra en la figura 52 y 53, la Fermentación en *Escherichia coli* (P-1 in FR-101) resultó ser la etapa limitante con una duración de 8,08 horas que incluyen al acondicionamiento y un paso de CIP, asumiendo que los precultivos se encuentran disponibles. El resto de las actividades se mantuvieron con tiempos aceptables de procesamiento que evitaron un colapso de la productividad por demoras de magnitud considerables..

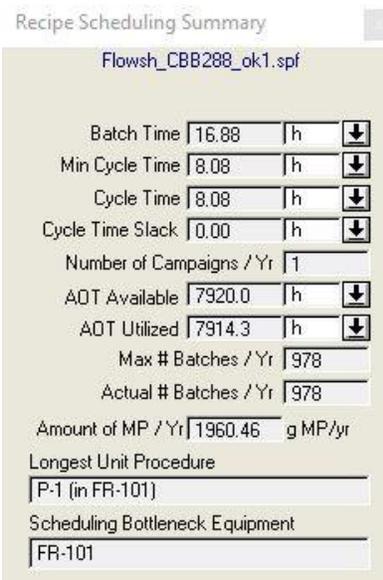


Figura 53. Captura de pantalla, resumen de la programación para un año de campaña

El tiempo mínimo para comenzar nuevamente un lote corresponde al tiempo de la operación limitante (*cycle time*). La duración de un lote completo se estima finalmente en 16,88 horas permitiendo la realización de aproximadamente 1,4 lotes por días (en modo *Annual Operating Time = 7914,3 horas*), con una proyección de 978 lotes/año en donde se reflejan además posibles paradas por concepto de rotura de equipos y lotes rechazados por calidad.

Para relacionar las distintas transformaciones de materia (biomasa-cuerpos de inclusión-tándem-péptido) y tener una representación exacta del balance masa para cada componente fundamental (ver tabla 18), se

utilizaron los resultados de las corrientes de salida principales S-101, S-103, S-112, S-110, S-116, S-117, S-114, S-119 y S-122(r-CBB288 0.06%) correspondientes al diagrama de flujo de la figura 51.

Tabla 18. Resumen de las transformaciones y balance masa para los principales componentes del proceso recombinante propuesto. La letra P seguida de un número corresponde a las distintas operaciones presentadas en el diagrama de flujo de la figura 51.

	Fermentación (P-1)	Centrífuga (P-2) lavado (P-4)	Centrífuga (P-5) lavado (P-6)	Ruptura (P-3)	Centrífuga (P-7) Solubilización (P-8)	Filtración (P-9)	IMAC (P-10)	Proteólisis (P-11)	CEM (P-12)
Biomasa (g)	40,5	35,0	28,0	-	-	-	-	-	-
CI* (g)	-	-	-	22,9	-	-	-	-	-
tándem (g)	-	-	-	-	6,5	3,3	2,8	-	-
r-CBB288 (g)	-	-	-	-	-	-	-	2,2	2,0

**cuerpos de inclusión*

Como se comentó anteriormente el proceso fue diseñado para procesar una entrada de 40,5 g de biomasa y obtener como producto final 2 g de r-CBB288. Cuando se reproducen estas actividades mediante una campaña productiva de 1 año, se hace posible estimar una tasa de producción igual a 1960,5 g r-CBB288/año.

Desde una perspectiva tecnológica se puede plantear que las distintas operaciones propuestas durante la parte experimental de este trabajo y luego reproducidas como una plataforma productiva en el simulador, podrían funcionar para la obtención masiva del péptido recombinante en cuestión. No obstante, se hace necesario analizar la relación del proceso con los indicadores económicos pertinentes.

3.5.2 Análisis de factibilidad para el proceso recombinante

Para el análisis económico se consideraron varios aspectos, en primer lugar se asumió la construcción de una planta o acondicionamiento de un local cuyo período de preparación fue de diez meses con otro mes para la puesta en marcha. El tiempo de vida para el proyecto (*Project Lifetime*) se fijó para una evaluación de 5 años, estimando una inflación del 4% en cuanto al costo del equipamiento (ver figura 54).

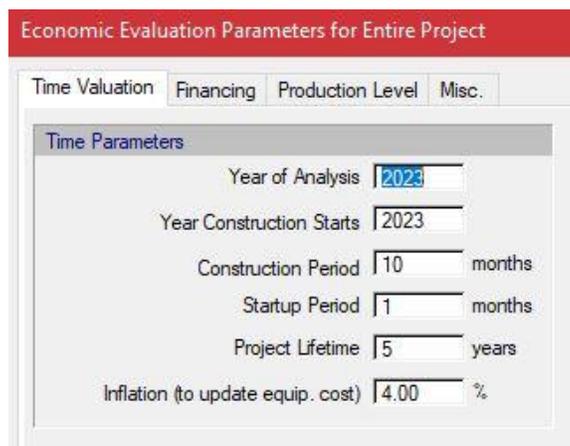


Figura 54. Captura de pantalla correspondiente a la introducción de los parámetros de tiempo de evaluación para 5 años de proyecto a partir del 2023.

Se consideró también una variabilidad en los niveles de producción para los dos primeros años de la evaluación (figura 55-izquierda), a falta de información sobre los posibles gastos por concepto de *marketing* y *royalty*, se introdujo un valor de imposiciones del 40%. Se tuvieron en cuenta también la selección de todas la opciones itemizadas por el mismo programa que tributaran a los costos operacionales (figura 55-derecha).

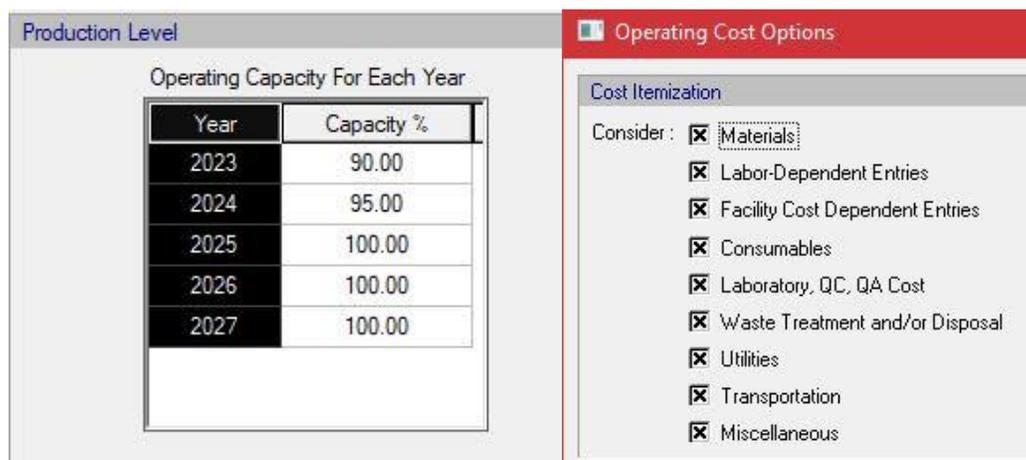


Figura 55. Captura de pantalla, introducción de la variabilidad de la capacidad productiva para cada de año de evaluación (izquierda) y selección de las opciones que tributan a los costos de operación (derecha).

Todas las corrientes de entrada y salida del proceso fueron clasificadas acorde a su función, las corrientes de entrada en todos los casos contenían soluciones y reactivos por lo que se clasificaron como Materia Prima. Por otra parte las corrientes de salida se clasificaron como emisiones y desechos acuosos, a excepción de la corriente S-122 r-CBB288 0.06% que se clasificó como corriente de ganancias o ingresos (*Revenue*). El precio de todas las materias primas y consumibles utilizados se establecieron a partir de la base de dato del programa actualizada para el año 2023. La combinación de estos representa

aproximadamente el 10% de los costos de operación. En este sentido los *ítems* que más afectan los costos de operación son, el uso de instalaciones (luz, agua, tuberías, sistema de agua para inyección-*WFI*, fuentes de energía y vapor de agua utilizado mayormente para la esterilización del fermentador) con un 47,38%, seguido de los costos asociados a los recursos humanos que representan el 37,24% de los gastos por operativos.

Para el caso del equipamiento se tuvieron en cuenta los precios ofrecidos por el simulador, pero, como estrategia de sobre-diseño y presionando el análisis hacia un escenario desfavorable, se introdujeron manualmente los precios de la base de datos con un incremento del 20% en relación al precio original. La cantidad, la nomenclatura de los equipos y el costo unitario de los mismos, se muestran en la figura 56.

2. MAJOR EQUIPMENT SPECIFICATION AND FOB COST (2023 prices)

Quantity/ Standby/ Staggered	Name	Description	Unit Cost (\$)	Cost (\$)
1 / 0 / 0	FR-101	Fermentor Vessel Volume = 5.00 L	558,000	558,000
1 / 0 / 0	DS-101	Disk-Stack Centrifuge Throughput = 5.02 L/h	124,000	124,000
1 / 0 / 0	HG-101	Homogenizer Rated Throughput = 11.92 L/h	26,000	26,000
1 / 0 / 0	DE-101	Dead-End Filter Filter Area = 10.00 m ²	46,000	46,000
1 / 0 / 0	C-101	PBA Chromatography Column Column Volume = 0.98 L	151,000	151,000
1 / 0 / 0	R-101	Stirred Reactor Vessel Volume = 3.16 L	461,000	461,000
1 / 0 / 0	C-102	GFL Chromatography Column Column Volume = 15.80 L	189,000	189,000
		Unlisted Equipment		389,000
		TOTAL		1,944,000

Figura 55. Captura de pantalla correspondiente al costo unitario de compra del equipamiento individual durante la simulación del proceso recombinante para producir de 2 g de producto final.

Incluso sobreestimando el precio, el costo de la adquisición del equipamiento conforma apenas un 15,9% de los costos de inversión cargados al proyecto que se pueden observar en la figura 56 (\$US 12.236.647). El principal tributo al coste de inversión viene dado por el capital fijo directo (DFC) con un monto de \$US 11.432.058. Por otra, para simular económicamente el proyecto se necesitó asignar un precio de venta al producto principal r-CBB288, para estimar este valor se utilizó información sobre el Adalimumab como potencial competidor anti-TNF [10, 11]. El margen de precio de venta para el producto r-CBB288 se estimó cercano a los 18.000 \$US/g producto, pero, siguiendo la estrategia de sobre-diseño se decidió afectar las ganancias seleccionando un precio de venta más bajo, igual a 12.000 \$US/g. Bajo todos estos supuestos se ejecutó el análisis económico, los indicadores de factibilidad relacionados pueden ser observados en la figura 56.

1. EXECUTIVE SUMMARY (2023 prices)

Total Capital Investment	12,237,000 \$
Capital Investment Charged to This Project	12,237,000 \$
Operating Cost	6,843,000 \$/yr
Revenues	23,525,000 \$/yr
Batch Size	2.00 g MP
Cost Basis Annual Rate	1,960 g MP/yr
Unit Production Cost	3,490.73 \$/g MP
Net Unit Production Cost	3,490.73 \$/g MP
Unit Production Revenue	12,000.00 \$/g MP
Gross Margin	70.91 %
Return On Investment	99.55 %
Payback Time	1.00 years
IRR (After Taxes)	142.11 %
NPV (at 7.0% Interest)	28,380,000 \$

MP = Flow of Component 'r-CBB288' in Stream 'S-122'

Figura 56. Captura de pantalla correspondiente al resumen ejecutivo de la evaluación financiera realizada para 5 años de proyecto.

Como se puede notar, la plataforma productiva, dada la distribución de operaciones realizada en el acápite anterior, es capaz de procesar 2 g/lote, para una tasa anual de 1.960 g/año. Bajo estas condiciones se genera un margen bruto (*Gross Margin*) del 70,91% con una posibilidad de recuperar la inversión del 99,55% (*Return on Investment*) en el intervalo de 1 año (*Payback Time*). Resulta válido comentar que los tiempos de recuperación promedios para procesos biotecnológicos se encuentran entre 0,5-0,8 años [156, 187], ya que estos se caracterizan por tener productos novedosos de elevado valor agregado y una alta demanda. El valor de 1 año para este caso puede deberse a las consideraciones conservadoras realizadas al sobreestimar los costos operativos, y a la vez subestimar los ingresos generados. No obstante, los indicadores TIR (*IRR*) y VAN (*NPV*) cumplen con los requisitos esperados para este tipo de proyectos. Lo cual significa que se puede aumentar el interés hasta un 142,11% y aun así es posible saldar la deuda adquirida por concepto de inversión capital.

Los resultados indican que efectivamente, a futuro, es posible establecer un proceso productivo para la obtención del péptido r-CBB288 que permita la reproducción incluso a escalas industriales de los resultados experimentales alcanzados en esta investigación. El proceso propuesto y aquí discutido, de acuerdo con los indicadores económicos obtenidos, sugiere a priori que el esquema de operaciones seleccionado para la producción del péptido r-CBB288 se puede considerar como una plataforma costo factible.

4. Conclusiones

La funcionalidad *in vitro* e *in silico* del péptido recombinante r-CBB288 se evaluó a partir de los ensayos de TMS, MTT y mediante la simulación del complejo péptido-TNF en PyMOL. El desarrollo de estas técnicas experimentales entregó resultados analíticos fidedignos sobre la habilidad que tiene el producto final de interactuar con la diana molecular TNF. Los perfiles termoforéticos permitieron determinar con exactitud las constantes de afinidad (K_D), las cuales son comparables a otras moléculas diseñadas para el bloqueo de la actividad del TNF. Por otra parte, el porcentaje de viabilidad recuperada de células sensitivas a la presencia de TNF llega a superar el 65% obtenido en estudios similares. Además, el estudio de dinámica molecular realizado, en términos energéticos, valida la similitud de los valores de K_D respecto al control positivo syn -CBB288. Todo esto sugiere que, el péptido diseñado y producido por vía recombinante tiene la capacidad de unirse específicamente a la citoquina diana y su vez regular la actividad citotóxica inducida por el TNF en el modelo celular L929.

Los resultados de los diseños experimentales para el estudio de las distintas operaciones unitarias propuestas indican que la obtención del péptido CBB288 diseñado puede desarrollarse mediante un proceso recombinante. Se logró la optimización de las operaciones fundamentales del proceso a través de modelos empíricos y fenomenológicos con buenos indicadores de regresión, bajos niveles de residuales y con resultados aceptables en las instancias de validación. La validación dinámica del GRM para la operación crítica CEM demostró una capacidad predictiva con bajo error durante la simulación de perfiles de elución, sugiriendo que el modelo desarrollado permite inferir el comportamiento de la operación cromatográfica hacia disímiles espacios de trabajo.

El presente estudio demostró, a partir de la simulación en SuperPro Designer del proceso general constituido por las operaciones optimizadas, que la plataforma recombinante propuesta y desarrollada en esta investigación para producir el péptido r-CBB288, resulta técnicamente viable y económicamente factible según los indicadores económicos obtenidos.

5. Nomenclatura

TNF: factor de necrosis tumoral, del inglés, *Tumor Necrosis Factor*

FDA: Administración de Drogas y Alimentos, del inglés, *Food and Drug Administration*

PD: del inglés, *Phage Display*

CBB288: Nombre asignado para el péptido anti-TNF diseñado por *Phage Display*

syn-CBB288: prototipo sintético del péptido CBB288

r-CBB288: prototipo recombinante del péptido CBB288

K_D : constante de afinidad expresada en unidades de concentración

KDa : kilo-dalton

TMS: Termoforesis en microescala

MTT: Ensayo colorimétrico basado en la reducción de la sal de tetrazolium a una sal de formazán

ELISA: ensayo de inmunodetección, del inglés, *enzyme-linked immunosorbent assay*

HX: abreviatura de hidroxilamina

CEM: cromatografía de exclusión molecular

GRM: modelo general, del inglés, *General Rate Model*

CADC: Cultivo de alta densidad celular

LB: del inglés, *Lysogeny Broth*

OD: nivel de oxígeno disuelto en operación fermentativa (%)

DO: densidad óptica

ROS: especies de oxígeno reactivas, del inglés, *Reactive Oxygen Species*

IPTG: reactivo isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido para inducir la expresión génica

DTT: reactivo DL-Dithiothreitol, para la estabilización de enzimas y algunas proteínas

HPLC: Cromatografía líquida de alto desempeño, del inglés, *High Performance Liquid Chromatography*

G25 Medium: tipo de resina cromatográfica basada en la exclusión por talla (cutoff= 5 kDa)

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico, del inglés, *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel*

Wester Blot: técnica inmunoanalítica para identificar proteínas específicas en una mezcla compleja de proteínas

UV: ultravioleta

UA: unidades de absorbancia

VC: volumen de columna

%VC: porcentaje de volumen de columna

VL: velocidad lineal

Rec_99: recobrado para un 99% de pureza (%)

Q: flujo volumétrico (cm³/h)

HETP: altura equivalente de platos teóricos, del inglés, *High Equivalent Theoric Plate* (mm)

N: eficiencia cromatográfica

L_c: longitud de cama de una columna cromatográfica (m ó cm)

BSA: Albúmina de suero bovino, del inglés, *Bovine serum albumin*

SPD: abreviatura del SuperPro Designer

RPMI: medio celular usado en cultivo de células humanas, del inglés, *Roswell Park Memorial Institute*

DMSO: reactivo dimetil sulfóxido, usado para la criopreservación de células

PyMOL: Visor molecular de código abierto

NVT: condición de volumen constante durante simulación en PyMOL

Temp: en gráfico de optimización, temperatura (°C)

cHX: en gráfico de optimización, concentración de hidroxilamina (mol.L⁻¹)

MM-PBGB(SA): método que combina aspectos de energía mecánica molecular con Poisson-Boltzmann para la estimación de la afinidad en un determinado sistema.

pET29a: Vector bacterial para la expresión de proteínas marcadas con S en el extremo N terminal, con un sitio de trombina.

DCW: peso seco celular, del inglés, *Dry cell weigh* (g)

IMAC: cromatografía de afinidad de metal inmovilizado, del inglés, *Immobilized metal affinity chromatography*

Ni-NTA: resina cromatográfica en base agarosa para recuperar proteínas etiquetadas, normalmen usado en IMAC

EP: eficiencia de la proteólisis (%)

L929: línea celular sensible a los efectos citotóxicos inducidos por el TNF

ATP: trifosfato de adenosina, nucleótido fundamental en la obtención de energía celular

tiempo⁻¹: en diseño experimental CEM, inverso del tiempo como medida de la productividad (min)

VAN: El valor actual neto es un indicador financiero usado para determinar la viabilidad de un proyecto (US\$)

TIR: tasa interna de retorno de la inversión (%)

6. Referencias bibliográficas

1. L. Pablos, J. and J.D. Canete, *Immunopathology of Rheumatoid Arthritis*. 2013.
2. Ko, J.M., A.B. Gottlieb, and J.F. Kerbleski, *Induction and exacerbation of psoriasis with TNF-blockade therapy: A review and analysis of 127 cases*. Journal of Dermatological Treatment, 2009. **20**(2): p. 100-108.
3. Kirkegaard, T., et al., *Tumour necrosis factor- α converting enzyme (TACE) activity in human colonic epithelial cells1*. Clinical & Experimental Immunology, 2004. **135**(1): p. 146-153.
4. Waters, J.P., J.S. Pober, and J.R. Bradley, *Tumour necrosis factor and cancer*. The Journal of Pathology, 2013. **230**(3): p. 241-248.
5. Swardfager, W., et al., *A Meta-Analysis of Cytokines in Alzheimer's Disease*. Biological Psychiatry, 2010. **68**(10): p. 930-941.
6. Vaisman-Mentesh, A., et al., *Molecular Landscape of Anti-Drug Antibodies Reveals the Mechanism of the Immune Response Following Treatment With TNF α Antagonists*. Frontiers in Immunology, 2019. **10**.
7. Lin, J., et al., *TNF α blockade in human diseases: An overview of efficacy and safety*. Clinical Immunology, 2008. **126**(1): p. 13-30.
8. Samaranayake, H., et al., *Challenges in monoclonal antibody-based therapies*. Annals of Medicine, 2009. **41**(5): p. 322-331.
9. Sapra, P. and B. Shor, *Monoclonal antibody-based therapies in cancer: Advances and challenges*. Pharmacology & Therapeutics, 2013. **138**(3): p. 452-469.
10. *Humira (Adalimumab), imparable aumento de precio - info-farmacia*. 2020.
11. *Manual Farmacoterapéutico*. 2020.
12. Agyei, D., et al., *Bioprocess challenges to the isolation and purification of bioactive peptides*. Food and Bioproducts Processing, 2016. **98**: p. 244-256.
13. Mason, J.M., *Design and development of peptides and peptide mimetics as antagonists for therapeutic intervention*. Future Medicinal Chemistry, 2010. **2**(12): p. 1813-1822.
14. Datta-Mannan, A., *Mechanisms Influencing the Pharmacokinetics and Disposition of Monoclonal Antibodies and Peptides*. Drug Metabolism and Disposition, 2019. **47**(10): p. 1100-1110.
15. Saavedra, L., et al., *An overview of "omic" analytical methods applied in bioactive peptide studies*. Food Research International, 2013. **54**(1): p. 925-934.
16. Yin, B., et al., *Blocking TNF- α by combination of TNF- α - and TNFR-binding cyclic peptide ameliorates the severity of TNBS-induced colitis in rats*. European Journal of Pharmacology, 2011. **656**(1-3): p. 119-124.
17. Jesmin, S., et al., *Time-dependent expression of endothelin-1 in lungs and the effects of TNF- α blocking peptide on acute lung injury in an endotoxemic rat model*. Biomedical Research-Tokyo, 2011. **32**(1): p. 9-17.

18. Lazarov, M., et al., *RDP58, a novel anti-inflammatory peptide, inhibits multiple intracellular messenger pathways and transcription factors to block TNF- α , IFN- γ , and IL12 production*. *Gastroenterology*, 2003. **124**(4, Supplement 1): p. A102.
19. Fosgerau, K. and T. Hoffmann, *Peptide therapeutics: current status and future directions*. *Drug Discovery Today*, 2015. **20**(1): p. 122-128.
20. Antosova, Z., et al., *Therapeutic application of peptides and proteins: parenteral forever?* *Trends in Biotechnology*, 2009. **27**(11): p. 628-635.
21. Vlieghe, P., et al., *Synthetic therapeutic peptides: science and market*. *Drug Discovery Today*, 2010. **15**(1-2): p. 40-56.
22. Rentero Rebollo, I., et al., *Identification of target-binding peptide motifs by high-throughput sequencing of phage-selected peptides*. *Nucleic Acids Research*, 2014. **42**(22): p. e169.
23. Michell, D.L., W. Zhu, and K.C. Vickers, *Microscale Thermophoresis Demonstrates Binding Capacity of Apolipoprotein A-I and HDL*. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 2019. **39**.
24. Shiau, M.Y., et al., *Establishment of a consistent L929 bioassay system for TNF- α quantitation to evaluate the effect of lipopolysaccharide, phytomitogens and cytodifferentiation agents on cytotoxicity of TNF- α secreted by adherent human mononuclear cells*. *Mediators of Inflammation*, 2001. **10**(4): p. 199-208.
25. Tong, L.T., et al., *Rice-derived peptide AAGALPS inhibits TNF- α -induced inflammation and oxidative stress in vascular endothelial cells*. *Food Science & Nutrition*, 2020. **8**(1): p. 659-667.
26. Qin, W., et al., *A novel TNF α antagonizing peptide-Fc fusion protein designed based on CDRs of TNF α neutralizing monoclonal antibody*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004. **322**(3): p. 1024-1028.
27. Rodríguez, V., J.A. Asenjo, and B.A. Andrews, *Design and implementation of a high yield production system for recombinant expression of peptides*. *Microbial Cell Factories*, 2014. **13**: p. 65.
28. Wibowo, D. and C.-X. Zhao, *Recent achievements and perspectives for large-scale recombinant production of antimicrobial peptides*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019. **103**(2): p. 659-671.
29. Sun, B., et al., *Design and production of a novel antimicrobial fusion protein in Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018. **102**(20): p. 8763-8772.
30. Li, Y., *Recombinant production of antimicrobial peptides in Escherichia coli: a review*. *Protein Expression and Purification*, 2011. **80**(2): p. 260-267.
31. Rodríguez, V., et al., *Production of Cell-Penetrating Peptides in Escherichia coli Using an Intein-Mediated System*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2015. **175**(6): p. 3025-3037.
32. Wang, G., et al., *Design of Antimicrobial Peptides: Progress Made with Human Cathelicidin LL-37, in Antimicrobial Peptides: Basics for Clinical Application*, K. Matsuzaki, Editor. 2019, Springer-Verlag Singapore Pte Ltd: Singapore. p. 215-240.

33. Rao, X., et al., *Design and expression of peptide antibiotic hPAB- β as tandem multimers in Escherichia coli*. *Peptides*, 2005. **26**(5): p. 721-729.
34. Dong, B., et al., *Multimer of the antimicrobial peptide Mytichitin-A expressed in Chlamydomonas reinhardtii exerts a broader antibacterial spectrum and increased potency*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2018. **125**(2): p. 175-179.
35. Zhou, L., et al., *TrxA mediating fusion expression of antimicrobial peptide CM4 from multiple joined genes in Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 2009. **64**(2): p. 225-230.
36. Govender, K., et al., *A novel and more efficient biosynthesis approach for human insulin production in Escherichia coli (E. coli)*. *AMB Express*, 2020. **10**(1): p. 43.
37. Joachim, M., et al., *Process Intensification for an Insect Antimicrobial Peptide Elastin-Like Polypeptide Fusion Produced in Redox-Engineered Escherichia coli*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2019. **7**: p. 150.
38. Zhao, C.-X., et al., *A simple and low-cost platform technology for producing pexiganan antimicrobial peptide in E. coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2015. **112**(5): p. 957-964.
39. Yang, X., M. Pistozzi, and Z. Lin, *New trends in aggregating tags for therapeutic protein purification*. *Biotechnology Letters*, 2018. **40**(5): p. 745-753.
40. Sun, B., et al., *Cost-effective downstream processing of recombinantly produced pexiganan peptide and its antimicrobial activity*. *AMB Express*, 2018. **8**(1): p. 6.
41. Corbin, J.M., et al., *Purification, characterization, and N-glycosylation of recombinant butyrylcholinesterase from transgenic rice cell suspension cultures*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2018. **115**(5): p. 1301-1310.
42. Sharma, S.S., S. Chong, and S.W. Harcum, *Simulation of Large-Scale Production of a Soluble Recombinant Protein Expressed in Escherichia coli Using an Intein-Mediated Purification System*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2005. **126**(2): p. 093-118.
43. Brady, R., et al., *Hierarchical mesoporous silica materials for separation of functional food ingredients — A review*. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2008. **9**(2): p. 243-248.
44. Hebbi, V., et al., *Process for production and purification of lethal toxin neutralizing factor (LTNF) from E-coli and its economic analysis*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2018. **93**(4): p. 959-967.
45. Faraji, N., Y. Zhang, and A.K. Ray, *Impact of operating conditions on chromatographic column performance: experimental studies on adsorption of high-value minor whey proteins*. *Aims Bioengineering*, 2017. **4**(2): p. 223-238.
46. Zhou, L., et al., *Expression and Hydroxylamine Cleavage of Thymosin Alpha 1 Concatemer*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2008. **2008**: p. 1-8.
47. Gu, T., *Mathematical Modeling and Scale-Up of Liquid Chromatography: With Application Examples*. 2015: Springer. 214.

48. Pavlov, G. and J.T. Hsu, *Modelling the effect of temperature on the gel-filtration chromatographic protein separation*. Computers & Chemical Engineering, 2018. **112**: p. 304-315.
49. Li, Z.G., Y.S. Gu, and T.Y. Gu, *Mathematical modeling and scale-up of size-exclusion chromatography*. Biochemical Engineering Journal, 1998. **2**(2): p. 145-155.
50. Lienqueo, M.E., et al., *Mathematical Modeling of Protein Chromatograms*. Chemical Engineering & Technology, 2012. **35**(1): p. 46-57.
51. *Intelligen, Inc., Batch Process Simulation, Process Design, Process Optimization, Cycle Time Reduction, Cost Analysis, Production Scheduling, Pollution Prevention*. 2020.
52. Soria-Gila, M.L., *Síntesis y evaluación de péptidos y derivados peptídicos con aplicaciones significativas en desarrollo de fármacos, biotecnología y diagnosis*. 2017: Universidad de Granada.
53. Oliveira, E.A. and B.L. Faintuch, *Radiolabeling and biological evaluation of the GX1 and RGD-GX1 peptide sequence for angiogenesis targeting*. Nuclear Medicine and Biology, 2015. **42**(2): p. 123-130.
54. *peptides - U.S. Food and Drug Administration Search Results*. 2020.
55. Uhlig, T., et al., *The emergence of peptides in the pharmaceutical business: From exploration to exploitation*. EuPA Open Proteomics, 2014. **4**: p. 58-69.
56. Luzi, S., et al., *Subunit disassembly and inhibition of TNF α by a semi-synthetic bicyclic peptide*. Protein Engineering, Design and Selection, 2015. **28**(2): p. 45-52.
57. Tobinick, E.L. and H. Gross, *Rapid cognitive improvement in Alzheimer's disease following perispinal etanercept administration*. Journal of Neuroinflammation, 2008. **5**: p. 2.
58. Roerink, M.E., et al., *Central delivery of iodine-125-labeled cetuximab, etanercept and anakinra after perispinal injection in rats: possible implications for treating Alzheimer's disease*. Alzheimers Research & Therapy, 2015. **7**: p. 70.
59. Bourreille, A., et al., *RDP58, a Novel Immunomodulatory Peptide with Anti-Inflammatory Effects. A Pharmacological Study in Trinitrobenzene Sulphonic Acid Colitis and Crohn Disease*. Scandinavian Journal of Gastroenterology, 2003. **38**(5): p. 526-532.
60. Kanakaraj, P., et al., *Simultaneous targeting of TNF and Ang2 with a novel bispecific antibody enhances efficacy in an in vivo model of arthritis*. mAbs, 2012. **4**(5): p. 600-613.
61. Fleming, T.J., et al., *Discovery of high-affinity peptide binders to BLYS by phage display*. Journal of Molecular Recognition, 2005. **18**(1): p. 94-102.
62. Alizadeh, A.A., et al., *Identification of novel peptides against TNF-alpha using phage display technique and in silico modeling of their modes of binding*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2017. **96**: p. 490-498.
63. Bradbury, A.R.M., et al., *Beyond natural antibodies: the power of in vitro display technologies*. Nature Biotechnology, 2011. **29**(3): p. 245-254.

64. Rothe, A., R.J. Hosse, and B.E. Power, *In vitro display technologies reveal novel biopharmaceuticals*. FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 2006. **20**(10): p. 1599-1610.
65. Tonikian, R., et al., *Identifying specificity profiles for peptide recognition modules from phage-displayed peptide libraries*. Nature Protocols, 2007. **2**(6): p. 1368-1386.
66. Zambrano-Mila, M.S., K.E.S. Blacio, and N.S. Vispo, *Peptide Phage Display: Molecular Principles and Biomedical Applications*. Therapeutic Innovation & Regulatory Science, 2020. **54**(2): p. 308-317.
67. Azzazy, H.M.E. and W.E. Highsmith, *Phage display technology: clinical applications and recent innovations*. Clinical Biochemistry, 2002. **6**(35): p. 425-445.
68. Liu, F., et al., *Screening specific polypeptides of breast cancer stem cells from a phage display random peptide library*. Oncology Letters, 2016. **12**(6): p. 4727-4731.
69. Frei, J.C. and J.R. Lai, *Protein and Antibody Engineering by Phage Display*. Methods in Enzymology, 2016. **580**: p. 45-87.
70. Wu, C.-H., et al., *Advancement and applications of peptide phage display technology in biomedical science*. Journal of Biomedical Science, 2016. **23**(1): p. 8.
71. Lunder, M., et al., *Ultrasound in phage display: a new approach to nonspecific elution*. BioTechniques, 2008. **44**(7): p. 893-900.
72. Blaszczyk, M., et al., *Modeling of protein-peptide interactions using the CABS-dock web server for binding site search and flexible docking*. 2016.
73. Barrett, A.S., et al., *Hydroxylamine Chemical Digestion for Insoluble Extracellular Matrix Characterization*. Journal of Proteome Research, 2017. **16**(11): p. 4177-4184.
74. Rodríguez, V., J.A. Asenjo, and B.A. Andrews, *Design and implementation of a high yield production system for recombinant expression of peptides*. Microbial Cell Factories, 2014. **13**(1): p. 65.
75. Li, Y., X. Li, and G. Wang, *Cloning, expression, isotope labeling, and purification of human antimicrobial peptide LL-37 in Escherichia coli for NMR studies*. Protein Expression and Purification, 2006. **47**(2): p. 498-505.
76. Gonzalez-Ortega, O., et al., *Production and purification of recombinant hypocholesterolemic peptides*. Biotechnology Letters, 2015. **37**(1): p. 41-54.
77. Hoffmann, D., et al., *Reassessment of inclusion body-based production as a versatile opportunity for difficult-to-express recombinant proteins*. Critical Reviews in Biotechnology, 2018. **38**(5): p. 729-744.
78. Zhou, L., et al., *Expression and purification the antimicrobial peptide CM4 in Escherichia coli*. Biotechnology Letters, 2009. **31**(3): p. 437-441.
79. Lee, J.H., et al., *High-Level Expression of Antimicrobial Peptide Mediated by a Fusion Partner Reinforcing Formation of Inclusion Bodies*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000. **277**(3): p. 575-580.

80. Andersson, L., et al., *Large-scale synthesis of peptides*. Peptide Science, 2000. **55**(3): p. 227-250.
81. Gasteiger, E., et al., *Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server*, in *The Proteomics Protocols Handbook*, J.M. Walker, Editor. 2005, Humana Press: Totowa, NJ. p. 571-607.
82. *The Proteomics Protocols Handbook*. 2005: Humana Press.
83. Daliri, E.B.-M., D.H. Oh, and B.H. Lee, *Bioactive Peptides*. Foods, 2017. **6**(5): p. 32.
84. Zhu, X., et al., *Recombinant Expression and Characterization of α -Conotoxin LvIA in Escherichia coli*. Marine Drugs, 2016. **14**(1).
85. Tripathi, N.K., R. Priya, and A. Shrivastava, *Production of recombinant Chikungunya virus envelope 2 protein in Escherichia coli*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014. **98**(6): p. 2461-2471.
86. Ferreira, R.d.G., A.R. Azzoni, and S. Freitas, *Techno-economic analysis of the industrial production of a low-cost enzyme using E. coli: the case of recombinant β -glucosidase*. Biotechnology for Biofuels, 2018. **11**(1): p. 81.
87. Gonçalves, G.A.L., et al., *Engineering of Escherichia coli strains for plasmid biopharmaceutical production: Scale-up challenges*. Vaccine, 2014. **32**(24): p. 2847-2850.
88. Tripathi, N.K. and A. Shrivastava, *Chapter 4 - Scale up of biopharmaceuticals production*, in *Nanoscale Fabrication, Optimization, Scale-Up and Biological Aspects of Pharmaceutical Nanotechnology*, A.M. Grumezescu, Editor. 2018, William Andrew Publishing. p. 133-172.
89. Francis, D.M. and R. Page, *Strategies to Optimize Protein Expression in E. coli*. Current Protocols in Protein Science, 2010. **61**(1): p. 5.24.1-5.24.29.
90. Voss, T., et al., *Periplasmic expression of human interferon- α 2c in Escherichia coli results in a correctly folded molecule*. Biochemical Journal, 1994. **298**(3): p. 719-725.
91. Zieliński, M., et al., *Expression and purification of recombinant human insulin from E. coli 20 strain*. Protein Expression and Purification, 2019. **157**: p. 63-69.
92. Chura-Chambi, R.M., et al., *Protein refolding based on high hydrostatic pressure and alkaline pH: Application on a recombinant dengue virus NS1 protein*. PLoS ONE, 2019. **14**(1).
93. Singh, A., et al., *Protein recovery from inclusion bodies of Escherichia coli using mild solubilization process*. Microbial Cell Factories, 2015. **14**(1): p. 41.
94. Ernst, S., et al., *Process simulation for recombinant protein production: Cost estimation and sensitivity analysis for heparinase I expressed in Escherichia coli*. Biotechnology and Bioengineering, 1997. **53**(6): p. 575-582.
95. Korz, D., et al., *Simple Fed-Batch Technique for High Cell-Density Cultivation of Escherichia-Coli*. Journal of Biotechnology, 1995. **39**(1): p. 59-65.
96. Altenhoff, A.-L., S. Thierbach, and A. Steinbuechel, *High yield production of the latex clearing protein from Gordonia polyisoprenivorans VH2 in fed batch fermentations using a recombinant strain of Escherichia coli*. Journal of Biotechnology, 2020. **309**: p. 92-99.

97. Choi, J.H., K.C. Keum, and S.Y. Lee, *Production of recombinant proteins by high cell density culture of Escherichia coli*. Chemical Engineering Science, 2006. **61**(3): p. 876-885.
98. Choi, J.H. and S.Y. Lee, *Secretory and extracellular production of recombinant proteins using Escherichia coli*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004. **64**(5): p. 625-635.
99. Shojaosadati, S.A., et al., *Recent Advances in High Cell Density Cultivation for Production of Recombinant Protein*. Iranian Journal of Biotechnology, 2008. **6**(2): p. 63-84.
100. Liu, J., et al., *Optimization of Culture Conditions for High Cell-Density Fermentation of Bovine Escherichia coli*. Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi, 2018. **24**(5): p. 735-742.
101. Zhao, C., et al., *Improvement of the production of L-tryptophan in Escherichia coli by application of a dissolved oxygen stage control strategy*. Annals of Microbiology, 2016. **66**(2): p. 843-854.
102. Kleman, G.L. and W.R. Strohl, *Acetate metabolism by Escherichia coli in high-cell-density fermentation*. Applied and Environmental Microbiology, 1994. **60**(11): p. 3952-3958.
103. Donovan, R.S., C.W. Robinson, and B.R. Glick, *Review: Optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter*. Journal of Industrial Microbiology, 1996. **16**(3): p. 145-154.
104. Mukherjee, R.P., et al., *Production of an anti-Candida peptide via fed batch and ion exchange chromatography*. Biotechnology Progress, 2016. **32**(4): p. 865-871.
105. Restrepo-Pineda, S., et al., *Recombinant production of ESAT-6 antigen in thermoinducible Escherichia coli: the role of culture scale and temperature on metabolic response, expression of chaperones, and architecture of inclusion bodies*. Cell Stress & Chaperones, 2019. **24**(4): p. 777-792.
106. Gordon, E., et al., *Effective high-throughput overproduction of membrane proteins in Escherichia coli*. Protein Expression and Purification, 2008. **62**(1): p. 1-8.
107. Ahmad, I., et al., *Overcoming challenges for amplified expression of recombinant proteins using Escherichia coli*. Protein Expression and Purification, 2018. **144**: p. 12-18.
108. Salazar, O., et al., *Overproduction, Purification, and Characterization of β -1,3-Glucanase Type II in Escherichia coli*. Protein Expression and Purification, 2001. **23**(2): p. 219-225.
109. Marini, G., et al., *Experimental design approach in recombinant protein expression: determining medium composition and induction conditions for expression of pneumolysin from Streptococcus pneumoniae in Escherichia coli and preliminary purification process*. BMC Biotechnology, 2014. **14**: p. 1.
110. Phue, J.N. and J. Shiloach, *Impact of dissolved oxygen concentration on acetate accumulation and physiology of E coli BL21, evaluating transcription levels of key genes at different dissolved oxygen conditions*. Metabolic Engineering, 2005. **7**(5-6): p. 353-363.
111. Carmignotto, G.P. and A.R. Azzoni, *On the expression of recombinant Cas9 protein in E. coli BL21(DE3) and BL21(DE3) Rosetta strains*. Journal of Biotechnology, 2019. **306**: p. 62-70.

112. Zhao, C., et al., *Application of fermentation process control to increase l-tryptophan production in Escherichia coli*. Biotechnology Progress: p. e2944.
113. Baez, A. and J. Shiloach, *Escherichia coli avoids high dissolved oxygen stress by activation of SoxRS and manganese-superoxide dismutase*. Microbial Cell Factories, 2013. **12**(1): p. 23.
114. Lin, C., et al., *Optimization of culture conditions to improve the expression level of beta1-epsilon toxin of Clostridium perfringens type B in Escherichia coli*. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2016. **30**(2): p. 324-331.
115. Long, Q., et al., *The development and application of high throughput cultivation technology in bioprocess development*. Journal of Biotechnology, 2014. **192**: p. 323-338.
116. Faust, G., et al., *Feeding strategies enhance high cell density cultivation and protein expression in milliliter scale bioreactors*. Biotechnology Journal, 2014. **9**(10): p. 1293-1303.
117. Kang, A., et al., *Optimization of the IPP-bypass mevalonate pathway and fed-batch fermentation for the production of isoprenol in Escherichia coli*. Metabolic Engineering, 2019. **56**: p. 85-96.
118. Hansen, L.H., S. Knudsen, and S.J. Sørensen, *The effect of the lacY gene on the induction of IPTG inducible promoters, studied in Escherichia coli and Pseudomonas fluorescens*. Current Microbiology, 1998. **36**(6): p. 341-347.
119. Neves-Petersen, M.T., et al., *Engineering the pH-optimum of a triglyceride lipase: from predictions based on electrostatic computations to experimental results*. Journal of Biotechnology, 2001. **87**(3): p. 225-254.
120. Becker, S., et al., *A generic system for the Escherichia coli cell-surface display of lipolytic enzymes*. FEBS letters, 2005. **579**(5): p. 1177-1182.
121. Shitu, J.O., et al., *Induction studies with Escherichia coli expressing recombinant interleukin-13 using multi-parameter flow cytometry*. Biotechnology Letters, 2009. **31**(4): p. 577-584.
122. Li, J.F., et al., *Production of a cytotoxic cationic antibacterial peptide in Escherichia coli using SUMO fusion partner*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009. **84**(2): p. 383-388.
123. Nadkarni, A., L.-L.C. Kelley, and C. Momany, *Optimization of a mouse recombinant antibody fragment for efficient production from Escherichia coli*. Protein Expression and Purification, 2007. **52**(1): p. 219-229.
124. Zhou, Y., et al., *Genetic engineering modification and fermentation optimization for extracellular production of recombinant proteins using Escherichia coli*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018. **102**(4): p. 1545-1556.
125. Politi, N., et al., *Half-life measurements of chemical inducers for recombinant gene expression*. Journal of Biological Engineering, 2014. **8**(1): p. 5.
126. Kusuma, S.A.F., et al., *Optimization of culture conditions for Mpt64 synthetic gene expression in Escherichia coli BL21 (DE3) using surface response methodology*. Heliyon, 2019. **5**(11): p. e02741.

127. Paz Maldonado, L.M.T., et al., *Optimization of culture conditions for a synthetic gene expression in Escherichia coli using response surface methodology: The case of human interferon beta*. Biomolecular Engineering, 2007. **24**(2): p. 217-222.
128. *Novagen-pET-system-manual-1.pdf*. 2020.
129. Reginatto, C., et al., *Pectinase production by Aspergillus niger LB-02-SF is influenced by the culture medium composition and the addition of the enzyme inducer after biomass growth*. Process Biochemistry, 2017. **58**: p. 1-8.
130. Espinosa Perez, R., et al., *Scaling-up fermentation of Escherichia coli for production of recombinant P64k protein from Neisseria meningitidis*. Electronic Journal of Biotechnology, 2018. **33**: p. 29-35.
131. Humer, D. and O. Spadiut, *Wanted: more monitoring and control during inclusion body processing*. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2018. **34**(11): p. 158.
132. Slouka, C., et al., *Perspectives of inclusion bodies for bio-based products: curse or blessing?* Applied Microbiology and Biotechnology, 2019. **103**(3): p. 1143-1153.
133. Rathore, A.S., et al., *Refolding of biotech therapeutic proteins expressed in bacteria: review*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2013. **88**(10): p. 1794-1806.
134. Hebbi, V., G. Thakur, and A.S. Rathore, *Process analytical technology implementation for protein refolding: GCSF as a case study*. Biotechnology and Bioengineering, 2019. **116**(5): p. 1039-1052.
135. Aliboland, M. and H. Mirzahoseini, *Chemical Assistance in Refolding of Bacterial Inclusion Bodies*. Biochemistry Research International, 2011.
136. Ling, C., et al., *Approaches for the generation of active papain-like cysteine proteases from inclusion bodies of Escherichia coli*. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2015. **31**(5): p. 681-690.
137. Hoffmann, D., et al., *Downstream processing of Cry4AaCter-induced inclusion bodies containing insect-derived antimicrobial peptides produced in Escherichia coli*. Protein Expression and Purification, 2019. **155**: p. 120-129.
138. Ledung, E., P.-O. Eriksson, and S. Oscarsson, *A strategic crossflow filtration methodology for the initial purification of promegapoietin from inclusion bodies*. Journal of Biotechnology, 2009. **141**(1): p. 64-72.
139. Middelberg, A., *Process-Scale Disruption of Microorganisms*. Biotechnology Advances, 1995. **13**(3): p. 491-551.
140. Dumay, E., et al., *Technological aspects and potential applications of (ultra) high-pressure homogenisation*. Trends in Food Science & Technology, 2013. **31**(1): p. 13-26.
141. Wei, Q., et al., *Facilitation of Expression and Purification of an Antimicrobial Peptide by Fusion with Baculoviral Polyhedrin in Escherichia coli*. Applied and Environmental Microbiology, 2005. **71**(9): p. 5038-5043.

142. Wijeratne, S., et al., *Layer-by-Layer Deposition with Polymers Containing Nitrilotriacetate, A Convenient Route to Fabricate Metal- and Protein-Binding Films*. ACS Applied Materials & Interfaces, 2016. **8**(16): p. 10164-10173.
143. Park, H.B., et al., *Optimization of the hydroxylamine cleavage of an expressed fusion protein to produce a recombinant antimicrobial peptide*. Biotechnology Letters, 2001. **23**(8): p. 637-641.
144. Asenjo, J.A. and B.A. Andrews, *Is there a rational method to purify proteins? From expert systems to proteomics*. Journal of Molecular Recognition, 2004. **17**(3): p. 236-247.
145. Asenjo, J.A. and B.A. Andrews, *Protein purification using chromatography: selection of type, modelling and optimization of operating conditions*. Journal of Molecular Recognition, 2009. **22**(2): p. 65-76.
146. Guiochon, G., A. Felinger, and D.G.G. Shirazi, *Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography*. 2006: Elsevier. 991.
147. Luitjens, A. and E. van Corven, *Production and Purification of Recombinant Proteins*, in *Pharmaceutical Biotechnology: Fundamentals and Applications*, D.J.A. Crommelin, R.D. Sindelar, and B. Meibohm, Editors. 2019, Springer International Publishing: Cham. p. 57-82.
148. Jagschies, G., G.K. Sofer, and L. Hagel, *Handbook of Process Chromatography: Development, Manufacturing, Validation and Economics*. 2007: Elsevier. 383.
149. *Preparative Chromatography of Fine Chemicals and Pharmaceutical Agents*. 2006, Oxford: Blackwell Science Publ.
150. Hong, P., S. Koza, and E.S.P. Bouvier, *A Review Size-Exclusion Chromatography for the Analysis of Protein Biotherapeutics and Their Aggregates*. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2012. **35**(20): p. 2923-2950.
151. He, W., et al., *Expression, purification, and renaturation of a recombinant peptide-based HIV vaccine in Escherichia coli*. Canadian Journal of Microbiology, 2017. **63**(6): p. 493-501.
152. Kumar, P. and G.K. Aradhyam, *Easy and efficient protocol for purification of recombinant peptides*. Protein Expression and Purification, 2014. **95**: p. 129-135.
153. Dou, W.-F., et al., *Expression, purification, and characterization of recombinant human serum albumin fusion protein with two human glucagon-like peptide-1 mutants in Pichia pastoris*. Protein Expression and Purification, 2008. **61**(1): p. 45-49.
154. Zhou, Y., et al., *High cell density cultivation of recombinant Escherichia coli for prodrug of recombinant human GLPs production*. Protein Expression and Purification, 2012. **85**(1): p. 38-43.
155. Gedela, S. and N.R. Medicherla, *Chromatographic Techniques for the Separation of Peptides: Application to Proteomics*. Chromatographia, 2007. **65**(9): p. 511-518.
156. Harrison, R.G., et al., *Bioseparations Science and Engineering*. 2015: Oxford University Press. 577.
157. Wu, C.-S., *Handbook Of Size Exclusion Chromatography And Related Techniques: Revised And Expanded*. 2003: CRC Press. 720.

158. Nicoud, R.-M., *Chromatographic Processes*. 2015: Cambridge University Press. 675.
159. Augier, F., C. Laroche, and E. Brehon, *Application of computational fluid dynamics to fixed bed adsorption calculations: Effect of hydrodynamics at laboratory and industrial scale*. Separation and Purification Technology, 2008. **63**(2): p. 466-474.
160. Fangueiro Gomes, L., et al., *Modelling of a Simulated Moving Bed in case of non-ideal hydrodynamics*. Chemical Engineering Science, 2016. **153**: p. 188-198.
161. Gritti, F. and G. Guiochon, *Application of the general height equivalent to a theoretical plate equation to size exclusion chromatography. Study of the mass transfer of high-molecular-mass compounds in liquid chromatography*. Analytical Chemistry, 2007. **79**(8): p. 3188-3198.
162. Luo, J., et al., *Comparison of fully-porous beads and cored beads in size exclusion chromatography for protein purification*. Chemical Engineering Science, 2013. **102**: p. 99-105.
163. Osterroth, S., et al., *Adjoint optimization for the general rate model of liquid chromatography*. Computers & Chemical Engineering, 2020. **133**: p. 106657.
164. Chester, T.L., *The combination of partition, size exclusion, and hydrodynamic models in chromatography, and application to bonded phases on porous supports*. Journal of Chromatography A, 2020. **1620**: p. 461011.
165. Brhane, K.W., S. Qamar, and A. Seidel-Morgenstern, *Two-Dimensional General Rate Model of Liquid Chromatography Incorporating Finite Rates of Adsorption–Desorption Kinetics and Core–Shell Particles*. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2019. **58**(19): p. 8296-8308.
166. Bagheri, M., et al., *Development and modeling of two-dimensional fast protein liquid chromatography for producing nonstructural protein-free foot-and-mouth disease virus vaccine*. Journal of Chromatography B, 2018. **1096**: p. 113-121.
167. *Example Process Files*. 2020.
168. DeLano, W.L., *Pymol: An open-source molecular graphics tool*. CCP4 Newsl. Protein Crystallogr, 2002. **40**(1): p. 82-92.
169. Miller lii, B.R., et al., *MMPBSA. py: an efficient program for end-state free energy calculations*. Journal of chemical theory and computation, 2012. **8**(9): p. 3314-3321.
170. Case, D.A., et al., *The Amber biomolecular simulation programs*. Journal of computational chemistry, 2005. **26**(16): p. 1668-1688.
171. Wang, E., et al., *End-point binding free energy calculation with MM/PBSA and MM/GBSA: strategies and applications in drug design*. Chemical reviews, 2019. **119**(16): p. 9478-9508.
172. Jorgensen, W.L., et al., *Comparison of simple potential functions for simulating liquid water*. The Journal of chemical physics, 1983. **79**(2): p. 926-935.
173. Ryckaert, J.-P., G. Ciccotti, and H.J.C. Berendsen, *Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes*. Journal of computational physics, 1977. **23**(3): p. 327-341.

174. Mann, H.B. and D.R. Whitney, *On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other*. The annals of mathematical statistics, 1947: p. 50-60.
175. López, C., et al., *Cysteine mediated multimerization of a recombinant dengue E fragment fused to the P64k protein following immobilized metal ion affinity chromatography*. Protein Expression and Purification, 2004. **34**(2): p. 176-182.
176. Hirschi, S. and D. Fotiadis, *Purification of Membrane Proteins by Affinity Chromatography with On-Column Protease Cleavage*, in *Expression, Purification, and Structural Biology of Membrane Proteins*, C. Perez and T. Maier, Editors. 2020, Springer US: New York, NY. p. 139-150.
177. Schägger, H., *Tricine-SDS-PAGE*. Nature Protocols, 2006. **1**(1): p. 16-22.
178. Zelic, B. and B. Neseck, *Mathematical Modeling of Size Exclusion Chromatography*. Engineering in Life Sciences, 2006. **6**(2): p. 163-169.
179. Lund, P., A. Tramonti, and D. De Biase, *Coping with low pH: molecular strategies in neutralophilic bacteria*. FEMS Microbiology Reviews, 2014. **38**(6): p. 1091-1125.
180. Phue, J.-N. and J. Shiloach, *Impact of dissolved oxygen concentration on acetate accumulation and physiology of E. coli BL21, evaluating transcription levels of key genes at different dissolved oxygen conditions*. Metabolic Engineering, 2005. **7**(5): p. 353-363.
181. Lee, J., et al., *Temperature-dependent expression of Escherichia coli thioredoxin gene*. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2000. **33**(2): p. 166-171.
182. Ron, E.Z. and B.D. Davis, *Growth Rate of Escherichia coli at Elevated Temperatures: Limitation by Methionine*. Journal of Bacteriology, 1971. **107**(2): p. 391-396.
183. Bornstein, P. and G. Balian, *Cleavage at Asn-Gly bonds with hydroxylamine*. Methods Enzymol, 1977. **47**: p. 132-45.
184. Hutchinson, N., et al., *Ultra scale-down approach to correct dispersive and retentive effects in small-scale columns when predicting larger scale elution profiles*. Biotechnology progress, 2009. **25**(4): p. 1103-1110.
185. Subramanian, G., *Process Scale Liquid Chromatography*.
186. Li, P., Y. Zheng, and X. Chen, *Drugs for Autoimmune Inflammatory Diseases: From Small Molecule Compounds to Anti-TNF Biologics*. Frontiers in Pharmacology, 2017. **8**.
187. Papavasileiou, V., C. Siletti, and D. Petrides, *Systematic Evaluation of Single-Use Systems Using Process Simulation Tools—A Case Study Involving MAb Production*. Biopharm International, 2008.