

## Validación de método cromatográfico para determinar impurezas de la proteína recombinante del virus SARS-CoV-2

**Cómo citar:** Cisneros Mustelier, G., Romero Fernández, A., Nápoles Cuesta, A.L. & Serrano Patterson, A. (2026). Validación del método de cromatografía para la determinación de impureza de la proteína recombinante del virus SARS-CoV-2. *Memorias Calidad UH*, 3, 100-114. <https://revistas.uh.cu/mccuh>

\*Autor para la correspondencia:

**Greter Cisneros Mustelier\***

[greter.cisneros@cigbmariel.cu](mailto:greter.cisneros@cigbmariel.cu)

Industrial Biotecnológico CIGB-Mariel S.A

<https://orcid.org/0009-0002-0525-3093>

**Arlet Romero Fernández**

[arlet.romero@cigbmariel.cu](mailto:arlet.romero@cigbmariel.cu)

Industrial Biotecnológico CIGB-Mariel S.A

**Amanda Lázara Nápoles Cuesta**

[amanda.napoles@cigbmariel.cu](mailto:amanda.napoles@cigbmariel.cu)

Industrial Biotecnológico CIGB-Mariel S.A

**Ariadna Serrano Patterson**

[ariadna.serrano@cigbmariel.cu](mailto:ariadna.serrano@cigbmariel.cu)

Industrial Biotecnológico CIGB-Mariel S.A

### RESUMEN

La cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa es uno de los métodos más utilizados para la purificación, análisis y caracterización de proteínas. Como parte de la transferencia tecnológica de la técnica en los laboratorios de control de la calidad en Industrial Biotecnológico CIGB-Mariel fue necesaria la validación de la misma para el ingrediente farmacéutico activo de la proteína recombinante del dominio de unión a receptor del virus SARS-CoV-2. El objetivo de este trabajo es validar el método cromatográfico para la determinación de impurezas en la proteína recombinante del virus SARS-CoV-2. Para ello, se determinaron: especificidad, linealidad, precisión, robustez, idoneidad del sistema, límites de detección y cuantificación. La separación cromatográfica se logró en una columna C18 4.6×250 de 5 µm, la fase móvil se administró a un caudal de 1 mL/min con detección UV a 226 nm. Como resultado, el método analítico es capaz de detectar productos de degradación debido al tratamiento térmico, lo que demuestra su utilidad en los estudios de estabilidad. El método es preciso, ya que es capaz de reproducir los resultados con una variación menor que 2 % en diferentes días, analistas y sistemas. Es robusto, dado que ligeras modificaciones en las condiciones de corridas no afectan los resultados de las muestras analizadas y es lineal en el intervalo de 20 µg a 60 µg de proteína. Según los

resultados y su comparación con los criterios de aceptación, se puede considerar validada la técnica.

**Palabras clave:** cromatografía, proteína recombinante, SARS-CoV-2, validación.

## ABSTRACT

High-performance reversed-phase liquid chromatography is one of the most widely used methods for protein purification, analysis, and characterization. As part of the technology transfer process for this technique in the quality control laboratories at Industrial Biotecnológico CIGB-Mariel, its validation was required for the active pharmaceutical ingredient, the recombinant protein of the receptor-binding domain of the SARS-CoV-2 virus. The objective of this work is to validate the chromatographic method for the determination of impurities in the recombinant SARS-CoV-2 virus protein. To this end, the following were determined: specificity, linearity, precision, robustness, system suitability, limits of detection, and limits of quantification. Chromatographic separation was achieved on a 5  $\mu\text{m}$  C18 4.6 $\times$ 250 column; the mobile phase was administered at a flow rate of 1 mL/min with UV detection at 226 nm. As a result, the analytical method is capable of detecting degradation products due to heat treatment, demonstrating its usefulness in stability studies. The method is accurate, capable of reproducing results with a variation of less than 2% across different days, analysts, and systems. It is robust, as slight modifications in running conditions do not affect the results of the analyzed samples, and is linear in the 20  $\mu\text{g}$  to 60  $\mu\text{g}$  protein range. Based on the results and their comparison with the acceptance criteria, the technique can be considered validated.

**Keywords:** chromatography, recombinant protein, SARS-CoV-2, validation.

## INTRODUCCIÓN

El Complejo Industrial Biotecnológico CIGB-Mariel es una sociedad mercantil de capital ciento por ciento cubano y primer negocio de alta tecnología que se inaugura en el sector A3 de la Zona Especial de Desarrollo Mariel. Cuenta con equipos para trabajar desde el escalado de productos y procesos hasta la etapa de producción industrial, cumpliendo elevados estándares tecnológicos y regulatorios. Al CIGB-Mariel se realizó una transferencia tecnológica desde el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) para la producción de la vacuna Abdala, desarrollada para la vacunación contra el virus SARS-CoV-2 (CIGB, 2021).

La vacuna Abdala demostró una eficacia del 92.3 % en prevenir las enfermedades severas y la muerte producto del SARS-CoV-2 (Más-Bermejo y otros, 2022). De igual forma, fue segura e inmunogénica en su aplicación a la población pediátrica entre 3 y 18 años (Hernández y otros, 2024). Como ingrediente farmacéutico activo (IFA) contiene el dominio de unión al receptor (RBD) de la proteína de la espiga del virus SARS-CoV-2. Durante la pandemia por COVID-19, se observó que la mayor parte de los anticuerpos neutralizantes y aproximadamente el 50 % de la respuesta celular contra este virus, se dirigen a la proteína de la espiga (S), que contiene el RBD, que es la enzima convertidora de la angiotensina 2 (ACE2).

Para la transferencia tecnológica, es necesario llevar a cabo ensayos de laboratorio como parte de la caracterización del IFA y asegurar la calidad del producto, lo que requirió la validación de los métodos analíticos.

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés) es una técnica de separación muy utilizada debido a su gran versatilidad, ya que cubre un amplio espectro de aplicaciones, con rapidez y con excelentes resultados, siendo además un muy buen método analítico cuantitativo. Se aplica en casi todos los laboratorios donde se realizan análisis químicos, bioquímicos y farmacéuticos, tanto de rutina como de investigación (Lister, 2005; Pabale y otros, 2024).

Según la Organización Oficial de Químicos Analíticos (AOAC, por sus siglas en inglés), para garantizar la confiabilidad de los resultados, los métodos validados deben someterse a verificación, utilizando un material de referencia de estabilidad conocida, cada vez que se produzca un cambio en sus condiciones de utilización, para asegurar que los parámetros de desempeño se mantienen aceptables (Latimer, 2023). Estas buenas prácticas son también asumidas por las agencias regulatorias (Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos, 2012) y los organismos de armonización de los Requisitos para el Registro de Productos Farmacéuticos de Uso Humano (ICH, 2025).

La validación de los métodos analíticos incluye la determinación de los parámetros siguientes (AMSbiopharma, 2025; Dong y otros, 2020; Thompson y otros, 2002):

- Especificidad: Capacidad de medir el analito en presencia de otros componentes (impurezas, excipientes o efectos de la matriz).
- Linealidad: Debe existir una correlación directa entre la concentración del analito y la respuesta de la señal en un rango definido.
- Exactitud: Los resultados deben ser cercanos al valor real, a menudo demostrado con materiales de referencia y expresados como porcentaje de recuperación.
- Precisión: Incluye repetibilidad (mismas condiciones) y precisión intermedia (diferentes analistas, instrumentos o días), medida mediante la desviación estándar relativa porcentual (%RSD por sus siglas en inglés).
- Límite de detección (LOD por sus siglas en inglés) y límite de cuantificación (LOQ por sus siglas en inglés): Definen la cantidad mínima de analito detectable o cuantificable con exactitud y precisión.
- Robustez: La fiabilidad del método ante pequeñas variaciones deliberadas de las condiciones. Los factores modificados se examinan posteriormente en un diseño experimental y se evalúa su efecto en la(s) respuesta(s) del método.
- Idoneidad del sistema: Comprobaciones rutinarias para confirmar que el sistema analítico funciona según lo previsto.

Teniendo en cuenta que los ensayos de control de calidad al RBD del virus SARS-CoV-2 se deben realizar en una nueva planta, con nuevos equipos y diferentes analistas el objetivo de este trabajo es validar el método de cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (HPLC-RP) para la determinación de impurezas en la proteína recombinante del virus SARS-CoV-2.

## DESARROLLO

### **Equipamiento, materiales y métodos**

Se emplearon dos sistemas de HPLC: LAHPLC01 y LAHPLC03 (Knauer modelo Azura), equipados con bombas capaces de producir gradientes, un detector ultravioleta (UV), desgasificador en línea, horno para las columnas, inyector manual o autoinyector.

Las condiciones cromatográficas fueron:

- Columna: E1002217-1-1 C18 4.6X250 5um Vydac 218TP58
- Longitud de onda: 226 nm
- Temperatura: ambiente (34 °C)
- Flujo: 1 mL/min
- Inyección: 40 µg
- Tiempo de Retención del IFA: (27.0 ± 0.2) min
- Tiempo total de corrida: (50.0 ± 0.2) min

Fueron analizadas muestras de los lotes: ingrediente farmacéutico activo 19.IFA.C108, muestra de proteína obtenida de la cromatografía de afinidad por iones metálicos (IMA) 19.IMA.C108 y material de referencia (MR) AgRBD-01-0221.

Las disoluciones empleadas fueron:

- Ácido trifluoracético (TFA) 0,1 % (Solución A).
- Ácido trifluoracético (TFA) 0,05 % en Acetonitrilo (Solución B).
- Tampón de la formulación del IFA (1B.IFA.B24001-01).
- Tampón de la formulación del IMA (1B-IMA24002-EL-P).

Los tampones o *buffers* son soluciones componentes de las formulaciones proteicas con sales de fosfato para regular el pH.

### **Parámetros de la validación**

#### a) Especificidad

Para evaluar la especificidad se inyectaron las soluciones tampón de la formulación del IMA y del IFA de RBD, para determinar qué señales del cromatograma corresponden con los componentes de la formulación.

Criterio de aceptación: En el cromatograma del tampón del IMA y del IFA de RBD no debe aparecer ninguna señal en el tiempo de retención del pico principal de la RBD y sus especies minoritarias.

#### b) Demostración de la idoneidad del método para los estudios de estabilidad.

Como parte de los estudios de estrés del IFA un lote se trató en la siguiente condición:

Tratamiento térmico: muestra de IFA a 45 °C por 1, 3 y 5 días. Las muestras tratadas se analizaron para comprobar si algunos picos se incrementan con el tratamiento y/o aparecen otros nuevos que no se observan en la muestra no tratada. Los nuevos picos detectados se colectaron para ser analizados e identificados por espectrometría de masas.

Se realizaron tres réplicas del MR por cada tiempo de muestreo, de forma que se incluyan al inicio, mediados y final del tiempo de análisis, así como dos réplicas de la muestra sin tratar. Se midió la altura y la asimetría de los picos de cada una de las réplicas del IFA, comparando con la muestra sin tratar en el día y se reportaron las medias de la altura y de la asimetría de los picos.

Criterio de aceptación para todos los tratamientos: El perfil cromatográfico de la muestra tratada debe ser cualitativa y cuantitativamente diferente al de la muestra sin tratamiento.

c) Linealidad

Se realizó una curva de calibración de la especie de RBD asumiendo que la respuesta de todas las especies minoritarias corresponde a impurezas relacionadas con el producto, considerando que las modificaciones de la molécula no provocan cambios significativos en el espectro UV de absorción de la proteína y que la detección se realiza en la región de muy buena señal de absorción (226 nm) donde absorben los enlaces peptídicos de la molécula. Se utilizó el MR de RBD AgRBD-02-1021 a una concentración de 1,66 mg/mL. El rango de la curva cubrió las cantidades: 20 µg, 30 µg, 40 µg, 50 µg y 60 µg de proteína total inyectada, que comprenden el rango entre 50 % y 150 % de la cantidad nominal inyectada en el ensayo (40 µg). Se calculó la regresión de la recta obtenida teniendo en cuenta el área contra la cantidad inyectada y se calculó el coeficiente de correlación y la ecuación de la recta.

Criterio de aceptación: coeficiente de determinación  $R^2 = 0,99$ .

d) Límites de detección y cuantificación

Se inyectaron diferentes cantidades de la especie de RBD que comprendan entre un 1 % y un 62,5 % de la cantidad nominal de RBD inyectado en cada ensayo (40 µg). Las cantidades son: 1 µg (2,5 %), 5 µg (12,5 %), 10 µg (25 %), 15 µg (37,5 %), 20 µg (40 %) y 25 (62,5 %). Se analizó la señal ruido de cada corrida.

Criterio de aceptación:

- Límite de detección: cantidad de muestra aplicada cuya señal corresponda a 3,3 veces el ruido del sistema.
- Límite de cuantificación: cantidad de muestra aplicada cuya señal corresponda a 10 veces el ruido del sistema.

e) Precisión

- Repetibilidad:

Se analizó por duplicado un lote de IFA y por triplicado el MR en los dos sistemas de HPLC por un analista en un día. Se calculó el porcentaje del área de la especie mayoritaria de la RBD. Se evaluó la variación del tiempo de retención de la especie principal y del porcentaje del área de la especie principal.

Criterio de aceptación: Para los datos de un día para un analista en cada sistema. El coeficiente de variación en un día debe ser  $\leq 1$  % para los tiempos de retención de todos los picos (European Pharmacopoeia Commission, 2021).

- Precisión intermedia:

Se realizaron tres ensayos por dos analistas en un mismo día y en el mismo sistema de HPLC.

- Variabilidad entre sistemas de HPLC:

Se realizaron tres ensayos por un analista en los dos sistemas de HPLC, donde se analizó por duplicado un lote de IFA de RBD y por triplicado el MR. Se realizó un análisis de variancia (Prueba F para varianza de dos muestras) con el porcentaje de pureza del pico principal para demostrar que no existen diferencias significativas entre los sistemas de HPLC.

Criterio de aceptación: Para la varianza la prueba F debe ser:  $F < F_{crit}$ .

f) Ensayo de idoneidad del sistema (*System Suitability Test*).

Para establecer el ensayo de adecuación del sistema se analizó el material de referencia al inicio, medio y final del ensayo. Además, también se analizó por duplicado el lote de IFA de RBD. Se realizó una dilución del MR de RBD que representa el 2 % (0.8 µg) de la cantidad nominal aplicada (40 µg) diluyendo con agua grado reactivo tipo I. A esta dilución se le denominó Solución de referencia. Esta solución de referencia se aplicó dos veces al inicio del ensayo.

El orden de aplicación del ensayo fue el siguiente:

- 1- Solución de referencia 2 % del Material de referencia AgRBD-01-2221
- 2- Solución de referencia 2 % Material de referencia AgRBD-01-2221
- 3- Material de referencia vigente AgRBD-01-2221
- 4- Lote de IFA de RBD. Réplica 1
- 5- Material de referencia vigente AgRBD-01-2221
- 6- Lote de IFA de RBD. Réplica 2
- 7- Material de referencia vigente AgRBD-01-2221

Se analizó el tiempo de retención, el área y el porcentaje de pureza de la especie principal. Criterio de aceptación del ensayo: Para la media del tiempo de retención y el porcentaje de área de la especie principal del MR, el coeficiente de variación (CV) de debe ser menor o igual a 0.62 %, tomando en consideración los requerimientos del CV máximo permitido para la repetibilidad establecido en la Farmacopea Europea para tres réplicas y un valor de 3 para la desviación estándar relativa máxima permitida para inyecciones repetidas de la solución de referencia (European Pharmacopoeia Commission, 2021).

El promedio del área del pico principal de la solución de referencia debe representar entre 1.5 % y 2.5 % del área del pico principal del IFA de RBD.

g) Robustez

Se realizaron ligeras modificaciones de las condiciones de operación del sistema variando en la fase móvil  $\pm 0,1$  % de TFA en las soluciones A y B y utilizando dos columnas cromatográficas C18 Vydac (4,6 x 250 mm, 5µm). Se analizó por duplicado un lote de IFA en cada condición en el sistema de HPLC, se realizó un análisis de varianza teniendo en cuenta las combinaciones de la Tabla 1.

**Tabla 1. Combinaciones para el análisis de la robustez**

Orden	Concentración de TFA Solución A (%)	Concentración de TFA Solución B (%)	Columna C18 Vydac
1	0.09	0.04	Columna 1
2	0.09	0.04	Columna 2
3	0.11	0.04	Columna 2
4	0.09	0.06	Columna 2
5	0.11	0.04	Columna 1
6	0.11	0.06	Columna 1
7	0.09	0.06	Columna 1
8	0.11	0.06	Columna 2

Criterio de aceptación: No debe haber diferencias significativas para la determinación de la media del porcentaje del área de la especie principal de la IFA. Se considerará como hipótesis  $H_0$  existen diferencias significativas entre los valores utilizando el valor de probabilidad ( $p \leq 0,05$ ).

### Resultados y discusión

#### a) Especificidad

En las Figuras 1 y 2 se observan los cromatogramas obtenidos para cada muestra con su tampón de formulación correspondiente.

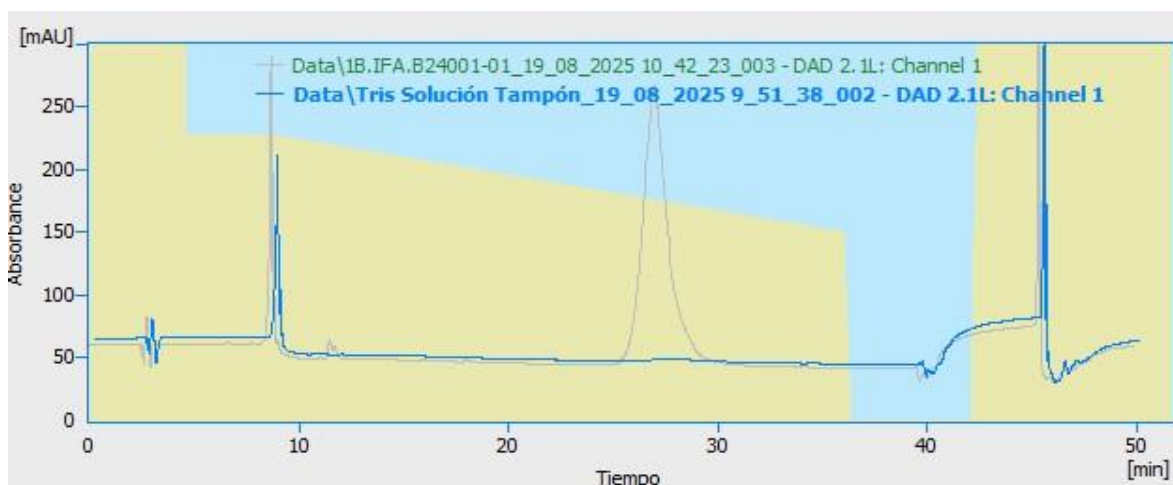


Figura 1. Cromatograma obtenido del IFA de RBD y el tampón Tris 20mM

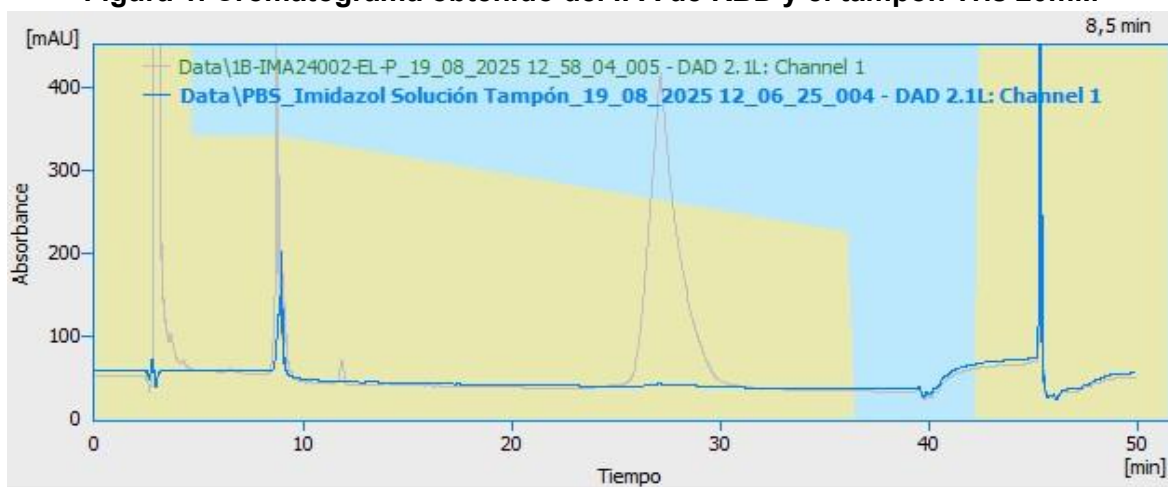


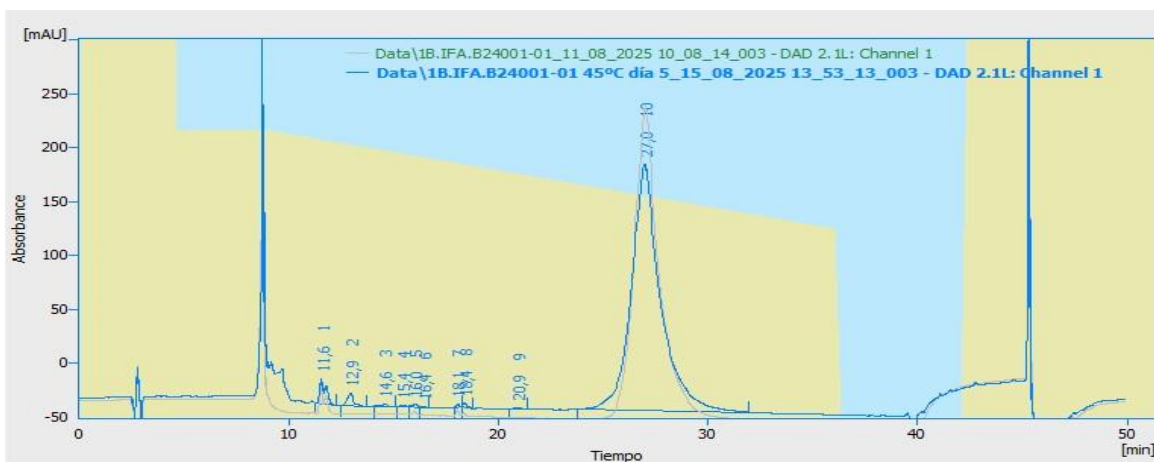
Figura 2. Cromatograma obtenido del IMA de RBD y el tampón de PBS/Imidazol

En los cromatogramas de ambos tampones no se detectó ninguna señal en el tiempo de retención del pico principal de la RBD y sus especies minoritarias. Se obtuvo el perfil característico del IFA y del IMA de RBD sobre los 27 minutos de corrida con un porcentaje de pureza para el pico principal de 99,54 % y 98,90 % respectivamente. Las especies minoritarias se obtuvieron entre los 10 y 22 minutos de corrida tanto para el IFA como el IMA de RBD con un porcentaje de área de 0,46 % y 1,10 % respectivamente, demostrando

que el método es capaz de separar la RBD sin que interfieran otros componentes de la muestra.

b) Demostración de la idoneidad del método para los estudios de estabilidad

Para determinar si el método es capaz de detectar productos de degradación que pueden aparecer durante los estudios de estabilidad se sometió el lote de IFA de RBD 1B.IFA.B24001-01 a una temperatura de 45 °C durante cinco días. Se analizó por duplicado en cada ensayo al primer, tercer y quinto día de tratamiento. En la Figura 3 se observa que al quinto día de análisis se detectan señales que no estaban en la muestra sin tratar, así como un aumento en la intensidad de otras especies, que sí se encuentran en el perfil característico de la RBD. Entre las señales más significativas destacan las dos primeras especies que se observan en cromatograma con tiempo de retención de 11,6 min y 12,9 min de corrida (picos 1 y 2).



**Figura 3. Cromatograma obtenido del IFA 1B.IFA.B24001-01 de RBD y luego del tratamiento térmico a 45 °C 5 días.**

En ese mismo periodo la especie principal tuvo un valor de pureza de 95,81 %, lo que representa una disminución de un 2,70 % con respecto al 98,51 % que tenía la muestra sin tratar. Esta disminución significativa de la pureza evidencia la degradación de la proteína. Fueron detectados nueve picos en el IFA después de los cinco días de tratamiento térmico, que pueden ser proteínas, compuestos o degradaciones de la propia RBD, pero la baja intensidad de estas señales imposibilita su secuenciación por espectrometría de masas. El factor temperatura provocó a su vez una ligera deformación del pico y ensanchamiento. Como resultado, se demuestra que el método de HPLC-RP fue capaz de separar productos de degradación del RBD en condiciones de estrés por tratamiento térmico, siendo el perfil cromatográfico de la muestra tratada cualitativa y cuantitativamente diferente al de la muestra sin tratamiento.

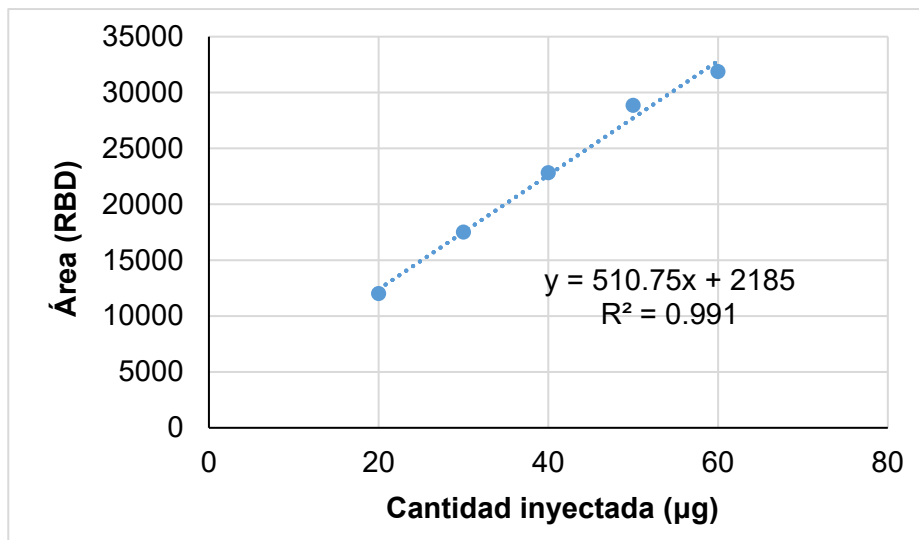
c) Linealidad

En la Tabla 2 se muestran las cantidades inyectadas y el porcentaje de área de la especie principal de RBD para las tres réplicas realizadas por cada punto de la curva. El ensayo mostró una respuesta lineal en el rango entre 20 µg y 60 µg. Se obtuvo un coeficiente de

correlación de 0.991, valor que se corresponde con el criterio de aceptación establecido para el ensayo el cual fue  $R^2=0,99$  (Figura 4).

**Tabla 2. Datos obtenidos durante el experimento de linealidad en el rango entre 50 % y 150 % de la carga nominal**

Carga Nominal (%)	50	75	100	125	150
Cantidad inyectada ( $\mu\text{g}$ )	20	30	40	50	60
Área (RBD)	12012,32	17404,21	22743,05	28891,04	31870,36
	12000,03	17558,31	22846,04	28907,72	31741,53
	12019,16	17569,94	22887,92	28747,41	32024,85
Media	12010,50	17510,82	22825,67	28848,72	31878,91
Stdv	9,70	92,51	74,55	88,14	141,86
CV (%)	0,08	0,53	0,33	0,31	0,44



**Figura 4. Linealidad del método obtenida en el rango entre 50 % y 150 % de la carga nominal inyectada**

#### d) Límites de detección y cuantificación

Para la determinación del límite de detección y cuantificación se utilizó el material de referencia (MR) de RBD AgRBD-02-1021 a una concentración de 1.66 mg/mL. Se realizaron tres réplicas por cada punto de la curva comprendida entre 2,5% y un 62,5 % de la cantidad nominal de RBD inyectado en cada ensayo (40  $\mu\text{g}$ ). En la Tabla 3 se muestran las cantidades inyectadas, así como la relación señal/ruido (S/R) obtenida durante el ensayo.

**Tabla 3. Valores de la relación señal/ruido obtenidos en el ensayo de determinación del límite de detección y cuantificación del IFA de RBD**

Cantidad inyectada ( $\mu\text{g}$ )	Ruido (pA)	S/R	Media S/R
1	7,65	1,52	1,26
	7,19	1,23	
	7,00	1,05	
5	32,56	3,11	3,26
	34,28	3,52	
	33,44	3,16	
10	68,87	8,04	7,07
	67,49	6,69	
	65,90	6,49	
15	85,06	5,46	7,17
	91,02	8,58	
	92,69	7,46	
20	123,01	11,18	10,53
	125,88	11,68	
	110,66	8,73	
25	139,93	13,87	11,44
	125,07	10,08	
	169,79	10,37	

El límite de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) se estableció para 5  $\mu\text{g}$  y 20  $\mu\text{g}$ , siendo su relación señal-ruido media de 3,26 pA y 10,53 pA respectivamente; valores más cercanos a 3 y 10, que son los criterios de aceptación establecidos para estos parámetros.

#### e) Precisión

- Repetibilidad

Como se observa en la Tabla 4, los coeficientes de variación obtenidos para el tiempo de retención de la muestra y el MR para cada sistema fueron menores del 0,08 %, cumpliendo con el criterio de aceptación establecido para la técnica analítica ( $CV \leq 1\%$ ).

El coeficiente de variación obtenido para el porcentaje de área para el IFA fue de 0,02 % en el sistema LAHPLC01 y de 0,06 % en el sistema LAHPLC03; para el MR tuvo un valor de 0,10 % en el sistema LAHPLC01 y 0,00 % en el sistema LAHPLC03. Los resultados obtenidos en cada sistema fueron similares, demostrando de esta forma que el método posee una buena repetibilidad.

- Precisión intermedia

En el sistema cromatográfico LAHPLC01 la inyección es automática por lo que los analistas no tienen influencia en la reproducibilidad de los tiempos de retención, pero si la apreciación del analista en la identificación de los picos (sus detección y delimitación) la cual puede introducir alguna variación en el resultado del cálculo del por ciento de pureza por lo que es necesario estudiar y controlar la variación entre analistas en cuanto a la integración de los cromatogramas para reportar los resultados. Cada analista realizó la integración de todos

los cromatogramas del experimento de precisión y se calculó la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación (Tabla 5).

**Tabla 4. Coeficientes de variación obtenidos en el ensayo de repetibilidad**

Sistema LAHPLC01	1B.IFA.B24001-01		AgRBD-02-1021	
	Tr (min)	Área (%)	Tr (min)	Área (%)
ANALISTA 1	25,93	99,76	25,90	99,80
	25,95	99,62	25,92	99,77
	-	-	25,92	99,79
<b>Media</b>	<b>25,94</b>	<b>99,69</b>	<b>25,91</b>	<b>99,79</b>
<b>Stdv</b>	<b>0,01</b>	<b>0,10</b>	<b>0,01</b>	<b>0,02</b>
<b>CV (%)</b>	<b>0,05</b>	<b>0,10</b>	<b>0,05</b>	<b>0,02</b>
Sistema LAHPLC03	1B.IFA.B24001-01		AgRBD-02-1021	
	Tr (min)	Área (%)	Tr (min)	Área (%)
ANALISTA 1	25,85	100	25,80	99,57
	25,87	100	25,83	99,66
	-	-	25,80	99,74
<b>Media</b>	<b>25,86</b>	<b>100,00</b>	<b>25,82</b>	<b>99,62</b>
<b>Stdv</b>	<b>0,01</b>	<b>0,00</b>	<b>0,02</b>	<b>0,06</b>
<b>CV (%)</b>	<b>0,05</b>	<b>0,00</b>	<b>0,08</b>	<b>0,06</b>

**Tabla 5. Resultados obtenidos de la variabilidad entre analistas en el ensayo de precisión intermedia**

	AgRBD-02-1021 (Área %)		1B.IFA.B24001-01 (Área %)	
	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2
Ensayo 1	99,76	99,9	99,80	99,6
	99,62	99,9	99,77	99,5
	-	-	99,79	99,7
Ensayo 2	99,75	100	99,75	99,8
	99,94	100	99,63	99,7
	-	-	99,70	99,8
Ensayo 3	100,00	99,90	99,82	99,80
	100,00	99,90	99,76	99,80
	-	-	99,73	99,70
<b>Media</b>	<b>99,85</b>	<b>99,93</b>	<b>99,75</b>	<b>99,71</b>
<b>Stdv</b>	<b>0,16</b>	<b>0,05</b>	<b>0,06</b>	<b>0,11</b>
<b>CV (%)</b>	<b>0,16</b>	<b>0,05</b>	<b>0,06</b>	<b>0,11</b>
<b>COMPARACIÓN ENTRE ANALISTAS</b>				
<b>Media</b>	<b>99,89</b>		<b>99,73</b>	
<b>Stdv</b>	<b>0,12</b>		<b>0,08</b>	
<b>CV (%)</b>	<b>0,12</b>		<b>0,09</b>	

Los coeficientes de variación obtenidos en todas las evaluaciones cumplieron los criterios de aceptación establecidos ( $CV \leq 2\%$ ) para el porcentaje del área del pico principal tanto para el IFA como para el MR.

- Variabilidad entre sistemas

En la Tabla 6 se muestran los resultados obtenidos para la variabilidad entre los sistemas de HPLC (LAHPLC01 y LAHPLC03) por un mismo analista. La prueba de Fisher de homogeneidad de varianzas mostró que los sistemas tienen una precisión similar.

Los CV obtenidos en el sistema LAHPLC01 para el porcentaje del área del IFA y el MR de RBD fueron de 0,16 % y 0,06 % respectivamente; y en el sistema LAHPLC03 fueron de 0,12 % (IFA) y 0,06 % (MR), cumpliendo todos los ensayos con el criterio de aceptación establecido en el protocolo de validación de la técnica analítica ( $CV \leq 2\%$ )

Se realizó una prueba de Fisher para homogeneidad de varianzas, en la cual  $F \leq F_{crit}$  demostrando que no existen diferencias significativas entre los sistemas de HPLC.

**Tabla 6. Resultados obtenidos de la variabilidad entre sistemas**

	AgRBD-02-1021		1B.IFA.B24001-01	
	Sistema LAHPLC01	Sistema LAHPLC03	Sistema LAHPLC01	Sistema LAHPLC03
Ensayo 1	99,80	99,57	99,76	100
	99,77	99,66	99,62	100
	99,79	99,74	-	-
Ensayo 2	99,75	99,73	99,75	100
	99,63	99,73	99,94	100
	99,70	99,76	-	-
Ensayo 3	99,82	99,78	100,00	99,76
	99,76	99,73	100,00	99,76
	99,73	99,75	-	-
Media	99,75	99,72	99,85	99,92
Stdv	0,06	0,06	0,16	0,12
CV	0,06	0,06	0,16	0,12
<b>Comparación de varianzas (prueba Fisher)</b>				
<b>F</b>	2,79		1,67	
<b>Valor crítico de F</b>	3,79		6,39	

f) Ensayo de idoneidad del sistema

La Tabla 7 muestra los resultados de la prueba de idoneidad del sistema para las variables de tiempo de retención y porcentaje de área del pico principal. Los coeficientes de variación obtenidos para cada una de las variables evaluadas del MR estuvieron dentro del límite de aceptación establecido para este ensayo ( $CV \leq 0,62\%$ ). Se obtuvo un CV de 0,19 % para el Tr del MR. El promedio del área del pico principal de la solución de referencia representó 2,28 % del área del pico principal del IFA de RBD. Los valores promedio del porcentaje de área del IFA y el MR fueron 100 % y 99,77 % respectivamente, cumpliendo con el criterio de aceptación establecido (pureza  $\geq 95\%$ ). Los resultados obtenidos en esta prueba

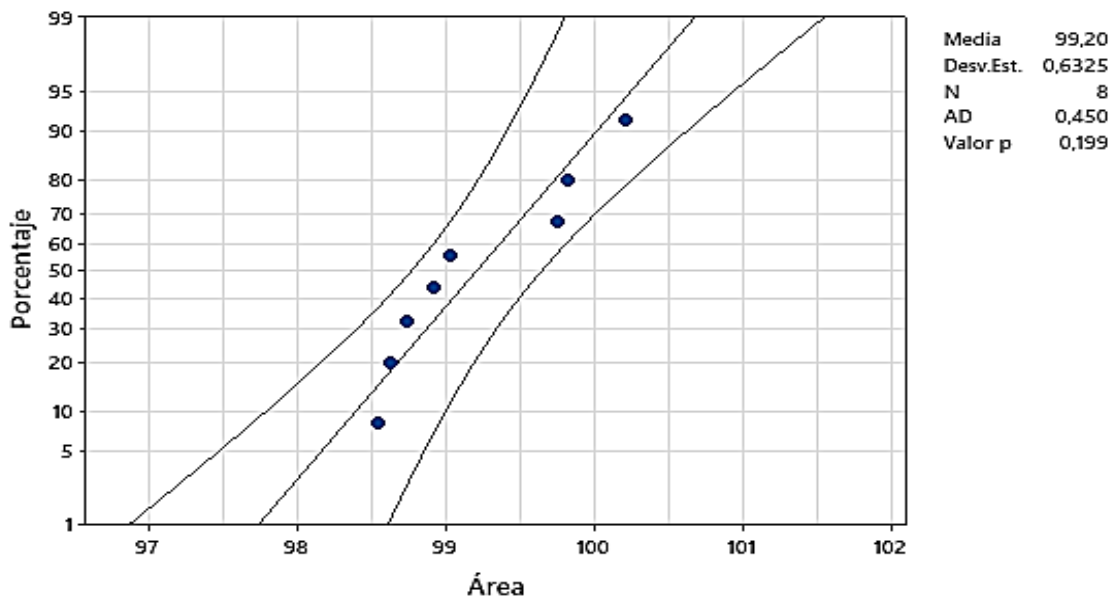
permiten afirmar que bajo las condiciones descritas es posible el análisis por HPLC-RP del IFA de RBD y la separación de sus especies con la evaluación de criterios y parámetros cromatográficos que garanticen la confiabilidad y el buen desempeño del ensayo analítico.

**Tabla 7. Resultados obtenidos en el ensayo de idoneidad del sistema.**

Sistema LAHPLC01	AgRBD-02-1021		1B.IFA.B24001-01			Solución de referencia			1,5-2,5 %
	Tr (min)	Área (%)	Tr (min)	Área (%)	Área	Tr (min)	Área (%)	Área	
Réplica 1	25,88	99,82	25,93	100,00	20811,79	25,92	100,00	475,91	2,28
Réplica 2	25,88	99,76	25,83	100,00	20950,49	25,92	100,00	477,37	
Réplica 3	25,80	99,73	-	-	-	-	-	-	
<b>MEDIA</b>	25,86	99,77	25,88	100,00	20881,14	25,92	100,00	476,64	-
<b>Stdv</b>	0,05	0,05	0,07	0,00	98,08	0,00	0,00	1,03	
<b>CV (%)</b>	0,19	0,05	0,27	0,00	0,47	0,00	0,00	0,22	

g) Robustez

En la Tabla 8 se muestran las combinaciones de experimentación realizadas y los resultados obtenidos. Se realizó un análisis de varianza para evaluar el efecto de los factores anteriormente mencionados y sus combinaciones sobre la pureza del IFA del RBD. En este caso ninguno de los efectos fue significativo, el valor de probabilidad  $p \geq 0,05$  (Figura 6) demostrando que no hay diferencias significativas para la determinación de la media del porcentaje del área de la especie principal.



**Figura 6. Gráfico de probabilidad del área para el IFA de RBD en el estudio de robustez.**

Nota: Las bandas laterales representan el intervalo de confianza de la media

**Tabla 8. Resultados obtenidos en el estudio de la robustez del método analítico**

	Réplicas	Conc. TFA Sln A	Conc. TFA Sln B	Tiempo	Área [%]
				Retención [min]	
Columna 1	1	0,09	0,04	25,72	99,71
	2			25,97	99,79
	1	0,09	0,06	25,93	99,82
	2			25,97	99,86
	1	0,11	0,04	26,20	99,81
	2			26,18	99,81
	1	0,11	0,06	26,20	99,85
	2			26,22	99,84
	Réplicas	Conc. TFA Sln A	Conc. TFA Sln B	TR	Área [%]
				[min]	
Columna 2	1	0,09	0,04	27,05	98,56
	2			27,17	98,62
	1	0,09	0,06	27,23	98,68
	2			27,23	98,56
	1	0,11	0,04	27,43	98,64
	2			27,47	98,60
	1	0,11	0,06	27,50	98,60
	2			27,50	98,61
<b>MEDIA</b>					<b>99,21</b>
<b>Stdv</b>					<b>0,62</b>
<b>CV (%)</b>					<b>0,63</b>

### CONCLUSIONES

El método de HPLC-RP permite evaluar la estabilidad del IFA, ya que es capaz de detectar modificaciones en la molécula de RBD, como son los productos de degradación debido al tratamiento térmico. Es preciso ya que es capaz de reproducir los resultados con una variación menor al 2 % en diferentes días, analistas y sistemas. Es robusto ya que ligeras modificaciones en las condiciones de corrida no afectan los resultados de las muestras analizadas. Según los resultados obtenidos y su comparación con los criterios de aceptación, se puede considerar que la validación de la técnica resultó satisfactoria.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo brindado por todos los analistas del Departamento de Control de la Calidad y directivos del Complejo Industrial Biotecnológico CIGB-Mariel, por su apoyo en la realización de este trabajo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMSbiopharma. (2025). *Normas de la ICH para la Validación de Métodos Analíticos: Principios, Requisitos y Aplicaciones en la Industria*. <https://amsbiopharma.com/es/directrices-ich-metodo-analitico/>
- Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos. (2012). *Buenas prácticas para laboratorios de control de medicamentos (Regulación 37-2012). Anexo No. 1 Validación de métodos analíticos*. [https://www.cecmecd.cu/sites/default/files/adjuntos/Reglamentacion/reg\\_37-2012\\_buenas\\_practicas\\_lab\\_opt.pdf](https://www.cecmecd.cu/sites/default/files/adjuntos/Reglamentacion/reg_37-2012_buenas_practicas_lab_opt.pdf)
- CIGB. (2021). *Abdala*. <https://www.cigb.edu.cu/wp-content/uploads/2021/04/Ficha-Abdala-Espanol.pdf>
- Dong, M. W., Huynh-Ba, K., & Wong, A. W. (2020). Validation of Stability-Indicating HPLC Methods for Pharmaceuticals: Overview, Methodologies, and Case Studies. *LCGC North America*, 38(11), 606-618. <https://www.chromatographyonline.com/view/validation-of-stability-indicating-hplc-methods-for-pharmaceuticals-overview-methodologies-and-case-studies>
- European Pharmacopoeia Commission. (2021). General chapter 2.2.46. Chromatographic separation techniques. *European Pharmacopoeia*, 11th. <https://www.pharmacopoeia.com/content/html/240>
- Hernández, F., Noa, E., Quintana, J., Chávez, C. O., Martín, Y., Alvaré, L., . . . Muzio, V. L. (2024). Efficacy and safety of Abdala COVID-19 subunit vaccine in children and adolescents: An open-label, single-arm, phase 2 trial (MEÑIQUE). *Vaccine*, 42(22), 126223. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2024.126223>
- ICH. (2025). *Q2(R2). Validación de métodos analíticos*. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q2r2-guideline-validation-analytical-procedures-step-5-revision-1\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q2r2-guideline-validation-analytical-procedures-step-5-revision-1_en.pdf)
- Latimer, G. W. (2023). Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. En *Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals* (22nd ed., págs. AK1-AK32). AOAC Publications. <https://doi.org/10.1093/9780197610145.005.011>
- Lister, A. S. (2005). Validation of HPLC methods in pharmaceutical analysis. En S. Ahuja, & M. Dong, *Separation Science and Technology - Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC* (Vol. 6, págs. 191-217). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/s0149-6395\(05\)80051-0](https://doi.org/10.1016/s0149-6395(05)80051-0)
- Más-Bermejo, P. I., Dickinson, F. O., Almenares, K., Sánchez-, L., Guinovart, R., Vidal-Ledo, M., . . . Ayala-Ávila, M. (2022). Cuban Abdala vaccine: Effectiveness in preventing severe disease and death from COVID-19 in Havana, Cuba; A cohort study. *Lancet regional health. Americas*, 16, 100366. <https://doi.org/10.1016/j.lana.2022.100366>
- Pabale, N., Khatke, M., Shelke, M., Bhagat, V., & Kamble, T. A. (2024). Review on HPLC Method Development and Validation. *International Journal of Pharmaceutical Science*, 2(11), 1496-1509. <https://doi.org/10.5281/zenodo.14234238>
- Thompson, M., Ellison, S. L., & Wood, R. (2002). Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 74(5), 835-855. <https://doi.org/10.1351/pac200274050835>