

Estandarización del procedimiento de Ellman por retroceso para la cuantificación de grupos maleimidos en la anatoxina tetánica funcionalizada, para su uso como proteína portadora

Felix Cardoso-San Jorge* ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2540-7934>
Bárbara Baró-Vicet ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5017-6571>
Claudia C. Rodríguez-Elejalde ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-4885-7551>
Lauren M. Quintero-Moreno ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0936-3823>
Jean P. Soubal-Mora ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9097-302X>
Darielys Santana-Mederos ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5333-554X>
Sonsire Fernández-Castillo ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5329-5971>
Jessy Pedroso-Fernández** ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5591-4972>

Instituto Finlay de Vacunas. La Habana, Cuba.

Autor por correspondencia: fcardoso@finlay.edu.cu; jpedroso@finlay.edu.cu

Las vacunas conjugadas han demostrado ser la plataforma más efectiva y eficiente para prevenir las infecciones provocadas por bacterias encapsuladas (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* tipo b, entre otras) y, más recientemente, contra el coronavirus de tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo. Dentro de los métodos utilizados para obtener las vacunas conjugadas se encuentran los basados en la reacción de Michael, donde una de las macromoléculas que participa en la reacción se funcionaliza con grupos maleimidos, siendo esta metodología la utilizada para obtener los lotes experimentales y productivos de la vacuna SOBERANA[®]02, por lo que para el buen desempeño tecnológico es necesario conocer el nivel de funcionalización de la proteína portadora con maleimido. El objetivo de este trabajo fue desarrollar y estandarizar un procedimiento analítico para la cuantificación de los grupos maleimidos que funcionalizan las proteínas portadoras, basado en el método de Ellman por retroceso, para ser utilizado en los controles de proceso de la vacuna SOBERANA[®]02. Se evaluaron los principales parámetros de desempeño recomendados por la entidad regulatoria: linealidad en el intervalo de trabajo de 0,25 - 4 $\mu\text{mol/L}$ de grupos sulfhídricos, especificidad, precisión y exactitud. Los procedimientos estadísticos basados en análisis descriptivos e inferenciales utilizados permitieron determinar que el procedimiento es específico para grupos maleimidos, lineal ($r^2 > 0,98$; CVf $< 5\%$, desviación estándar relativa (Sbrel) $< 2\%$, e intercepto no significativo), exacto (porcentaje de recuperación sin diferencia significativas con el 100 %) y preciso en condiciones de repetibilidad y precisión intermedia.

Palabras clave: proteínas portadoras; vacunas conjugadas; estandarización; espectrofotometría; reactivo de Ellman; maleimidas.

Introducción

Los casos de COVID-19 provocados por la infección del coronavirus de tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2, por sus siglas en inglés), se incrementaron bruscamente desde que se identificó el primer paciente reportado en Wuhan, China. Según datos oficiales, en los años 2020 y 2021 se confirmaron más de 695 millones de casos de personas infectadas y

alrededor de 7 millones de muertes asociadas a la enfermedad en todo el mundo.⁽¹⁾ De ellos, en Cuba hubo más de 1.115.000 casos de personas contagiadas y 8.530 muertes asociadas a la enfermedad, según datos del Ministerio de Salud Pública (MINSAP).⁽²⁾

Para responder con rapidez a este problema epidemiológico, se hizo necesario la obtención de

* Máster en Química, Investigador Agregado. Instituto Finlay de Vacunas. La Habana, Cuba.

** Máster en Química, Investigador Auxiliar. Instituto Finlay de Vacunas. La Habana, Cuba.

candidatos vacunales específicos contra el SARS-CoV-2. La investigación-desarrollo, se basó fundamentalmente en el uso de plataformas tecnológicas disponibles por los fabricantes de vacunas para otros virus y bacterias.⁽³⁾ En el Instituto Finlay de Vacunas (IFV) se obtuvo la vacuna de subunidades SOBERANA[®]02, que se basa en la conjugación del sitio de unión al receptor (RBD, por sus siglas en inglés) de la proteína S del virus SARS-CoV-2 con la anatoxina tetánica (TT). Para esto, se utiliza el grupo sulfhidrilo libre (-SH) de la cisteína 539 en la construcción del RBD empleado como antígeno, mientras que la TT se funcionaliza con grupos maleimidos.⁽⁴⁾ Como parte de su desarrollo tecnológico y como control de proceso, es necesario conocer el nivel de activación de la TT funcionalizada, por lo que es necesario implementar un procedimiento capaz de cuantificar este grupo funcional.

El uso de la química del grupo maleimido se ha extendido^(5,6,7,8) debido a la versatilidad, la rapidez y pureza de sus reacciones, siendo necesario desarrollar procedimientos analíticos capaces de cuantificarlo y con ello determinar la activación de las macromoléculas. En nuestro conocimiento no existe un reactivo con características tales que permita un desarrollo colorimétrico directo a partir de la reacción con este grupo; de ahí que la estrategia ha sido hacer reaccionar de manera cuantitativa los maleimidos, con un exceso de un grupo complementario que sí se pueda cuantificar.^(9,10) Los grupos maleimidos activantes de la macromolécula se hacen reaccionar con moléculas que presentan grupos -SH libres en su estructura, entre los más utilizados están los presentes en la cisteína y el mercaptoetanol, mediante una reacción de adición de Michael. Los grupos -SH remanentes de la reacción se cuantifican por un procedimiento basado en el método de Ellman;^(9,10) los reactivos más utilizados en estos procedimientos son el reactivo de Ellman (ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzoico)⁽⁹⁾ y el 4,4 ditio-piridina (DTDP).⁽¹¹⁾

Los procedimientos analíticos utilizados en la investigación-desarrollo-producción de un producto, para la seguridad de los resultados que aportan, se deben estandarizar y validar.⁽¹²⁾ Las normas de Buenas Prácticas de Fabricación, la Convención de Farmacopeas y la Conferencia Internacional de Armonización plantean que la estandarización y validación

deben aplicarse tanto a los procesos de fabricación como a los métodos de análisis y control.^(13,14) Como objetivo del trabajo se propuso implementar y estandarizar un procedimiento analítico capaz de determinar de forma precisa y exacta los grupos maleimidos activantes en la TT para su uso como proteína portadora.

Materiales y Métodos

Muestras y disoluciones empleadas

Las proteínas TT y anatoxina diftérica (TD) nativas disueltas en agua destilada y modificadas con grupos maleimidos fueron suministradas por el Grupo de Glicoconjugación de la Dirección de Investigaciones del IFV, La Habana, Cuba. El polirribosil-ribitol fosfato procesado (PRP Procesado) fue proporcionado por el Grupo de Producción de Síntesis de la Dirección de Producción del IFV. La albúmina sérica bovina (BSA, por sus siglas en inglés), fracción V, 98 % de pureza y el N-etilmaleimido para síntesis, fueron suministrados por Merck (Alemania) al igual que el resto de los reactivos utilizados en el procedimiento.

La disolución estándar de glutatión reducido (4 $\mu\text{mol/L}$) se preparó disolviendo el glutatión reducido ($\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$, 307,32 g/mol, 98 %) en agua destilada.

La disolución de reactivo de Ellman, ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzoico), 4 mg/mL se utilizó como reactivo desarrollador de color; se preparó disolviendo el reactivo de Ellman ($\text{C}_{14}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_8\text{S}_2$, 396,35 g/mol, 98 %) en agua destilada y se conservó a una temperatura de 2-8 °C.

La disolución tampón de fosfato 1N, pH 8,0, se utilizó como disolución tampón de pH y diluyente del complejo coloreado; se preparó disolviendo el hidrogenofosfato de di-sodio (Na_2HPO_4 , 141,96 g/mol, pa, 99 %) en agua destilada y se conservó a temperatura ambiente.

Reacción de las macromoléculas modificadas con grupos maleimidos con la disolución de glutatión

Se trasvasaron, por triplicado, 25 μL de muestra de macromolécula modificada a la dilución deseada con igual volumen de glutatión 4 $\mu\text{mol/mL}$ y se dejó reposar por 30 min, a temperatura ambiente.

Procedimiento basado en el método de Ellman^(9,10,13)

A un volumen de 50 μL de muestra previamente tratada con disolución de glutatión 4 mmol/mL, al blanco, patrones y al control positivo, trasvasados a tubos de ensayo, se les añadió 50 μL de disolución de reactivo Ellman 4 mg/mL y se agitó ligeramente cada tubo en agitador vortex (MS, IKA, Alemania). Posteriormente se adicionó 2,5 mL de la disolución de hidrogenofosfato de di-sodio 1N, pH 8,0, se homogenizó en vórtex durante unos segundos y se mantuvo en reposo por 15 min a temperatura ambiente. A las mezclas se le midió las absorbancias a una longitud de onda de 412 nm en un espectrofotómetro Ultrospec 9000 PC (Biochrom, UK).

Para el procesamiento de los resultados, se empleó una hoja de cálculo en Microsoft Excel, versión 2016. Se determinó el valor de concentración de cada punto de la curva de calibración a partir de las absorbancias y se obtuvo un ajuste lineal a través de la ecuación: $y = mx + b$. La concentración de las muestras se calculó a partir de los valores de absorbancias mediante el método de mínimos cuadrados. Se promediaron los valores de las concentraciones (mg/mL) obtenidas, cuyas absorbancias estuvieran dentro del rango de la curva de calibración y que su coeficiente de variación (CV) intraensayo fuera inferior al 5 %.⁽¹³⁾ Se utilizó el programa STATGRAPHICS 5 plus versión 5.1, para realizar los cálculos y procesamientos estadísticos.

Parámetros de estandarización

Se evaluaron la especificidad, linealidad, exactitud y precisión⁽¹⁵⁾ del procedimiento de Ellman por retroceso descrito previamente.

Especificidad

Se realizó la evaluación de la especificidad^(13,15) mediante el procedimiento Ellman por retroceso descrito anteriormente, utilizando muestras de proteínas portadoras TT y TD, así como BSA, modificadas con grupos maleimidos y disueltas en agua, un oligosacárido de PRP modificado con este grupo funcional obtenido por síntesis química, tampón HEPES 500 $\mu\text{mol/L}$ con el que se purifican las proteínas modificadas y N-etil maleimido.

Linealidad

Para ello se utilizó la curva de calibración en el intervalo de 0,25 - 4 $\mu\text{mol/mL}$ de grupos -SH, evaluando cada una de las concentraciones por cuadruplicado. Mediante los programas Microsoft Excel versión 2016 y STATGRAPHICS 5 plus, se calculó la ecuación de la recta, su coeficiente de correlación (r), el coeficiente de variación del factor respuesta (CVf), la desviación estándar relativa de la pendiente ($S_{b_{rel}}$); también se realizó la prueba de proporcionalidad para el intercepto, evaluándose si existe diferencia estadísticamente significativa entre el intercepto obtenido experimentalmente y el valor cero.^(15,16)

Exactitud

Se realizó mediante un experimento de añadido-recobrado. A una muestra de TT-maleimido, se le añadieron cantidades de N-etil maleimido, se calculó el recobrado y el porcentaje de recuperación se comparó mediante una prueba *t de Student* con el 100 % de recuperación para un nivel de confianza de 95 %, utilizando el programa STATGRAPHICS 5 plus.⁽¹⁵⁾

Precisión

Se evaluó en condiciones de repetibilidad (estudio intraensayo) y precisión intermedia (estudio interensayo).

Para el estudio de repetibilidad, se realizó la determinación de grupos maleimidos activantes en una muestra de TT activada (por sextuplicado) en estudio intraensayo, de muestras de anatoxina tetánica modificada con grupos maleimidos, por un mismo analista, en las mismas condiciones de día, laboratorio y equipamiento.

Los resultados obtenidos se procesaron estadísticamente con la utilización de las herramientas de Microsoft Excel versión 2016. Se calculó el CV expresado en porcentaje (CV %) y se comparó con el valor del coeficiente aceptado para metodologías basadas en métodos espectrofotométricos, que debe ser inferior al 3 %.^(15,17)

Para el estudio de precisión en condiciones de precisión intermedia, se cuantificaron muestras de anatoxina

tetánica modificada con grupos maleimidos, por tres analistas en 3 días diferentes, en iguales condiciones de laboratorio y equipamiento.^(15,18) Para demostrar su cumplimiento se evaluó que no existieran diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos por los tres analistas durante los 3 días mediante una comparación de muestras pareadas, utilizando el procedimiento de mínima diferencia significativa de Fisher (LSD), para un 95 % de confianza, auxiliándonos del Microsoft Excel 2016 y STATGRAPHICS 5 plus versión 5.1.

Resultados y Discusión

La estandarización y validación de los métodos analíticos desempeña un papel determinante, pues de ellos depende la comprobación confiable y reproducible de los índices de calidad de los resultados obtenidos para el desarrollo de los diferentes candidatos vacunales que se investigan y desarrollan.^(13,14,15,19,20)

El método analítico establecido se clasificó como ensayo cuantitativo^(15,16) por tratarse de un ensayo destinado a cuantificar el contenido de un grupo funcional modificante de la molécula TT. El diseño de la estandarización que se empleó se realizó teniendo en cuenta la clasificación reguladora por lo que se evaluaron los parámetros siguientes: especificidad,

linealidad, precisión (precisión intraensayo e interensayos) y exactitud.⁽¹⁵⁾

Se estudió la especificidad del método mediante la evaluación de muestras de proteínas que se utilizan frecuentemente como portadoras en la obtención de conjugados (tanto nativas disueltas en agua destilada, como modificadas con grupos maleimidos), moléculas con este grupo funcional y disolución tampón donde están disueltas las proteínas modificadas. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1. Para las muestras de proteínas funcionalizadas, N-etilmaleimido y el PRP Procesado, que son las moléculas utilizadas en el estudio que presentan grupos maleimidos que reaccionan con los grupos sulfhídricos (-SH) presentes en la molécula de glutatión, los valores de concentración de grupos -SH fueron inferiores a la muestra referencia de glutatión; mientras que para las muestras estudiadas que no presentan el grupo maleimido en su estructura se observa que sus concentraciones de grupos -SH si son similares a la muestra de referencia de glutatión, aproximadamente de 4 mmol/mL, lo que demuestra que el procedimiento estudiado es específico para cuantificar grupos maleimidos, no existiendo evidencias experimentales de interferencias de las proteínas utilizadas como portadoras, así como el tampón donde se disuelven las proteínas activadas con este grupo funcional.

Tabla 1. Procesamiento analítico del estudio de especificidad.

Muestras	A1	A2	A3	Am	C (µmol/mL)				SD	CV (%)
					C1	C2	C3	Cm		
Glutatión	0,559	0,569	0,564	0,564	3,906	3,979	3,943	3,943	0,036	0,92
TT- mal 240522	0,396	0,406	0,393	0,398	2,720	2,793	2,698	2,737	0,050	1,81
BSA - mal (C) 190522	0,248	0,262	0,252	0,254	1,644	1,745	1,673	1,687	0,052	3,11
BSA - mal (D) 190522	0,236	0,246	0,229	0,237	1,556	1,629	1,505	1,563	0,062	3,98
N-etil maleimido	0,156	0,158	0,166	0,160	0,974	0,989	1,047	1,003	0,038	3,84
PRP-Procesado	0,407	0,41	0,405	0,407	2,800	2,822	2,786	2,803	0,018	0,65
Tampón HEPES 500 mmol/L	0,515	0,51	0,519	0,515	3,586	3,550	3,615	3,584	0,033	0,92
TT en agua	0,562	0,564	0,565	0,564	3,928	3,943	3,950	3,940	0,011	0,28
TD en agua	0,573	0,566	0,564	0,568	4,008	3,957	3,943	3,969	0,034	0,87

TT: anatoxina tetánica TD: anatoxina diftérica. BSA: albumina sérica bovina. TT- mal: anatoxina tetánica activada con grupo maleimido. BSA -mal: albumina sérica bovina activada con grupo maleimido. A 1,2...n: absorbancia de cada réplica. Am: absorbancia media. C 1...n: concentración de grupos sulfhídricos. Cm: concentración grupos sulfhídricos media. SD: desviación estándar. CV: coeficiente de variación.

Tabla 2. Comparación de los resultados experimentales y los criterios de aceptación para el estudio de la linealidad.

Parámetros	Teórico ^(15,16)	Experimental
Ecuación de la recta	$y = mx + a$	$y = 0,254x + 0,0062$
r	$\geq 0,99$	0,9994
CVf	$\leq 5 \%$	3,89
Sbrel	$\leq 2 \%$	0,73
Intercepto(a)	0 incluido en IC a	[-0,0023; 0,0148]

r: coeficiente de correlación. CVf: coeficiente de variación del factor respuesta. Sbrel: desviación estándar relativa de la pendiente. IC a: intervalo de confianza del intercepto.

El estudio de la linealidad de la curva de calibración en el rango de trabajo resultó ser satisfactorio (Tabla 2). Se observó que los resultados de los análisis estadísticos obtenidos en todos los casos cumplieron con el criterio de aceptación propuestos para cada prueba, pues la ecuación de la curva de calibración obtenida fue: $y = 0,254x + 0,0062$ con un coeficiente de correlación (r) igual a 0,9994, valor superior al establecido (0,99).^(15,16) El resto de los parámetros estudiados también cumplieron con los criterios de aceptación,^(15,16) el CVf (absorbancia/concentración) no fue superior al 5 %, obteniéndose un CV experimental de 3,86 %. La Sbrel calculada tiene un valor de 0,73 %, muy inferior al 2 %, lo que demuestra poca dispersión de los valores de la pendiente. Al aplicar la prueba de proporcionalidad del intercepto, el intervalo de confianza resultó ser [-0,0023; 0,0148]. Por tanto, se puede decir que el método desarrollado es lineal en el rango de concentraciones estudiadas. Adicionalmente se demostró el cumplimiento de la ley de Beer-Lambert.

Los resultados del estudio de exactitud del procedimiento analítico se muestran en la Tabla 3. Se compara los porcentajes de recobrado promedio obtenidos en un experimento de añadido-recobrado, con el 100 por ciento de recobrado para un nivel de confianza del 95 %. Además, se reportan los resultados del cálculo de los porcentajes de recobrado de cada adición y el recobrado global de las tres adiciones. Los porcentajes de recobrado calculados experimentalmente se compararon mediante el estadígrafo *t de Student*, utilizando el programa estadístico STATGRAPHICS 5 Plus versión 5.1.

Los resultados del procesamiento estadístico para la comparación de la media de los porcentajes de recobros, de las cantidades de N-etil maleimido (99,69 %)

obtenidos experimentalmente, con el 100 % de recuperación utilizando la prueba *t de Student*, se muestran en la Tabla 3. Los valores del estadígrafo p obtenido experimental fue de 0,698908, valor superior a 0,05, valor del alfa (α), por lo que la probabilidad estadística de que se cumpla la hipótesis alternativa es baja para un significado estadístico del 95 %; por lo que se cumple la hipótesis nula, por tanto no existe diferencia estadísticamente significativa entre los porcentajes de recobro calculados y el 100 %, por lo que se puede plantear que en las condiciones que estudiamos el procedimiento es exacto.

Los resultados de la evaluación de la precisión en condiciones de (repetibilidad y precisión intermedia) cumplen los criterios de aceptación establecidos,^(15,17,18,21) los CV son inferiores al 3 % para la repetibilidad (Tabla 4) y la no diferencia estadísticamente significativa de los resultados de concentración de grupos maleimido determinados por tres analistas durante 3 días, para la precisión intermedia, utilizando el procedimiento de mínima diferencia significativa de Fisher (LSD) (Fig. 1), corroboran este resultado.

Conclusiones

La estandarización del procedimiento analítico de cuantificación de grupos maleimidos, basado en el método de Ellman por retroceso, demostró que este método puede utilizarse en el proceso de activación de la proteína TT, de la vacuna conjugada SOBERANA[®]02, al mantener un control analítico adecuado y corroborar que es específico, lineal en el intervalo de concentraciones estudiadas, preciso en condiciones de repetibilidad y precisión intermedia y exacto.

Tabla 3. Estudio de la exactitud del procedimiento mediante un experimento de añadido recobrado.

$\mu\text{moles muestra}$	$\mu\text{moles}^* \text{añadidos}$	$\mu\text{moles}^* \text{recobrados calculados}$	% recobrado	% recobro global
0,082	0,169	0,249	98,317	99,69
		0,236	90,606	
		0,265	107,956	
		media	98,96	
	0,338	0,425	101,209	
		0,444	106,992	
		0,395	92,534	
		media	100,25	
	0,676	0,744	97,835	
		0,741	97,353	
		0,760	100,245	
		media	98,48	

* μmoles de grupos maleimidos.**Tabla 4.** Estudio de precisión en condiciones de repetibilidad.

Réplicas	$C_1(\mu\text{mol/mL})$	$C_2(\mu\text{mol/mL})$	$C_3(\mu\text{mol/mL})$	$C_{\text{Media}}(\mu\text{mol/mL})$	SD	CV (%)
1	2,006	2,170	2,186	2,125	0,059	2,78
2	2,104	2,137	2,137			
3	2,104	2,153	2,137			
4	2,100	2,198	2,214			
5	2,165	2,149	2,133			
6	2,100	2,051	2,002			

$C_{1...n}$: concentración de grupos maleimidos. C_m : concentración de grupos maleimidos media ($\mu\text{mol/mL}$). SD: desviación estándar. CV: coeficiente de variación.

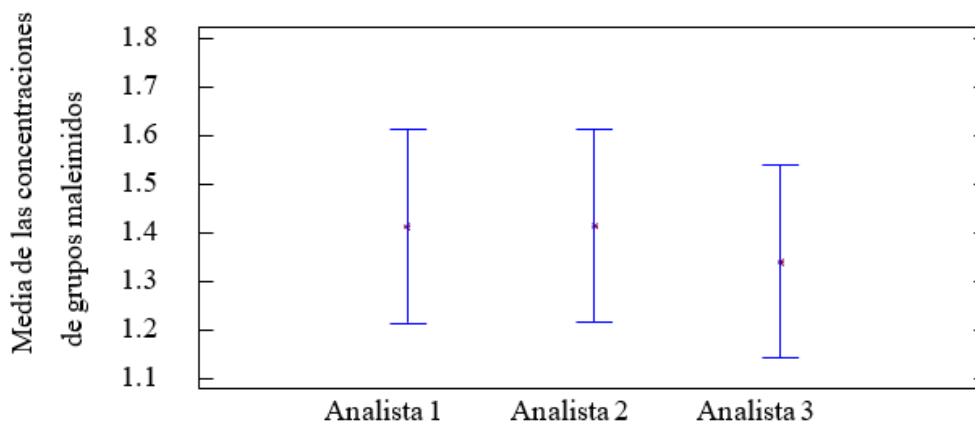


Fig. 1. Resultado del estudio de precisión intermedia comparando los resultados obtenidos por tres analistas en 3 días consecutivos, mediante el intervalo LSD de las medias de las concentraciones de grupos maleimidos, para un nivel de confianza estadística del 95%.

Conflicto de intereses

Los autores no declaran conflictos de intereses.

Roles de autoría

Felix Cardoso-San Jorge: participó en la conceptualización, curación de datos, análisis formal, Investigación, metodología, visualización, redacción (borrador original) y revisión/edición.

Bárbara Baró-Vicet: participó en la conceptualización, curación de datos, investigación, metodología y visualización.

Claudia C. Rodríguez-Elejalde participó en la investigación, visualización.

Lauren M. Quintero-Moreno: participó en la investigación, visualización.

Jean P. Soubal-Mora: participó en la investigación, visualización

Darielys Santana-Mederos: participó en la investigación, visualización.

Sonsire Fernández-Castillo: participó en la investigación, visualización.

Jessy Pedroso-Fernández: participó en el análisis formal, metodología, redacción (borrador original), revisión y visualización.

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

Referencias

1. Scaria PV, Rowe CG, Chen BB, Dickey TH, Renn JP, Lambert LE, et al. Protein-protein conjugation enhances the immunogenicity of SARS-CoV-2 receptor-binding domain (RBD) vaccines. *iScience*. 2022;25(8):104739. doi: <https://10.1016/j.isci.2022.104739>.
2. Dirección de Registros Médicos y Estadísticas de Salud del Ministerio de Salud Pública. Anuario Estadístico de Salud 2022. La Habana: MINSAP; 2023. Disponible en: <https://instituciones.sld.cu/ucmvc/files/2023/10/Anuario-Estad%C3%ADstico-de-Salud-2022-Ed-2023.pdf>. (Consultado en línea:21 abril 2025)
3. Thanh Le T, Andreadakis Z, Kumar A, Gómez-Román R, Tollefsen S, Saville M, Mayhew S. The COVID-19 vaccine development landscape. *Nat Rev Drug Discov*. 2020;19(5):305-6. doi: <https://10.1038/d41573-020-00073-5>.
4. Valdes-Balbin Y, Santana-Mederos D, Quintero L, Fernández S, Rodriguez L, Sanchez-Ramirez B, et al. SARS-CoV-2 RBD-Tetanus Toxoid Conjugate Vaccine Induces a Strong Neutralizing Immunity in Preclinical Studies. *ACS Chem Biol*. 2021;16(7):1223-33. doi: <https://10.1021/acscchembio.1c00272>.
5. Niño-Ramírez VA, Insuasty-Cepeda DS, Rivera-Monroy ZJ, Maldonado M. Evidence of Isomerization in the Michael-Type Thiol-Maleimide Addition: Click Reaction between L-Cysteine and 6-Maleimidehexanoic Acid. *Molecules*. 2022;27(16):5064. doi: <https://10.3390/molecules27165064>.
6. Guo Y, Gu J, Jiang Y, Zhou Y, Zhu Z, Ma T, et al. Regulating the Homogeneity of Thiol-Maleimide Michael-Type Addition-Based Hydrogels Using Amino Biomolecules. *Gels*. 2021;7(4):206. doi: <https://10.3390/gels7040206>.
7. Ahangarpour M, Kavianinia I, Brimble MA. Thia-Michael addition: the route to promising opportunities for fast and cysteine-specific modification. *Org Biomol Chem*. 2023;21(15):3057-72. doi: <https://10.1039/D2OB02262A>.
8. Hoover EC, Roy-Chowdhury C, Ruggiero OM, Day ES. Conjugation of Antibodies and siRNA Duplexes to Polymer Nanoparticles via Maleimide-Thiol Chemistry. *ACS Omega*. 2024;9(48):47637-46. doi: <https://10.1021/acsomega.4c07025>.
9. Moser M, Behnke T, Hamers-Allin C, Klein-Hartwig K, Falkenhagen J, Resch-Genger U. Quantification of PEG-maleimide ligands and coupling efficiencies on nanoparticles with Ellman's reagent. *Anal Chem*. 2015;87(18):9376-83. doi: <https://10.1021/acs.analchem.5b02173>.
10. Torres OB, Jalah R, Rice KC, Li F, Antoline JF, Iyer MR, et al. Characterization and optimization of heroin hapten-BSA conjugates: method development for the synthesis of reproducible hapten-based vaccines. *Anal Bioanal Chem*. 2014;406(24):5927-37. doi: <https://10.1007/s00216-014-8035-x>.
11. Singh R. A sensitive assay for maleimide groups. *Bioconjug Chem*. 1994;5(4):348-51.
12. López CÁM, Garzón MWF, Rosero-Moreano M, Taborda OG. Análisis de cocaína en diferentes muestras por cromatografía de gases con detector de ionización de llama (CG-FID). *Revista Colombiana de Química*. 2015;44(1):19-22. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=309043107003>. (Consultado en línea: 31 agosto de 2022).
13. Wood-Duque M, Hernández-Caso N, Delgado-Martínez I, Montañez-Valdez M, Sánchez-García JC. Validación del método de Ellman para la determinación de la concentración de grupos sulfhidrilosa muestras de la producción de la vacuna sintética contra el Haemophilus influenzae tipo b G de caballo antitoxina tetánica. *VacciMonitor*. 2014;23(2):73-80. Disponible en: <https://vaccimonitor.finlay.edu.cu/>

index.php/vaccimonitor/article/view/29. (Consultado en línea: 1 septiembre de 2022).

14. Saha P, Pandey MM. Design of Experiment (DoE)-Approach Based RP-HPLC Analytical Method Development and Validation for Estimation of Efavirenz in Bulk and Formulations. *J Chromatogr Sci.* 2022;60(1):35-44. doi: <https://10.1093/chromsci/bmab029>.

15. Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (CECMED). Resolución CECMED No. 40/2014: Anexo No.1 de las Buenas Prácticas para Laboratorios de Control de Medicamentos, Validación de Métodos Analíticos. La Habana: CECMED; 2014. Disponible en: <https://www.cecmecmed.cu/reglamentacion/aprobadas/resolucion-cecmecmed-40>. (Consultado en línea: 21 abril 2025).

16. World Health Organization (WHO). The International Pharmacopoeia THIRD EDITION. Geneva: WHO;2003.

17. Romero-Mariscal GM. Validación de un método analítico para la cuantificación de boro en aguas por espectrofotometría, Arequipa-2019. Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutico. Arequipa: Universidad Privada Autónoma del Sur;2020. Disponible en: <http://repositorio.upads.edu.pe/xmlui/handle/UPADS/84>. (Consultado en línea: 1 septiembre de 2022).

18. Má-Pensamiento SF. Validación de los métodos analíticos aplicados al agua potable utilizada en el elaboración de soluciones orales hidratantes de acuerdo a la Farmacopea USP XXV como método documentado de control para el mantenimiento de la calidad de la misma en Laboratorios Alfa Farmacéutica SA. Tesis para optar el título profesional de Ingeniero Químico. Ciudad. de Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala; 2015. Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/35293068.pdf>. (Consultado en línea: 1 septiembre de 2022).

19. Walfish S. Analytical methods: a statistical perspective on the ICH Q2A and Q2B guidelines for validation of analytical methods. *BioPharm International.* 2006;19(12):1-6. Disponible en: <https://www.biopharminternational.com/view/analytical-methods-statistical-perspective-ich-q2a-and-q2b-guidelines-validation-analytical-methods>. (Consultado en línea: 21 abril 2025).

20. Borman P, Elder D. Q2 (R1) validation of analytical procedures: text and methodology. En: Teasdale A, Elder D, Nims RW. ICH quality guidelines: an implementation guide. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 2017.p.127-66.

21. Dalal J, Rana R, Harale K, Hanif S, Kumar N, Singh D, Chhikara MK. Development and pre-clinical evaluation of a synthetic oligosaccharide-protein conjugate vaccine against *Neisseria meningitidis* serogroup C. *Vaccine.* 2019;37(36):5297-5306. doi: <https://10.1016/j.vaccine.2019.07.053>.

Standardization of the Ellman method by retrogression for the quantification of maleimide groups in functionalized tetanus toxoid, for use as a carrier protein

Abstract

Conjugate vaccines have proven to be the most effective and efficient platform for preventing infections caused by encapsulated bacteria (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* type b, among others) and, more recently, against severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2. Among the methods used to obtain conjugate vaccines are those based on the Michael reaction, where one of the macromolecules participating in the reaction is functionalized with maleimide groups; this methodology has been used to obtain the experimental and production batches of the SOBERANA[®]02 vaccine. Therefore, for proper technological performance, it is necessary to know the level of maleimide functionalization of the carrier protein. The objective of the present work was to develop and standardize an analytical procedure for the quantification of the maleimide groups that functionalize the carrier proteins, based on the Ellman method by retrogression, to be used in process controls of the SOBERANA[®]02 vaccine. The main performance parameters recommended by the regulatory entity were evaluated: linearity in the working range of 0.25 - 4 $\mu\text{mol/L}$ of sulfhydryl groups, specificity, precision and accuracy. The statistical procedures based on descriptive and inferential analysis used allowed to determine that the procedure is specific for maleimide groups, linear ($r^2 > 0.98$; CVf < 5%, relative standard deviation (Sbrel) < 2%, and intercept not significant), exact (percentage recovery with no significant difference with 100%) and precise under conditions of intermediate repeatability and precision.

Keywords: carrier proteins; conjugate vaccines; standardization; spectrophotometry; Ellman reactive; maleimides.

Recibido: 26 de diciembre de 2024

Aceptado: 21 de julio de 2025