

Estandarización de un método cromatográfico para evaluar la distribución de tamaño molecular en productos intermedios de la vacuna cubana Quimi-Vio®

Jessy Pedroso-Fernández^{1*} ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5591-4972>
Inaidis Aliaga-González¹ ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4303-0448>
Felix Cardoso-San Jorge¹ ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2540-7934>
Darielys Santana-Mederos¹ ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5333-554X>
Ubel Jesús Ramírez-González¹ ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0435-3949>
Annette Villar-Aneiros¹ ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5182-833X>

¹ Instituto Finlay de Vacunas, La Habana, Cuba.

Autor para correspondencia: jpedroso@finlay.edu.cu

Las infecciones por *Streptococcus pneumoniae* en niños menores de 5 años provocan aproximadamente 600.000 fallecimientos anuales lo que constituye la primera causa de muerte por enfermedades inmunoprevenibles. A nivel mundial se han desarrollado vacunas polisacáridicas no efectivas en la población infantil y, conjugadas, que inducen protección de larga duración en estos grupos más susceptibles a la enfermedad. La Organización Mundial de la Salud regula que se cumplan las especificaciones en este tipo de producto para asegurar la calidad, la seguridad y la eficacia. Uno de los parámetros exigidos en el control de la calidad es el coeficiente de distribución cromatográfico, el cual permite monitorear la consistencia del proceso productivo, de ahí la importancia de contar con un método estandarizado para este fin. La cromatografía líquida de exclusión por tamaño es una de las más ampliamente utilizadas. En el presente estudio se estandarizó un procedimiento por cromatografía de exclusión por tamaño para evaluar el coeficiente de distribución cromatográfico. Se evaluaron los parámetros de desempeño: especificidad, precisión (repetibilidad y precisión intermedia) y robustez. El método demostró ser específico para el polisacárido capsular, modificado y conjugado; preciso, ya que el coeficiente de variación fue ≤ 2 % para la repetibilidad y ≤ 3 % para la precisión intermedia. Se identificaron parámetros a observar a través del estudio de la robustez para asegurar un resultado satisfactorio.

Palabras clave: cromatografía líquida de alta resolución; cromatografía de exclusión; *Streptococcus pneumoniae*; estandarización.

Introducción

Las infecciones por *Streptococcus pneumoniae* constituyen la primera causa de muerte por enfermedades inmunoprevenibles en niños menores de 5 años. Esta bacteria es el segundo agente causal de neumonías adquiridas que requiere hospitalización después del virus sincicial respiratorio. Más del 99 % de las muertes por neumonía se producen en países de bajos y medios ingresos. En el 2015, en la región de las Américas se estimó la incidencia de la infección por el neumococo en 358 casos por cada 100.000 niños causando el fallecimiento, además, de 5.700 infantes.

Entre las causas de muertes por infecciones neumocócicas, la neumonía representa el 81 % y la meningitis el 12 %. En cuanto a la meningitis bacteriana en niños menores de 5 años, hay aproximadamente 1,2 millones de casos y 180.000 muertes anuales. Se estima que, a nivel mundial, más del 90 % de las meningitis bacterianas son causadas por *S. pneumoniae*, *H. influenzae* y *N. meningitidis*. En la actualidad, en la región de las Américas, el *S. pneumoniae* es el principal responsable de las meningitis bacterianas.⁽¹⁾

El factor de virulencia más importante de esta bacteria es su cápsula, la cual permite al neumococo evadir la

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

respuesta inmune al evitar ser fagocitado. Se han descrito 100 serotipos de neumococo de gran diversidad estructural, sin embargo, solamente entre 15 y 20 de estos serotipos se encuentran entre los causantes de la mayoría de las enfermedades neumocócicas a nivel mundial.^(2,3)

Para combatir al neumococo se han desarrollado las vacunas polisacáridicas, como la producida por Merck (PNEUMOVAX[®]23) y Sanofi Pasteur (PNEUMO[®]23). Estas vacunas están indicadas para adultos jóvenes y mayores de 65 años y no son efectivas en niños menores de 2 años, ya que su sistema inmunológico no está totalmente desarrollado y no es capaz de generar respuesta de memoria inmunológica contra estos antígenos. Como alternativa para la población infantil, surgen las vacunas conjugadas que sí inducen una respuesta inmune T-dependiente. En el año 2000, se autorizó en EE. UU la primera vacuna antineumocócica conjugada para siete serotipos comercializada por Wyeth Pharma con el nombre de PREVNAR[®] y que conjuga individualmente el polisacárido capsular de cada serotipo de neumococo con la proteína portadora CRM197, una mutante de la toxina diftérica, dando lugar a una vacuna combinada heptavalente (PCV7) inicialmente y 13 valente (PCV13), en 2010. Otras combinaciones se han desarrollado: SYNFLORIX[™] de GlaxoSmithKline y PNEUMOSIL[®] del Instituto de Sueros de la India, para 10 serotipos y vacunas conjugadas de 14, 15 y 20 valencias.^(4,5)

Debido al impacto del neumococo a nivel mundial, la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomendó a todos los países, incorporar en su sistema nacional de inmunización las vacunas conjugadas contra este patógeno. Dentro de los parámetros de calidad a medir está el coeficiente de distribución cromatográfico (K_D) que se evalúa desde el polisacárido capsular hasta el conjugado, como medida de la consistencia del proceso productivo y el seguimiento de la estabilidad del producto. Este parámetro, además, nos permite estimar el tamaño molecular de las vacunas de polisacáridos, parámetro físico-químico importante que se relaciona con la inmunogenicidad y la seguridad.^(6,7)

Entre los métodos analíticos propuestos para evaluar la K_D , se encuentran la cromatografía líquida de alta resolución, mediante el uso del mecanismo de exclusión

molecular utilizando detectores convencionales de índice de refracción y ultravioleta, unos de los más ampliamente recomendados.^(7,8,9,10,11,12,13)

De gran importancia resulta la estandarización de los métodos analíticos porque aseguran resultados precisos, confiables y reproducibles. Según las normas establecidas por las entidades regulatorias, los parámetros sugeridos para ensayos cualitativos son: especificidad, precisión y robustez, entre otros, según sea el caso.^(14,15,16,17,18,19,20)

El objetivo del presente estudio fue estandarizar el método por cromatografía de exclusión por tamaño para determinar la K_D de los polisacáridos capsulares, productos intermedios y conjugados monovalentes, como parte de la fase de investigación-desarrollo de la vacuna Quimi-Vio[®].

Materiales y Métodos

Los reactivos empleados en la preparación de las disoluciones (cloruro de sodio, hidrogenofosfato de sodio, dihidrogenofosfato de sodio, hidrogenofosfato de amonio), así como el ácido ortofosfórico y azida de sodio, fueron de calidad puros para análisis, provenientes de Merck, Alemania. Se empleó agua desionizada utilizando un sistema de purificación de agua Milli-Q[®]. Los polisacáridos capsulares, modificados y conjugados monovalentes fueron obtenidos en el Instituto Finlay de Vacunas, Cuba. El patrón de peso molecular (P.M): azul de dextrana 2.000, utilizado para la calibración de la columna, proviene de Pharmacia, EE.UU.

Las muestras se diluyeron hasta la concentración de 3 mg/mL (serotipo 1, 5, 14, 19F) y 5 mg/mL (serotipo 6B, 18C y 23F) para los polisacáridos capsulares y modificados, mientras que los conjugados monovalentes y la proteína portadora se evaluó a 0,5 mg/mL de proteína. Todas las muestras se filtraron por filtros de membrana de celulosa regenerada 0,45 μ m, Sartorius, Alemania.

Sistema cromatográfico

Se utilizó un sistema cromatográfico de alta resolución Smartline (Knauer, Alemania), compuesto por un detector UV ($\lambda=206$ nm) y de índice de refracción. Se

empleó una columna cromatográfica de exclusión molecular TSK gel G5000PW (300 x 7,5) mm, 17 mm provista de una precolumna TSK PW-H (75 x 7,5) mm, 13 mm, (Tosoh Bioscience, Japón). La fase móvil fue una disolución salina (NaCl 0,9 % m/v, agua Milli-Q®) a una velocidad de flujo de 1 mL/min y para los polisacáridos del serotipo 1 se utilizó un tampón de hidrogenofosfato de amonio 0,1 mol/L y cloruro de sodio 0,3 mol/L ajustado a pH 4,0. Para la aplicación de la muestra al sistema, se utilizó un inyector Rheodyne modelo 7725i provisto de un lazo de 20 µL. EL software para la adquisición y procesamiento de los resultados fue el ClarityChrom Versión 7.4 (Knauer, Alemania) y el Microsoft Excel versión 2007.

Determinación del coeficiente de distribución cromatográfico

La K_D se calculó de acuerdo a la ecuación 1:

$$K_D = (V_r - V_0) / (V_t - V_0) \quad \text{ecuación 1}$$

donde V_r es el volumen de retención de la muestra, V_0 volumen de exclusión molecular calculado a partir del patrón de azul de dextrana de 2.000 kDa y V_t , volumen de permeación total calculado a partir de la azida de sodio (65 Da).^(9,12,13)

Parámetros de estandarización evaluados

Especificidad

Se evaluó la capacidad del método de identificar inequívocamente el producto de interés. Para ello se compararon los cromatogramas obtenidos al inyectar en el sistema la fase móvil, el polisacárido capsular, los productos intermedios, conjugados monovalentes y proteína portadora.^(14,15,16,17)

Criterios de aceptación:

- Que los tampones de las muestras no interfieran en la medición del pico principal de cada producto a analizar.
- Que la columna cromatográfica empleada sea capaz de diferenciar los valores de K_D de los polisacáridos capsulares y sus productos intermedios, así como el conjugado y la proteína portadora.

Precisión (repetibilidad y precisión intermedia)

La precisión fue evaluada por dos analistas durante dos días diferentes. Cada analista inyectó las muestras de polisacárido capsular, modificado y conjugado monovalente de los serotipos estudiados, así como la proteína portadora por sextuplicado.

Para la precisión intermedia se evaluó la variabilidad entre días y la variabilidad entre analistas. Se reportó el mayor valor para la repetibilidad y la variación entre días.^(14,15,16,17)

Criterios de aceptación:

- Repetibilidad: el coeficiente de variación (CV) de la K_D debe ser ≤ 2 %.
- Precisión intermedia: el CV entre días y analistas de la K_D debe ser ≤ 3 %.

Robustez

Para demostrar la robustez del método se variaron los parámetros de:

- Volumen de inyección (± 10 %)
- Velocidad de flujo (± 10 %)
- Concentración de la fase móvil (± 10 %)
- Variación del pH (± 10 %)

Para cada parámetro estudiado se inyectaron las muestras seis veces y se evaluó la K_D . Se aplicó el diseño de Youden-Steiner para tres y cuatro factores.^(15,16,17,18,19)

Resultados y Discusión

En las regulaciones descritas por el Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED), la Conferencia Internacional para la Armonización de Requisitos Técnicos para el Registro y Uso de Productos Farmacéuticos en Humanos (ICH) y el Centro para el Estudio y Evaluación de Drogas (CDER) no se contemplan los parámetros a evaluar cuando se determina la K_D de un producto. Estas regulaciones plantean que, para llevar a cabo la validación de un método no incluido en sus regulaciones, la definición de los parámetros se realizará caso a caso, según el propósito y las

características del método ensayado. Teniendo en cuenta, además, que el procedimiento analítico es un método cualitativo, se definieron los parámetros de especificidad, precisión y robustez para ser evaluados. (15,16,17,18,19)

Especificidad

Para evaluar la especificidad se compararon los cromatogramas del polisacárido capsular y modificado de los serotipos 1, 5, 6B, 14, 19F, 18C y 23F de neumococo, además de la fase móvil y los parámetros tiempo de retención y K_D (Tabla 1, Fig. 1). Adicionalmente se compararon los cromatogramas, los tiempos de retención de los conjugados monovalentes de cada serotipo y la proteína portadora, así como sus valores de K_D (Tabla 2, Fig. 2).

Tabla 1. Resultado de la evaluación de la especificidad del procedimiento de determinación del coeficiente de distribución (K_D) para los polisacáridos capsulares y modificados.

Muestras	tr (min)	K_D
Polisacárido capsular Sp1	7,35	0,05
Polisacárido modificado Sp1	8,73	0,16
Polisacárido capsular Sp5	7,60	0,17
Polisacárido modificado Sp5	10,32	0,54
Polisacárido capsular Sp6B	7,57	0,11
Polisacárido modificado Sp6B	10,43	0,57
Polisacárido capsular Sp14	7,80	0,20
Polisacárido modificado Sp14	9,13	0,39
Polisacárido capsular Sp18C	7,50	0,17
Polisacárido modificado Sp18C	9,97	0,50
Polisacárido capsular Sp19F	7,50	0,16
Polisacárido modificado Sp19F	9,28	0,39
Polisacárido capsular Sp23F	7,53	0,16
Polisacárido modificado Sp23F	10,40	0,60
tampón de la fase móvil	13,68	-

tr: tiempo de retención. K_D : coeficiente de distribución. Polisacáridos capsulares y modificados de neumococo serotipo 1 (Sp1), serotipo 5 (Sp5), serotipo 6B (Sp6B), serotipo 14 (Sp14), serotipo 18C (Sp18C), serotipo 19F (Sp19F) y serotipo 23F (Sp23F).

Tabla 2. Resultado de la evaluación de la especificidad del procedimiento de determinación del coeficiente de distribución (K_D) para los conjugados monovalentes y la proteína portadora.

Muestras	tr (min)	K_D
Conjugado monovalente Sp5	8,72	0,32
Conjugado monovalente Sp6B	9,23	0,36
Conjugado monovalente Sp14	8,13	0,21
Conjugado monovalente Sp18C	7,97	0,19
Conjugado monovalente Sp23F	8,34	0,30
Proteína portadora toxoide tetánico	10,38	0,53
tampón de la fase móvil	13,68	-

tr: tiempo de retención. K_D : coeficiente de distribución. Conjugados monovalentes de neumococo a toxoide tetánico serotipo 5 (Sp5), serotipo 6B (Sp6B), serotipo 14 (Sp14), serotipo 18C (Sp18C), serotipo 23F (Sp23F).

En la Tabla 1 se observa que el tiempo de retención de la fase móvil es de 13,68 min. Este valor difiere del tiempo de retención de los polisacáridos estudiados, los cuales eluyen, a través de los poros de la columna cromatográfica, teniendo en cuenta su radio hidrodinámico, mediante un proceso de permeación selectiva, mientras que las moléculas de disolvente al ser de menor tamaño acceden a todos los poros de la columna, no se separan selectivamente y eluyen juntas en el volumen de permeación total.⁽²⁰⁾ Por tanto, la fase móvil no interfiere en el ensayo. La estrategia de conjugación que sigue el IFV para obtener los conjugados monovalentes que forman parte de la vacuna heptavalente contra los neumococos, comprende una etapa de fragmentación del polisacárido capsular que disminuye su talla molecular y posteriormente, una de modificación por oxidación peryódica para generar grupos reactivos carbonilos que finalmente se conjugan con los grupos aminos de la proteína portadora, en este caso toxoide tetánico, a través de una reacción de aminación reductiva.^(21,22)

Al comparar los polisacáridos capsulares y sus productos modificados de manera específica en cada serotipo, se puede apreciar que tienen tiempos de retención diferente, y consecuentemente, valores de K_D

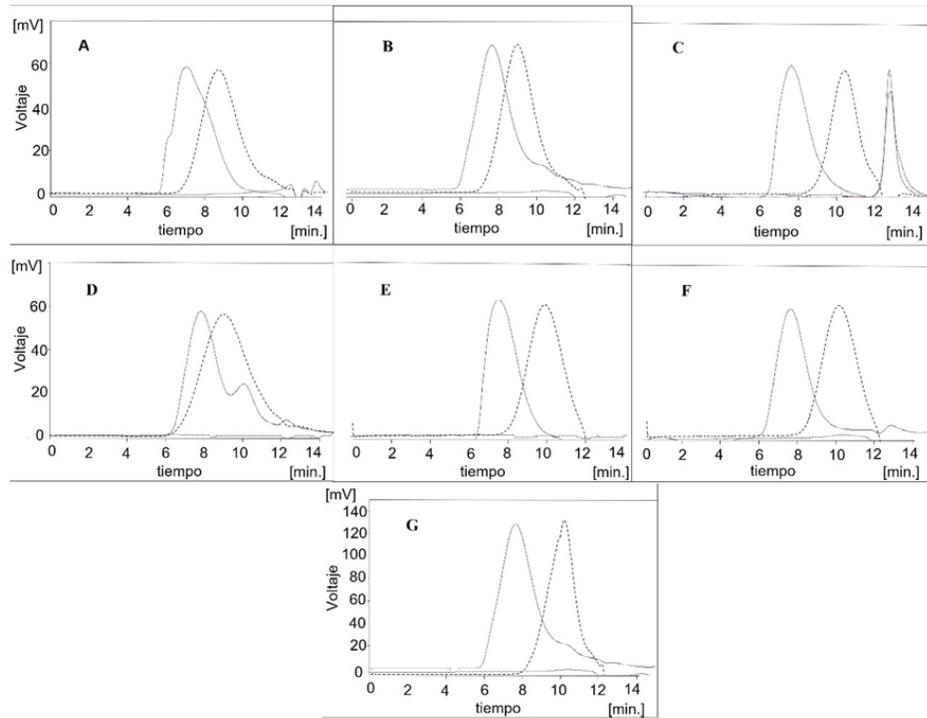


Fig. 1. Evaluación de la especificidad para los polisacáridos capsulares y modificados de neumococo por columna TSK gel G5000PW (300 x 7,5) mm, 17 µm. polisacáridos capsulares y modificados. A. neumococo serotipo 1 (Sp1). B. Serotipo 5 (Sp5). C. Serotipo 6B (Sp6B). D. Serotipo 14 (Sp14). E. Serotipo 18C (Sp18C). F. Serotipo 19F (Sp19F). G. Serotipo 23F (Sp23F). Línea continua: polisacárido capsular. Línea guión: polisacárido modificado. Línea puntos: fase móvil (a nivel de la línea base).

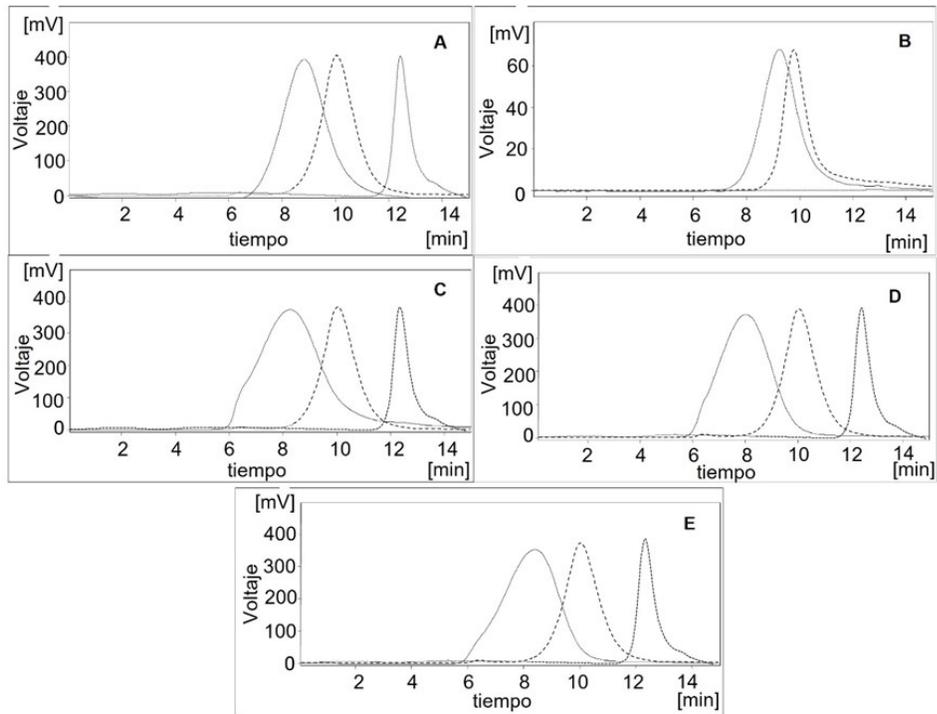


Fig. 2. Evaluación de la especificidad para los conjugados monovalentes de neumococo por columna TSK gel G5000PW (300 x 7,5) mm, 17 µm. A. conjugado monovalente de polisacárido serotipo 5 a toxoide tetánico (Sp5-TT). B. conjugado monovalente de polisacárido serotipo 6B (Sp6B-TT). C. conjugado monovalente de polisacárido serotipo 14 (Sp14-TT). D. Conjugado monovalente de polisacárido serotipo 18C (Sp18C-TT). E. Conjugado monovalente de polisacárido serotipo 23F (Sp23F-TT). Línea continua: conjugado monovalente. Línea guión: proteína portadora. Línea puntos: fase móvil.

que difieren por lo que no existen interferencias entre estos productos. En este caso, el polisacárido capsular tiene una mayor talla que el polisacárido modificado, el cual sufrió el proceso de fragmentación y modificación por lo que siempre tendrá un menor valor de K_D respecto a su producto modificado.

Para el caso de los conjugados monovalentes y la proteína portadora, eluyen de la columna cromatográfica a diferentes tiempos de retención. El tamaño molecular del toxoide tetánico es de aproximadamente 150 kDa mientras los conjugados monovalentes constituyen una molécula de elevada talla molecular y en consecuencia de mayor radio hidrodinámico. La activación múltiple introducida en el polisacárido a lo largo de la cadena y los múltiples grupos amino, como sitios de conjugación que presenta la proteína portadora, producen un entrecruzamiento entre estas moléculas formando un enrejado macromolecular de elevada talla.^(21,22) Respecto a

la señal del tampón de la fase móvil, no interfiere en el ensayo con la señal de los conjugados monovalentes ni la proteína portadora.

Teniendo en cuenta estos resultados, donde no existen interferencias entre los productos comparados entre sí siguiendo los criterios establecidos, podemos decir que el método propuesto es específico.

Precisión

Para la precisión, dos analistas evaluaron las muestras por sextuplicado. En la Tabla 3, se observan los resultados obtenidos para la repetibilidad y la precisión intermedia. Tanto para los polisacáridos capsulares, modificados y conjugados, se cumple con la especificación establecida que plantea que el coeficiente de variación de la K_D debe ser menor al 2 %^(12,15,16,17) por lo que el método es preciso en condiciones de repetibilidad. La mayor variabilidad para la repetibilidad

Tabla 3. Estudio de la precisión del procedimiento de determinación del coeficiente de distribución (K_D) para los polisacáridos capsulares, modificados y conjugados monovalentes.

Polisacárido capsular	CV (%)						
	1	5	6B	14	18C	19F	23F
Repetibilidad (n=6)	1,28	1,94	1,65	1,82	1,50	1,28	1,80
Variabilidad Inter-día (n=12)	2,20	1,89	2,40	1,60	1,74	1,22	1,76
Variabilidad Inter-analista (n=12)	1,90	1,60	2,26	1,55	1,44	1,10	1,56
Polisacárido modificado	CV (%)						
	1	5	6B	14	18C	19F	23F
Repetibilidad (n=6)	1,63	-	0,94	1,66	0,81	-	0,84
Variabilidad Inter-día (n=12)	1,51	-	1,04	1,81	0,78	-	0,84
Variabilidad Inter-analista (n=12)	1,40	-	1,01	0,66	0,77	-	0,81
Polisacárido conjugado	CV (%)						
	1	5	6B	14	18C	19F	23F
Repetibilidad (n=6)	-	1,28	0,73	1,36	1,82	-	1,71
Variabilidad Inter-día (n=12)	-	1,26	3,00	1,46	1,57	-	2,00
Variabilidad Inter-analista (n=12)	-	1,99	2,99	1,18	3,00	-	1,97

n: cantidad de réplicas. CV: coeficiente variación. 1, 5, 6B, 14, 18C, 19F, 23F: polisacáridos de neumococo serotipos 1, 5, 6B, 14, 18C, 19F, 23F, respectivamente.

Tabla 4. Evaluación de los parámetros: volumen de inyección, concentración de la fase móvil, velocidad de flujo y variación del pH de la fase móvil para el ensayo de robustez del procedimiento de determinación del coeficiente de distribución (K_D) de los polisacáridos capsulares, modificados y conjugados de neumococo.

Parámetro para el PsC de Sp 1	(X-x)	Raíz² (S)	Influencia
Volumen inyección	0,0088		Sí
Concentración fase móvil	0,0100	0,0014	Sí
Velocidad de flujo	0,0200		Sí
Variación pH	0,000		No
Parámetro para el PsC de Sp 5	(X-x)	Raíz² (S)	Influencia
Volumen inyección	0,0105		Sí
Concentración fase móvil	0,0105	0,004	Sí
Velocidad de flujo	0,0303		Sí
Parámetro para el PsC de Sp 6B	(X-x)	Raíz² (S)	Influencia
Volumen inyección	0,0094		Sí
Concentración fase móvil	0,0101	0,003	Sí
Velocidad de flujo	0,0067		Sí
Parámetro para el PsC de Sp 14	(X-x)	Raíz² (S)	Influencia
Volumen inyección	0,0125		Sí
Concentración fase móvil	0,0113	0,004	Sí
Velocidad de flujo	0,0037		No
Parámetro para el PsC de Sp 18C	(X-x)	Raíz² (S)	Influencia
Volumen inyección	0,0025		No
Concentración fase móvil	0,0100	0,0036	Sí
Velocidad de flujo	0,0050		Sí
Parámetro para el PsC de Sp 19F	(X-x)	Raíz² (S)	Influencia
Volumen inyección	0,0200		Sí
Concentración fase móvil	0,0100	0,0028	Sí
Velocidad de flujo	0,0100		Sí
Parámetro para el PsC de Sp 23F	(X-x)	Raíz² (S)	Influencia
Volumen inyección	0,0025		No
Concentración fase móvil	0,0050	0,0028	Sí
Velocidad de flujo	0,0075		Sí
Parámetro para el PsM de Sp 1	(X-x)	Raíz² (S)	Influencia
Volumen inyección	0,0005		No
Concentración fase móvil	0,0087	0,0028	Sí
Velocidad de flujo	0,0012		No
Variación pH	0,0500		Sí

Tabla 4. Evaluación de los parámetros: volumen de inyección, concentración de la fase móvil, velocidad de flujo y variación del pH de la fase móvil para el ensayo de robustez del procedimiento de determinación del coeficiente de distribución (K_D) de los polisacáridos capsulares, modificados y conjugados de neumococo (Cont).

Parámetro para el PsM de Sp 6B	(X-x)	Raíz² (S)	Influencia
Volumen inyección	0,0025		No
Concentración fase móvil	0,0700	0,014	Sí
Velocidad de flujo	0,0150		Sí
Parámetro para el PsM de Sp 14	(X-x)	Raíz² (S)	Influencia
Volumen inyección	0,0275		Sí
Concentración fase móvil	0,0125	0,0080	Sí
Velocidad de flujo	0,0125		Sí
Parámetro para el PsM de Sp 18C	(X-x)	Raíz² (S)	Influencia
Volumen inyección	0,0050		No
Concentración fase móvil	0,0775	0,0050	Sí
Velocidad de flujo	0,0025		No
Parámetro para el PsM de Sp 23F	(X-x)	Raíz² (S)	Influencia
Volumen inyección	0,0075		No
Concentración fase móvil	0,0375	0,0070	Sí
Velocidad de flujo	0,0049		No
Parámetro para el conjugado de Sp 5	(X-x)	Raíz² (S)	Influencia
Volumen inyección	0,03		No
Concentración fase móvil	0,10	0,03	Sí
Velocidad de flujo	1,79		Sí
Parámetro para el conjugado de Sp 6B	(X-x)	Raíz² (S)	Influencia
Volumen inyección	0,004		No
Concentración fase móvil	0,080	0,004	Sí
Velocidad de flujo	0,027		Sí
Parámetro para el conjugado de Sp 14	(X-x)	Raíz² (S)	Influencia
Volumen inyección	0		No
Concentración fase móvil	0,01	0,006	Sí
Velocidad de flujo	0,07		Sí
Parámetro para el conjugado de Sp 18C	(X-x)	Raíz² (S)	Influencia
Volumen inyección	0		No
Concentración fase móvil	0,068	0,006	Sí
Velocidad de flujo	0,0163		Sí
Parámetro para el conjugado de Sp 23F	(X-x)	Raíz² (S)	Influencia
Volumen inyección	0,007		No
Concentración fase móvil	0,070	0,007	Sí
Velocidad de flujo	0,025		Sí

PsC: polisacárido capsular. PsM: polisacárido modificado. S: desviación estándar. (X-x): diferencia. Sp 1, Sp 5, Sp 6B, Sp 14, Sp 18C, Sp 19F, Sp 23F: polisacáridos de neumococo serotipos 1,5, 6B, 14, 18C, 19F, 23F, respectivamente.

se encontró para el polisacárido capsular serotipo 5, el polisacárido modificado serotipo 14 y en el caso del conjugado monovalente para el serotipo 18C donde los coeficientes de variación fueron de 1,94; 1,66 y 1,82, respectivamente.

En el caso de la precisión intermedia se comparó el mayor valor del coeficiente de variación entre días para la K_D . Además, se evaluó la variación entre analistas para el mismo parámetro. Todos los resultados fueron menores o iguales al 3 %^(12,15,16,17) por lo que podemos decir que el método es preciso en condiciones de precisión intermedia. La mayor variabilidad inter-día e inter-analista en el polisacárido capsular se encontró para el serotipo 6B. Para el polisacárido modificado se encontró mayor variabilidad inter-día en el serotipo 14 e inter-analista para el serotipo 1. Por último, en el caso de los conjugados monovalentes, la mayor variación inter-día fue para el serotipo 6B e inter-analista para el serotipo 18C.

Robustez

La robustez se define como la susceptibilidad de un método analítico a pequeños cambios deliberados en las condiciones experimentales como variaciones en el volumen de inyección, en la concentración y pH de la fase móvil y la velocidad de flujo entre otros. El diseño de Youden-Steiner que utiliza diseños factoriales fraccionales, es muy útil para evaluar la robustez de un método, pues combina varios factores a la vez.^(18,19) En la Tabla 4 se pueden observar los resultados del ensayo de robustez del método cuando se evaluó la K_D en los polisacáridos y conjugados monovalentes teniendo en cuenta el diseño establecido.

Respecto a los polisacáridos capsulares, en el serotipo 1 no hay influencia en los valores de la K_D cuando existen variaciones en el cambio del pH de la fase móvil; para el serotipo 14, no hay afectaciones en los valores de la K_D cuando existen cambios en la velocidad de flujo, y en el caso del serotipo 18C y 23F la K_D no se afecta con las variaciones realizadas al volumen de inyección.

Para los polisacáridos modificados, no hubo alteración del coeficiente de distribución cuando se varió el volumen de inyección (serotipos 1, 6B, 18C y 23F) y para la velocidad de flujo (serotipos 1, 18C y 23F).

En el caso de los conjugados monovalentes, los parámetros de velocidad de flujo y concentración de la fase móvil deben permanecer inalterados para que los resultados de la K_D sean satisfactorios. La variación del volumen de inyección de la muestra en el rango estudiado no mostró cambios en los valores de K_D , por lo que este parámetro no tiene influencia en la robustez.

Teniendo en cuenta los resultados, podemos decir que los parámetros evaluados deben permanecer inalterados. En muy pocos casos, como la variación del pH de la fase móvil (polisacárido capsular Sp1), velocidad de flujo (polisacárido capsular Sp14, polisacárido modificado Sp1, Sp18C, Sp23F), volumen de inyección (polisacárido capsular Sp18C, Sp23F, polisacárido modificado Sp1, Sp6B, Sp18C, Sp23F y todos los conjugados monovalentes) no se observaron modificaciones en los valores de la K_D por lo que estos parámetros permanecieron inalterables no afectando el método propuesto.

Conclusiones

El método analítico por cromatografía de exclusión por tamaño desarrollado permitió evaluar la K_D , parámetro importante en el control de calidad de los polisacáridos y conjugados monovalentes de la vacuna cubana Quimi-Vio[®]. La estandarización de este procedimiento por cromatografía de exclusión por tamaño para evaluar la K_D demostró ser específico y preciso en condiciones de repetibilidad y precisión intermedia. Respecto a la evaluación del ensayo de robustez, los parámetros de velocidad de flujo, concentración de la fase móvil y el volumen de inyección deben permanecer inalterados para lograr resultados satisfactorios en los valores de la K_D teniendo en cuenta, caso a caso, los productos estudiados. En el caso de los conjugados monovalentes el volumen de inyección no tuvo influencia alguna en los valores de los coeficientes de distribución.

Conflicto de intereses

Los autores no declaran conflictos de intereses.

Roles de autoría

Jessy Pedroso-Fernández: participó en la conceptualización, curación de datos, análisis formal,

investigación, metodología, visualización, redacción del borrador original y revisión/edición.

Inaidis Aliaga-González: participó en la curación de datos, metodología y visualización.

Felix Cardoso-San Jorge: participó en la revisión y visualización.

Darielys Santana-Mederos: participó en el análisis formal, metodología, revisión y visualización.

Ubel Jesús Ramírez-González: participó en la obtención de los productos y en la metodología.

Annette Villar-Aneiros participó en la obtención de los productos y en la metodología.

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

Referencias

1. Organización Panamericana de la Salud (OPS). Neumococo. Washington DC: OPS;2021. Disponible en: <https://www.paho.org/es/temas/neumococo>. (Consultado en línea: 14 de agosto de 2024).
2. Zelada-Valdés A, Cruz-Quevedo M. Bases inmunológicas de la enfermedad neumocócica y el candidato vacunal PVC7-TT. *Rev Cubana Inv Bioméd.* 2021;40(1). Disponible en: <https://revibiomedica.sld.cu/index.php/ibi/article/view/930>. (Consultado en línea: 20 noviembre de 2024).
3. Ganaie F, Saad JS, McGee L, van Tonder AJ, Bentley SD, Lo SW, et al. A New Pneumococcal Capsule Type, 10D, is the 100th Serotype and Has a Large cps Fragment from an Oral Streptococcus. *mBio.* 2020;11(3):e00937-20. doi: <https://10.1128/mBio.00937-20>.
4. Balsells E. Relative importance of *S. pneumoniae* serotypes causing invasive pneumococcal disease in young children after the introduction of conjugate vaccines [Tesis Doctoral]. Edinburgh: The University of Edinburgh; 2021. Disponible en: <https://era.ed.ac.uk/handle/1842/38675?show=full>. (Consultado en línea: 14 de agosto de 2024).
5. Micoli F, Romano MR, Carboni F, Adamo R, Berti F. Strengths and weaknesses of pneumococcal conjugate vaccines. *Glycoconj J.* 2023;40(2):135-48. doi:<https://10.1007/s10719-023-10100>.

6. World Health Organization. Annex 3: recommendations to assure the quality, safety and efficacy of pneumococcal conjugate vaccines. Replacement of WHO technical report series, no. 927, annex 2. Geneva: WHO;2013. Disponible en: http://www.who.int/biologicals/vaccines/TRS_977_Annex_3.pdf, 2013. (Consultado en línea: 14 de agosto de 2024).

7. Brent Irvine G. Molecular Weight Estimation for Native Proteins Using High-Performance Size-Exclusion Chromatography. En: Walker J.M. *The Protein Protocols Handbook*. NJ: Humana Press; 2009.p.1029-37.

8. Neyra C, Clénet D, Bright M, Kensinger R, Hauser S. Predictive modeling for assessing the long-term thermal stability of a new fully-liquid quadrivalent meningococcal tetanus toxoid conjugated vaccine. *Int J Pharm.* 2021;609:121143. doi: <https://10.1016/j.ijpharm.2021.121143>.

9. Sharma P, Kale S, Phugare S, Pendharkar S, Shinde P, Mandhan A, et al. Molecular size distribution in pentavalent (A, C, Y, W, X) meningococcal polysaccharide conjugate vaccine by HPSEC-UV-MALS-RI method- a conceivable stability indicating parameter. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2024;1236:124048. doi: <https://10.1016/j.jchromb.2024.124048>.

10. Parisi L, von Hunolstein C. Determination of the molecular size distribution of Haemophilus influenzae type b-tetanus toxoid conjugate vaccines by size-exclusion chromatography. *J Chromatogr A.* 1999;847(1-2):209-11. doi: [https://10.1016/s0021-9673\(99\)00287-3](https://10.1016/s0021-9673(99)00287-3).

11. Deng JZ, Lancaster C, Winters MA, Phillips KM, Zhuang P, Ha S. Multi-attribute characterization of pneumococcal conjugate vaccine by Size-exclusion chromatography coupled with UV-MALS-RI detections. *Vaccine.* 2022;40(10):1464-71. doi: <https://10.1016/j.vaccine.2022.01.042>.

12. Thiébaud J, Fanget I, Jaudinaud I, Fourrichon L, Sabouraud A, Talaga P, Uhlrich S. Development and validation of high-performance size exclusion chromatography methods to determine molecular size parameters of Haemophilus influenzae type b polysaccharides and conjugates. *Anal Biochem.* 2014;453:22-8. doi: <https://10.1016/j.ab.2014.02.020>.

13. Khan I, Taufiqur R KM, Saad Us J SM, Mahbulbul K, Muktedir A, Maheshwari A, et al. A High-

- Throughput Size Exclusion Chromatography Method to Determine the Molecular Size Distribution of Meningococcal Polysaccharide Vaccine. *Int J Anal Chem.* 2016; 2016:9004068. doi: <https://10.1155/2016/9404068>.
14. United States Pharmacopeial Convention. The United States Pharmacopeia USP 28: the National Formulary NF 23. Rockville, Md: United States Pharmacopeial Convention; 2005.
15. Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (CECMED). Regulación No. 41-2007. Validación de métodos analíticos. La Habana: CECMED; 2007.
16. ICH. Harmonised Tripartite Guideline Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). London: ICH; 2005.
17. Center for drug evaluation and research (CDER). Reviewer Guidance. Validation of Chromatographic methods. Beltsville: FDA Press; 1994.
18. Sundaram Palaniswamy M. Development and partial validation of a SEC method for high-resolution separation and quantification of monoclonal antibodies. Bangalore: Agilent Technologies Pvt Ltd; 2016. https://lcms.cz/labrulez-bucket-strap-h3hsga3/5991_6303_EN_73423dfbd6/5991-6303EN.pdf. (Consultado en línea: 14 agosto de 2024).
19. Karageorgou E, Samanidou V. Youden test application in robustness assays during method validation. *J Chromatogr A.* 2014;1353:131-9. doi: <https://10.1016/j.chroma.2014.01.050>.
20. Quattrocchi OA, Abelaira de Adrizzi S, Laba RF. Introducción a la HPLC. Buenos Aires: Artes gráficas; 1992.
21. Soubal JP, Lugo A, Santana-Mederos D, Garrido R, Rodríguez-Noda LM, Pérez-Nicado R. Effect of O-Acetylation on the Antigenicity and Glycoconjugate Immunogenicity of the Streptococcus Pneumoniae Serotype 7F Capsular Polysaccharide. *Chembiochem.* 2025;26(1):e202400684. doi: <https://10.1002/cbic.202400684>.
22. Chang-Calderón J, Serrano-Rodríguez Y, Garrido-Arteaga R, Pedroso-Fernández J, Cardoso-San Jorge F, Rodríguez-Noda L, et al. *VacciMonitor.* 2017;26(1):8-16. Disponible en: <https://vaccimonitor.finlay.edu.cu/index.php/vaccimonitor/article/view/162/293>. (Consultado en línea: 14 de agosto de 2024).

Standardization of a chromatographic method to evaluate the molecular size distribution in intermediate products of the Cuban vaccine Quimi-Vio®

Resumen

Streptococcus pneumoniae infections are the first cause of death from vaccine-preventable diseases such as bacteremia, meningitis, otitis media and pneumonia in children under five years of age, which causes approximately 600,000 deaths annually in childhood. In order to combat pneumococcus, polysaccharide vaccines have been developed worldwide, which are not effective in the child population, and conjugated vaccines, which do induce long-lasting protection in these groups more susceptible to the disease. The World Health Organization regulates that the specifications required for this type of product are met in order to ensure quality, safety and efficacy. One of the parameters required for quality control is the chromatographic distribution coefficient, which allows monitoring the consistency of the production process, hence the importance of having a standardized method for this purpose. Size exclusion liquid chromatography is one of the most widely used. In the present study, a size exclusion chromatography procedure was standardized to evaluate K_D . The performance parameters: specificity, precision (repeatability and intermediate precision) and robustness were evaluated. The method proved to be specific for capsular, modified and conjugate polysaccharide; accurate since the parameters that the coefficient of variation was $\leq 2\%$ for repeatability and $\leq 3\%$ for intermediate precision are met. Parameters to be observed were identified through the robustness study to ensure a satisfactory result.

Keywords: HPLC; exclusion chromatography; *Streptococcus pneumoniae*; standardization.

Recibido: 27 de enero de 2025

Aceptado: 22 de septiembre de 2025