VacciMonitor 2026;35:e103526
www.vaccimonitor.finlay.edu.cu
Artículo Original

Establecimiento de un método de cromatografía líquida de alta resolución para la cuantificación de proteína no enlazada en el conjugado de la vacuna SOBERANA®02

Aida Yaima Merchán-Milia[1]* ORCID: https://orcid.org/0009-0000-1065-9683
Yalaydis Plutin-Ocaña[1] ORCID: https://orcid.org/0009-0005-3633-0903
Mario Landys Chovel-Cuervo[1] ORCID: https://orcid.org/0000-0002-6991-7007
Ileana Delgado-Arrieta[1] ORCID: https://orcid.org/0009-0007-7495-2935
Lucy Herrera-Guada[1] ORCID: https://orcid.org/0000-0002-0233-902X
Darielys Santana-Mederos[1] ORCID: https://orcid.org/0000-0001-5333-554X

[1]Instituto Finlay de Vacunas, La Habana, Cuba.

Autor por correspondencia: ymerchan@finlay.edu.cu

SOBERANA®02 es una vacuna basada en la plataforma de subunidades proteicas, obtenida a partir de la conjugación química de la proteína recombinante del dominio de unión al receptor de la proteína de la espícula del coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo severo al toxoide tetánico absorbida en hidróxido de aluminio. La cuantificación de la proteína no enlazada en el conjugado constituye un atributo crítico para evaluar la efectividad del proceso de conjugación y garantizar la calidad del producto vacunal. El objetivo del trabajo fue validar un método por cromatografía líquida de alta resolución para cuantificar la proteína no enlazada, estableciendo un límite de aceptación menor del 20 %. Se utilizaron tres lotes de conjugado y se evaluaron por cromatografía de exclusión molecular en un sistema acoplado a un detector de arreglo de diodos, y una columna de Superdex 75 increase 10/300 (Cytiva). Las concentraciones se determinaron a partir de una curva de calibración con un material de referencia y se evaluaron los siguientes parámetros: idoneidad del sistema, linealidad y rango, precisión, exactitud, especificidad, límite de cuantificación y límite de detección. El coeficiente de variación al evaluar la idoneidad del sistema en términos de precisión del tiempo de retención fue 0,011 % y el factor de asimetría 1,18. Los coeficientes de variación en los ensayos de precisión intra e interensayo estuvieron dentro de los intervalos establecidos para cada uno (≤ 1 % y ≤ 5 %). La exactitud del método demostrada por los porcientos de recobro obtenidos 90 y 110 % y en todos los niveles de concentración estudiados se obtuvo un coeficiente de variación < 2 % entre los recobrados. El límite de cuantificación calculado para el método fue de 0,0129 µg/mL y el límite de detección de 0,0043 µg/mL. Los resultados obtenidos confirman la robustez del método y avalan su empleo para la cuantificación de proteína no enlazada, lo que garantiza la calidad del conjugado en las muestras de vacuna.

Palabras clave: estudio de validación; HPLC; toxoide tetánico; vacunas SARS-CoV-2.

Introducción

La enfermedad causada por el coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-COV-2, por sus siglas en inglés) ha constituido un desafío para las entidades de salud a nivel mundial.(1) Para mitigar esta pandemia, muchas instituciones e investigadores(1) han desarrollado diferentes candidatos vacunales bajo diferentes plataformas y tecnologías, incluidos virus atenuados e inactivados, toxinas inactivadas, ácidos nucleicos (ADN y ARN) o simplemente segmentos del patógeno (vacunas subunitarias y conjugadas). Muchos de estos candidatos vacunales se han logrado obtener mediante péptidos sintéticos o recombinantes que pueden incluir a uno o más antígenos con una gran capacidad inmunogénica o con una eficiente estimulación del sistema inmunitario del huésped. Son vacunas mucho más seguras y fáciles de producir, pero habitualmente requieren de coadyuvantes para lograr producir una respuesta inmune apropiada.(2,3,4)

SOBERANA®02 es un candidato vacunal innovador desarrollado por Instituto Finlay de Vacunas (IFV) de

* Lic. Bioquímica, MSc., Especialista de Alta Tecnología en Control de la Calidad. Instituto Finlay de Vacunas. La Habana, Cuba.

conjunto con el Centro de Inmunología Molecular (CMI), basado en la plataforma de vacunas de subunidades proteicas.[5] Se obtiene a partir de la conjugación química de la proteína recombinante del dominio de unión al receptor (RBD, por sus siglas en inglés) de la proteína de la espícula del virus SARS-COV-2 al toxoide tetánico (TT) que permite incrementar la inmunogenicidad e inducir memoria inmunológica. Estos candidatos vacunales utilizan un RBD recombinante con secuencia 319-354 producido en células de ovario de hámster chino (CHO) modificadas genéticamente. Durante el proceso de conjugación de la proteína RBD a la proteína portadora (proteína de toxoide tetánico activado) es necesario cuantificar la cantidad de RBD no enlazado después del proceso de conjugación como medida de calidad del antígeno.[6,7,8] En la Dirección de Calidad del IFV, se diseñó un método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) para la cuantificación de dicha proteína, utilizando un material de referencia de RBD monomérico (RBDm) debidamente caracterizado como curva de calibración.

En la actualidad los laboratorios de control de la calidad de la Industria Farmacéutica no sólo se ocupan de analizar si un producto cumple o no con sus requisitos de calidad mediante la utilización de métodos analíticos establecidos o diseñados para cada uno de ellos, sino también demuestran, a través de la validación de cada método analítico, la calidad y confiabilidad de sus productos.[9,10]

La validación de un método analítico es el proceso por el cual queda establecido por estudios experimentales, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica y desempeña un papel determinante, pues de ella depende la comprobación y seguridad de los índices de calidad de las materias primas y productos finales, esto contribuye notablemente al aseguramiento de la calidad, confiabilidad y eficacia.[11]

El objetivo de este trabajo fue validar un método para determinación de RBD no enlazado en el conjugado RBD-TT mediante HPLC-SEC (*High performance liquid chromatography- size exclusion chromatography*, por sus siglas en inglés) de manera que se pueda evidenciar que el ensayo es lo suficientemente fiable para ser utilizado en el control de calidad de este ingrediente farmacéutico activo del candidato vacunal cubano conjugado SOBERANA®02.

Materiales y Métodos

Para garantizar buenos resultados durante el proceso de validación y como exigencia regulatoria de este tipo de ensayo, se realizó la calificación de los diferentes componentes del sistema HPLC. Se utilizó un sistema HPLC equipado con un desgasificador, una bomba, un detector de arreglo de diodos, un controlador y el software LC solutions para la adquisición de datos. Una vez demostrado que el sistema HPLC cumplía satisfactoriamente con el protocolo de calificación propuesto por el fabricante,[12,13,14] se procedió a la validación del método, para ello se empleó una columna Superdex 75 increase 10/300 (Cytiva) a un flujo de trabajo de 0,5 mL/min, una presión de 1,8 mPa, detección 206 nm, volumen de inyección de la muestra de 100 µL y 0,2 mol/L de fosfato de sodio - 0,15 mol/L NaCl a pH 7,0, constituyó la fase móvil. Fueron utilizados tres lotes de conjugados monovalentes RBD-TT y se evaluaron los siguientes parámetros: idoneidad del sistema (expresa las condiciones del sistema cromatográfico), precisión (en función de la repetibilidad y la precisión intermedia), exactitud, linealidad y rango, especificidad, límite de cuantificación (LC) y límite de detección (LD).[15]

Idoneidad del sistema

Este parámetro se evaluó a través de las respuestas de seis inyecciones de una disolución de acetona al 1 % (volumen de inyección 20 µL). Se realizaron además cinco inyecciones del material de referencia RBDm (1)/21 para evaluar el factor de cola o asimetría del pico. Se determinaron las variabilidades de los parámetros cromatográficos: tiempo de retención (Tr), número de platos teóricos (N), altura equivalente de un plato teórico (HETP), factor de cola o asimetría (A). Se calculó la media y el coeficiente de variación (CV %) entre las réplicas.[16]

Precisión

Precisión intraensayo

Se evaluaron seis réplicas de tres lotes al 100 % de la concentración nominal por un mismo analista, bajo las mismas condiciones de operación. Se determinaron las medias, desviaciones estándares típicas (DS) y el coeficiente de variación CV % entre los valores de porciento de RBD no enlazado obtenidos para cada una de las muestras ensayadas.[17]

Precisión interensayo

El ensayo se realizó con el diseño propuesto y se evaluaron tres réplicas de cada lote de conjugado RBD-TT en estudio por dos analistas, con fases móviles preparadas por cada uno en días diferentes. Se calculó la media, la DS y CV entre los valores de porciento de RBD no enlazado obtenido por ambos analistas mediante una prueba de intervalo de confianza para dos varianzas utilizando el método de Levene ($p > 0,05$).[17]

Exactitud

Se empleo el método de recuperación, a partir de tres lotes de conjugado RBD-TT, preparados de forma independiente a tres niveles de concentración. Los lotes fueron cargados individualmente con un material de referencia certificado (RBDm(1)/21) utilizando seis réplicas independientes por nivel. Se determinaron, el intervalo de confianza de los valores de concentración hallados, así como el CV de los porcentajes de recobro obtenidos para cada uno de los conjugados estudiados.[7,11] Se aplicó la prueba *t Student* para comparar el recobrado medio y la concentración esperada.

Linealidad y rango

Para la evaluación de este parámetro se prepararon 2 mL de cada uno de los puntos de la curva de calibración. La curva se confeccionó a partir de un material de referencia RBDm(1)/21 realizando seis réplicas de cada punto. Se determinó la ecuación de la recta, el coeficiente de correlación ($r \geq 0,99$) y el coeficiente de determinación ($\geq 0,98$) de la curva de calibración promedio obtenida.[18] Además, se demostró la linealidad en el rango de la curva de calibración.

Especificidad

La evaluación de este parámetro se realizó a los tres lotes de conjugado RBD-TT utilizados en el estudio. Para demostrar la capacidad del método de identificar solo el analito de interés, las muestras se evaluaron bajo condiciones diferentes: almacenadas a temperatura entre 2-8 ºC y sometidas durante 72 horas a condiciones de estrés térmico (80 ºC).[19]

Límite de detección y cuantificación

Para este estudio se realizó una extrapolación de los datos de las curvas de calibración obtenidas en el ensayo de linealidad, a partir de los cinco niveles de concentración evaluados. Para estimar ambos límites se aplicaron cálculos matemáticos:

LD = 3,3 (DS de la respuesta en el nivel más bajo) / pendiente.

LC = 10 (DS de la respuesta en el nivel más bajo) / pendiente.[7,8]

Resultados y Discusión

Los resultados obtenidos para todos los parámetros de desempeño establecidos en el protocolo de validación permiten valorar la capacidad del método para proporcionar mediciones confiables y reproducibles bajo las condiciones analíticas definidas. En este acápite se presentan los resultados experimentales obtenidos y su comparación con los criterios de aceptación previamente establecidos.

Idoneidad del sistema

La idoneidad del sistema cromatográfico fue evaluada mediante la verificación de los parámetros establecidos para garantizar el adecuado desempeño del equipo y de método analítico. Los resultados obtenidos demostraron un comportamiento satisfactorio del sistema, evidenciado por la consistencia de los tiempos de retención, la adecuada respuesta del detector y la reproducibilidad de las inyecciones (Tabla 1, Tabla 2). Asimismo, los valores de factor de asimetría, número de platos teóricos y coeficiente de variación (CV %) del área de los picos cumplieron con los criterios de aceptación definidos.

Tabla 1. Evaluación de los parámetros de idoneidad del sistema HPLC.

Acetona 1 % n=6	Tiempo de retención (Tr)	Factor de asimetría (A)	HETP	Nº de platos teóricos (N)
Media	39,485	1,186	11,650	85.839,464
DS	0,004	0,007	0,042	307,818
CV (%)	0,011	0,551	0,358	0,359

DS: desviación estándar. CV: coeficiente de variación. HETP: altura equivalente de un plato teórico.

Tabla 2. Evaluación de la idoneidad del sistema para el analito en estudio RBDm1/(21).

RBDm1/(21) n=5	Tiempo de retención (Tr)	Factor de asimetría (A)
Media	20,60	0,954
CV (%)	0,09	1,47
Criterio USP	-	< 2

USP: Farmacopea de los Estados Unidos, por sus siglas en inglés. CV: coeficiente de variación.

Este estudio corroboró que el sistema de HPLC utilizado estaba funcionando correctamente y demostró que cumple con los requisitos establecidos para un ensayo cromatográfico,[16] es decir, que el CV expresa que el sistema es lo suficientemente preciso para garantizar los resultados de este parámetro en la validación del método de ensayo; posee una buena asimetría, valor muy cercano a 1 que es el valor ideal, lo que posibilita la exactitud de la integración del pico y su cuantificación. El número de platos teóricos (N) calculado con la acetona 1 % indica que la eficiencia de la columna es lo suficientemente alta como para garantizar la calidad del ensayo, demostrando así que factores tales como el tamaño de partículas de la columna, la temperatura, la velocidad de flujo y la viscosidad de la fase móvil, así como el peso molecular del analito no influyen negativamente en el ensayo. Se confirma que el sistema HPLC operó bajo condiciones óptimas, garantizando la confiabilidad y calidad de los datos.

Precisión

La precisión o sensibilidad medida por inyecciones múltiples de una muestra homogénea indica la resolución del sistema de HPLC bajo determinadas condiciones cromatográficas. En este caso, este parámetro fue evaluado en función de la precisión intraensayos y la precisión interensayos.[17]

Precisión intraensayos

La precisión intraensayo se evaluó mediante el análisis repetido de muestras preparadas de forma independiente bajo las mismas condiciones experimentales. Los resultados obtenidos (Tabla 3) mostraron una adecuada concordancia entre las determinaciones evidenciada por el coeficiente de variación (CV < 2%), cumpliendo con el criterio de aceptación establecido para los que se plantea que un método de cuantificación de impurezas, coeficientes de variación entre un 5 - 10 % pueden ser aceptables.[7,17]

Precisión interensayos

Para los lotes evaluados, los CV obtenidos en la precisión interensayos (Tabla 4) entre los dos analistas cumplieron con el criterio de aceptación (< 5 %),[7,17] lo que sugiere que el método mantiene un desempeño consistente frente a las variaciones habituales del procedimiento analítico, demostrando su adecuada

Tabla 3. Estudio de la repetibilidad del método HPLC.

Lote	RBD-TT no enlazado (%) (Media ± 2 DS)	CV (%)
EC-CMCVRBD-2105	10,938 ± (0,002)	0,4
EC-CMCVRBD-2106	17,40 ± (0,0009)	0,2
EC-CMCVRBD-2107	17,24 ± (0,0003)	0,1

DS: desviación estándar. CV: coeficiente de variación.

Tabla 4. Estudio de la precisión intermedia del método.

Lote	Media (%) RBD-TT no enlazado (Media/analista)		Media (%) RBD-TT no enlazado (Media ± 2 DS)	CV (%)	P
EC-CMCVRBD-2105	Analista 1	11,223	11,29 + (0,92065)	3,8	0,463
	Analista 2	11,352			
EC-CMCVRBD-2106	Analista 1	15,9740	16,41 + (1,234749)	3,7	0,559
	Analista 2	16,8471			
EC-CMCVRBD-2107	Analista 1	16,9382	17,16 + (0,634981)	2,3	0,160
	Analista 2	17,3872			

DS: desviación estándar. CV: coeficiente de variación.

precisión intermedia y confiabilidad para su aplicación rutinaria. Además, al analizar los resultados mediante la prueba de intervalo de confianza para dos varianzas utilizando el método de Levene se obtuvieron valores de $p > 0,05$ para todos los lotes evaluados, pudiendo inferir que no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos por ambos analistas.

Exactitud

La exactitud del método se evaluó mediante estudios de recuperación a tres niveles de concentración (bajo, medio, alto) con un material de referencia, dentro del rango de trabajo establecido. En cada nivel se realizaron determinaciones independientes, calculándose el porcentaje de recuperación como medida de la concordancia entre la concentración teórica y la concentración hallada. Los resultados (Tabla 5) demuestran que el método presenta una exactitud adecuada en todo el rango evaluado (98,33 % - 99,90 %) con intervalos de confianza que incluyen el valor de referencia y coeficientes de variación CV < 2% en todos los casos.[7,11,15] Estos resultados confirman la ausencia de sesgo sistemático y la idoneidad del método para la cuantificación del analito. El análisis estadístico mediante prueba *t Student* no evidenció diferencias significativas entre los valores experimentales y los teóricos ($p > 0,05$). Estos resultados demuestran que el método presenta una exactitud adecuada a lo largo del rango de trabajo evaluado, cumpliendo los criterios de aceptación establecidos para métodos cuantitativos por HPLC.[7,11]

Linealidad y rango

La linealidad del método se evaluó en un intervalo de 25-200 µg/mL, mediante niveles de concentración. La relación entre la concentración del analito y la respuesta cromatográfica mostró un comportamiento lineal en todo el rango estudiado. Al analizar los gráficos de las

Tabla 5. Evaluación de la exactitud del método de HPLC.

Lote	Concentración verdadera (mg/mL)	Concentración hallada (mg/mL)	Recobro (Media %)	CV recobro (%)	IC	p
EC-CMCVRBD-2105	0,107	0,1066	99,66	1,37	98,23-101,09	0,57
EC-CMCVRBD-2106	0,151	0,148	98,33	1,67	96,61-100,05	0,056
EC-CMCVRBD-2107	0,174	0,173	99,9	0,22	99,67-100,13	0,31

DS: desviación estándar. CV: coeficiente de variación.

Tabla 6. Evaluación de la linealidad del método de HPLC.

Niveles	Concentración (µg/mL)	Área (media)	CV (%)	R (media) = 0,9997 R^2 (media) = 0,9996
1	25	2973417	0,00	
2	50	6959219	1,5	
3	100	14425434	0,7	
4	150	21375639	0,6	
5	200	29210174	0,9	

CV: coeficiente de variación R: coeficiente de correlación. R2: coeficiente de determinación.

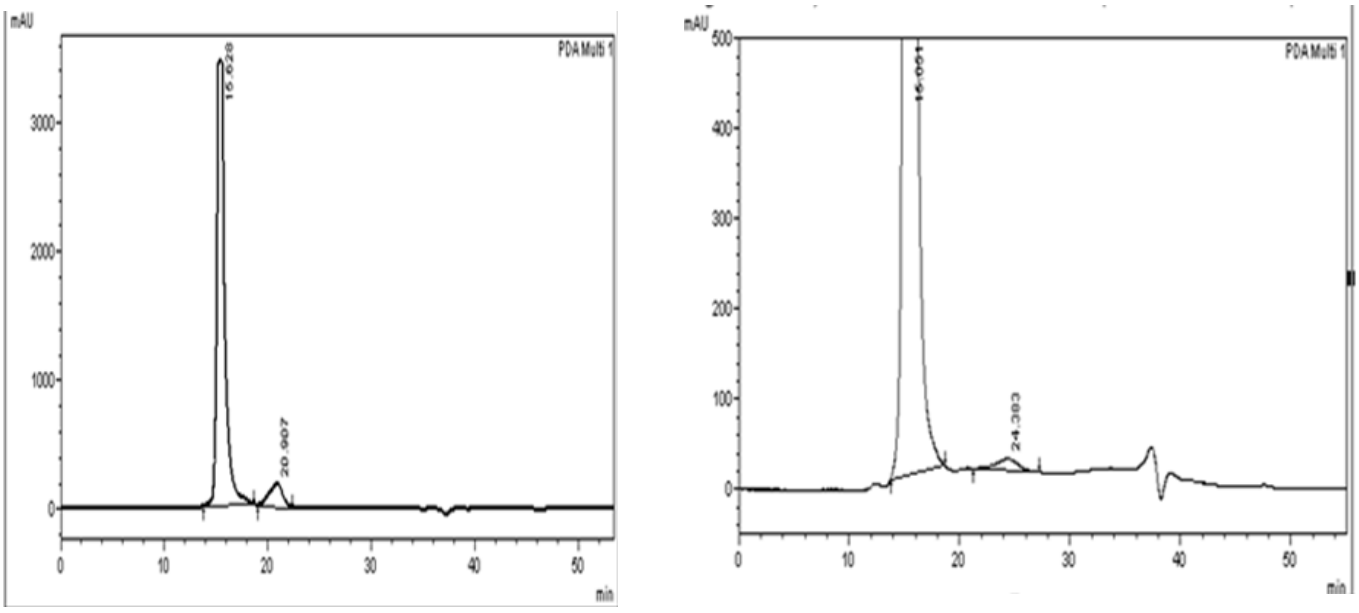
curvas de calibración (Tabla 6) se obtuvo un coeficiente de correlación (r)= 0,9997 y un coeficiente de determinación (R2) =0,9996 evidenciando un adecuado ajuste al modelo lineal.[18] La baja dispersión observada entre las réplicas de cada nivel y la consistencia entre curvas independientes adicionales confirman la reproducibilidad del método y su idoneidad para la cuantificación de proteína residual en el intervalo evaluado.

Especificidad

La especificidad del método se evaluó mediante estudios de degradación forzada de acuerdo con las guías ICH Q1A (R2),[19] sometiendo la muestra a condiciones de estrés térmico. El análisis por HPLC-PDA (*High performance liquid chromatography- photo array detector*, por sus siglas en inglés) permitió la evaluación del perfil cromatográfico (Fig. 1) bajo condiciones de degradación, observándose cambios en el comportamiento del analito tratado con un desplazamiento de 4 min sin interferencias en su tiempo de retención, lo que confirma la capacidad del mismo para discriminar la proteína residual frente a productos de degradación en concordancia con lo reportado previamente en métodos estabilidad-indicadores desarrollados por HPLC-PDA, esto evidencia la especificidad del método.[19]

Límite de cuantificación y detección

El LD y el LQ del método fueron de 0,0043 µg/mL y 0,0129 µg/mL, respectivamente. Estos parámetros fueron estimados a partir de la desviación estándar de la respuesta obtenida en el nivel más bajo de concentración y la pendiente de la curva de calibración, de acuerdo con



A **B**

Fig. 1. Estudio de especificidad del método. A: perfil cromatográfico tipo de un conjugado RBD-TT almacenado de 2-8 ºC. B: perfil cromatográfico del conjugado sometido a condiciones de estrés (72 h a 80 ºC).

la Guía del Consejo Internacional para la Armonización de los Requisitos Técnicos de los Productos Farmacéuticos de Uso Humano ICH Q2(R2).[7]

Los valores obtenidos evidencian una elevada sensibilidad del método HPLC-PDA para la determinación de proteína libre, permitiendo su detección y cuantificación a niveles traza dentro de matrices complejas.

En conjunto, los resultados de la validación demuestran que el método HPLC-PDA desarrollado es adecuado para la cuantificación de proteína libre en muestras de conjugados. El método presentó linealidad satisfactoria en el intervalo evaluado, alta sensibilidad analítica y adecuada precisión, junto con una especificidad comprobada frente a productos de degradación generados bajo estrés térmico. Estos hallazgos confirman la robustez del procedimiento analítico y su idoneidad para el análisis de rutina de proteína residual en matrices complejas.

Conclusiones

El método HPLC-PDA desarrollado resultó adecuado para la cuantificación de proteína libre, demostrando linealidad, sensibilidad y precisión aceptables, asimismo la especificidad del método, confirmada mediante estudios de degradación forzada, evidencia su capacidad para el análisis selectivo del analito. El método es apto para su aplicación en el control analítico del conjugado monovalente y la cuantificación de la proteína libre.

Conflicto de Intereses

Los autores no declaran conflictos de intereses.

Roles de autoría

Aida Yaima Merchán-Milia: conceptualización, diseño, investigación, metodología, análisis formal y redacción del documento original.

Yalaydis Plutin-Ocaña: investigación, metodología, análisis formal y revisión del documento.

Mario Landys Chovel-Cuervo: investigación, análisis formal, revisión del documento.

Ileana Delgado-Arrieta: investigación, análisis de datos, revisión del documento.

Lucy Herrera-Guada: investigación, análisis formal, revisión del documento.

Darielys Santana-Mederos: Investigación, metodología, análisis formal, revisión del documento.

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

Referencias

1. World Health Organization (WHO). WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020. Ginebra: OMS; 2020. Disponible en: https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020. (Consultado en línea: 12 diciembre, 2025).

2. Francis MJ. Recent Advances in Vaccine Technologies. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 2018; 48(2):231–41. doi: https://10.1016/j.cvsm.2017.10.002.

3. Nagy A, Alhatlani B. An overview of current COVID-19 vaccine platforms. Comput Struct Biotechnol J. 2021; 19:2508-17. doi: https://10.1016/j.csbj.2021.04.061.

4. World Health Organization (WHO). COVID-19 vaccine tracker and landscape [homepage on the internet]. Ginebra: OMS; c2021-12. Disponible en: https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines. (Consultado en línea: 12 diciembre, 2025).

5. CECMED. Resolución CECMED No 156/2021 Modifica la Resolución No 144 de agosto del año 2021 del CECMED la cual otorgó la Autorización de Uso en Emergencia a la vacuna cubana SOBERANA®02, de nombre genérico Vacuna anti COVID-19 conjugada de subunidad proteica, para ampliar su indicación en población pediátrica a partir de los 2 años de edad. La Habana: CECMED; 2021. Disponible en: https://www.cecmed.cu/reglamentacion/ambito-regulador/indice?field_instrumento_legal_value=&field_content_value=&page=0%. (Consultado en línea:12 diciembre, 2025).

6. CECMED. Resolución CECMED No. 174/2021 Ampliación de la indicación de la vacuna cubana SOBERANA®PLUS, formulación con tiomersal a convalecientes de COVID-19, mayores de 19 años de edad, con 2 meses o más de su alta médica. La Habana: CECMED; 2021. Disponible en: https://www.cecmed.cu/node/63569. (Consultado en línea: 12 diciembre, 2025).

7. European Medicines Agency/Committee for Medicinal Products for Human Use/International Council for Harmonization (EMA/CHMO/ICH). ICH Q2(R2). Validation of analytical procedures - Scientific guideline EMA/CHMO/ICH/82072/2006, 14 December 2023. Amsterdam: EMA; 2023. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q2r2-guideline-validation-analytical-procedures-step-5-revision-1_en.pdf. (Consultado en línea: 12 diciembre, 2025).

8. International Council for Harmonization (ICH) Expert Working Group on Technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Impurities in new Drug products Q3B (R2). Amsterdam: EMA; 2006. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-3-b-r2-impurities-new-drug-products-step-5_en.pdf. (Consultado en línea: 12 diciembre, 2025).

9. 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.cecmed.cu/reglamentacion/aprobadas/resolucion-cecmed-40. (Consultado en línea: 12 diciembre, 2025).

10. Huber L. Validation of Analythical Methods: Validation and Qualification in Analytical Laboratories. 2nd Edition. New York: Informa Healthcare; 2007. Disponible https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&opi=89978449&url=https://www.scirp.org/reference/referencespapers%3Freferenceid%3D1589017&ved=2ahUKEwi12Ore1o6LAxWRMlkFHUfiNJYQFnoECBIQAQ&usg=AOvVaw3KQlwVCX_GFAErHTO3JjBe. (Consultado en línea: 12 diciembre, 2025).

11. Farmacopea de los Estados Unidos de América. General Chapter 1225 Validación de Procedimientos Farmacopeicos. Rockville, MD: Farmacopea de los Estados Unidos de América; 2022.

12. Shimadzu Corporation. Instruction Manual Solvent Delivery Module for Shimadzu High Performance Liquid Chromatograph LC-20AD Prominence 7.7 System Validation 7-28. Kyoto: Shimadzu Corporation; 2017.

13. Shimadzu Corporation. Instruction Manual Autosampler for Shimadzu High Performance Liquid Chromatograph Sil-20-20A, 7.6 System Validation 7-14. Kyoto: Shimadzu Corporation; 2017.

14. Shimadzu Corporation. Instruction Manual Photodiode Array UV-VIS Detector for Shimadzu High Performance Liquid Chromatograph SPD-M20A Prominence 7.6 System Validation 7-23. Kyoto: Shimadzu Corporation; 2017.

15. CECMED. Regulación No. 37/2012. Buenas Prácticas de Laboratorio para el Control de Medicamentos. La Habana: CECMED; 2012. Disponible en: https://www.cecmed.cu/sites/default/files/adjuntos/ambitor/AmbReg-162.pdf. (Consultado en línea: 12 diciembre, 2025).

16. Swartz ME, Krull IS. Handbook of analytical validation. London: CRC Press; 2012.

17. Rudd DR. Suitability of Analytical methods for stability testing - Is the room for Improvement? Journal of Validation Technology. 2001;5 (3): 255-61.

18. Castro M, Gascón S, Pujol M, Sans JM, Vicente L. Validación de métodos analíticos. Madrid: Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria;1989.

19. International Council for Harmonization (ICH). Q 1 A (R2): Stability testing of new drug substances and products - step 5. Amsterdam: EMA; 2003. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/ich-q1a-r2-stability-testing-new-drug-substances-drug-products-scientific-guideline. (Consultado en línea: 12 diciembre, 2025).

Establishment of a high-resolution liquid chromatography method for the quantification of unbound protein in the SOBERANA®02 vaccine conjugate

Abstract

SOBERANA®02 is a vaccine based on a protein subunit platform, produced by chemically conjugating the recombinant receptor-binding domain of the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 spike protein to tetanus toxoid absorbed in aluminum hydroxide. Quantifying the unbound protein in the conjugate is a critical attribute for evaluating the effectiveness of the conjugation process and ensuring the quality of the vaccine product. The objective of this work was to validate an HPLC method for quantifying the unbound protein, establishing an acceptance limit of less than 20 %. Three batches of conjugate were used and evaluated by size-exclusion chromatography on a system coupled to a diode array detector and a Superdex 75 column with a 10/300 increment (Cytiva). Concentrations were determined from a calibration curve using a reference material, and the following parameters were evaluated: system suitability (linearity and range), precision, accuracy, specificity, limit of quantification, and limit of detection. The coefficient of variation for evaluating system suitability in terms of retention time precision was 0.011 %, and the skewness factor was 1.18. The coefficients of variation in the intra- and inter-assay precision tests were within the established ranges for each (≤ 1 % and ≤ 5 %). The accuracy of the method was demonstrated by the recovery percentages obtained (90 % and 110 %), and at all concentration levels studied, a coefficient of variation of < 2 % was obtained between recoveries. The calculated limit of quantification for the method was 0.0129 µg/mL, and the limit of detection was 0.0043 µg/mL. The results obtained confirm the robustness of the method and support its use for the quantification of unbound proteins, thus ensuring the quality of the conjugate in vaccine samples.

Keywords: validation study; HPLC; tetanus toxoid; SARS-CoV-2 vaccines.

Recibido: 16 de diciembre de 2025 *Aceptado: 12 de octubre de 2026*