

Validación del Lowry modificado para cuantificar el contenido de proteínas de una vacuna antialérgica

Validation of the modified Lowry to quantify the protein content of an allergy vaccine

Yarelis Martínez Mieres¹ <https://orcid.org/0000-0003-0489-3363>

Maytee Mateo Morejón^{1*} <https://orcid.org/0000-0003-2606-3416>

Wendy Ramírez González¹ <https://orcid.org/0000-0001-6349-1116>

Anette García Freijó¹ <https://orcid.org/0000-0002-1813-7318>

Yenisleidy Revilla Fernández¹ <https://orcid.org/0000-0002-6935-6983>

Alexis Labrada Rosado¹ <https://orcid.org/0000-0003-0956-7946>

¹ Centro Nacional de Biopreparados. Mayabeque, Cuba.

*Autor para la correspondencia: mayteemm@biocen.cu

RESUMEN

Introducción: Prolinem BT es un candidato vacunal de segunda generación que emplea como ingrediente activo alérgenos purificados a partir del extracto del ácaro *Blomia tropicalis*, los cuales constituyen los alérgenos mayores de esa especie.

Objetivo: Validación del Lowry modificado a microplacas como técnica para cuantificar el contenido de proteínas totales del ingrediente activo de la vacuna PROLINEM-BT.

Métodos: Para la cuantificación de esas proteínas purificadas se desarrolló y validó la técnica de Lowry modificado a microplacas. Los parámetros estudiados en la validación fueron especificidad, linealidad y paralelismo, precisión y exactitud.

Resultados: El método fue específico en la cuantificación de proteínas totales. El rango de la curva de 20 a 100 µg/mL tuvo un comportamiento lineal

($r = 0.99$). La técnica es precisa basado en los coeficientes de variación obtenidos (todos inferiores al 5 %) y exacta dado que todos los valores presentaron el 100 % de recobrado.

Conclusiones: Se demostró que el método de Lowry modificado a microplacas es válido para la cuantificación de proteínas totales del ingrediente activo de Prolinem BT.

Palabras clave: validación; proteínas totales; productos alergénicos; ingrediente activo.

ABSTRACT

Introduction: Prolinem BT is a second-generation vaccine candidate that uses as active ingredient allergens purified from *Blomia tropicalis* mite extract, which constitute the major allergens of that species.

Objective: Validation of the microplate modified Lowry as a technique to quantify the total protein content of the active ingredient of the PROLINEM-BT vaccine.

Methods: For the quantification of these purified proteins, the microplate modified Lowry technique was developed and validated. The parameters studied in the validation were specificity, linearity and parallelism, precision and accuracy.

Results: The method was specific in the quantification of total proteins. The curve ranges from 20 to 100 $\mu\text{g/mL}$ and had a linear behavior ($r = 0.99$). The technique is precise based on the coefficients of variation obtained (all less than 5 %) and accurate since all values presented 100 % recovery.

Conclusions: It was demonstrated that the Lowry method modified to microplates is valid for the quantification of total proteins of the active ingredient of Prolinem BT.

Keywords: validation; total proteins; allergenic products; active ingredient.

Recibido: 20/02/2022

Aceptado: 03/12/2022

Introducción

Los ácaros del polvo doméstico constituyen el principal agente etiológico del asma alérgica en ambientes tropicales. *Dermatophagoides pteronissinus* y *D. farinae* constituyen las especies mejor caracterizadas por su impacto a nivel mundial.^(1,2) Sin embargo, se ha reportado que la especie *Blomia tropicalis* es la responsable del mayor índice de sensibilización alérgica en regiones tropicales.⁽³⁾

En el Centro Nacional de Biopreparados (BioCen) se desarrollan vacunas de ácaros para la inmunoterapia del asma alérgica en Cuba. VALERGEN BT® constituye la única vacuna obtenida a partir de alérgenos del ácaro *B. tropicalis* que ha logrado registro sanitario a nivel mundial.⁽⁴⁾ Rerecientemente ha surgido un proyecto que se enfocó en la obtención de vacunas terapéuticas antialérgicas de segunda generación, con mayor seguridad y eficacia en comparación con la estrategia de vacunación convencional.⁽⁵⁾ En su formulación cuenta con el proteoliposoma (PL) de *Neisseria meningitidis* como adyuvante inmunomodulador y el gel de hidróxido de aluminio (GHA), como adyuvante de depósito. Esta combinación se empleó en vacunas clínicamente aprobadas, entre otras razones, por su elevado perfil de seguridad.^(6,7,8) A diferencia de la vacuna VALERGEN BT el Ingrediente Farmacéutico Activo (IFA) de este candidato consiste en alérgenos purificados a partir del extracto del ácaro *B. tropicalis*.⁽⁹⁾ Estos alérgenos son proteínas de bajo peso molecular: Blo t 2 (14 kD), Blo t 5 (14 kD) y Blo t 13 (15 kD) y constituyen los alérgenos mayores de esta especie. Esta tecnología se ha empleado previamente con el candidato vacunal Prolinem DS.⁽¹⁰⁾

Se obtuvieron a escala piloto y en condiciones de buenas prácticas de fabricación 3 lotes consecutivos de Prolinem BT. En vistas al control de la calidad de productos alérgicos, la Farmacopea Europea y el Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (CECMED) exigen una serie de pruebas bioquímicas para caracterizar el producto en los niveles de ingrediente activo y de producto terminado. La determinación del contenido de proteínas totales es una de ellas.^(11;12)

A pesar de que existen diversos métodos para la cuantificación de proteínas, el método de Lowry fue uno de los primeros que se reportan en la literatura. El principio de reacción de este método se basa en la reducción del Cu^{2+} a Cu^{1+} en presencia de proteínas en medio alcalino, aquí el reactivo de Folin-Ciocalteu incrementa la formación de color.⁽¹³⁾

El método de Lowry es la técnica que se emplea para cuantificar las proteínas purificadas a partir del extracto alergénico de *B. tropicalis*. Específicamente se emplea la técnica de Lowry modificado a microplacas por la ventaja de emplear una menor cantidad de muestra al ensayo en comparación con el método de Lowry convencional que emplea cubetas de cuarzo.⁽¹⁴⁾

Las normas de buenas prácticas de fabricación de productos farmacéuticos plantean que cada paso del proceso debe estar detalladamente descrito y validado.⁽¹⁵⁾

En este trabajo la validación incluye los parámetros de especificidad, precisión intermedia, repetibilidad, exactitud, linealidad y paralelismo. Así pues, el objetivo de este trabajo es la validación del Lowry modificado a microplacas como técnica para cuantificar el contenido de proteínas totales del ingrediente activo de la vacuna PROLINEM-BT.

Métodos

La curva de calibración del ensayo se realizó con Albúmina de Suero Bovino (BSA), que constituye un material de referencia secundario procedente del Instituto Finlay y se encuentra calibrado por el Instituto Nacional de Patrones en un rango de concentraciones comprendidos entre 200-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Los ingredientes activos obtenidos a escala piloto se denominaron BT18IFA001, BT18IFA002 y BT18IFA003, respectivamente. Se formularon a una concentración de 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$, valor correspondiente a la región media de la curva de calibración. Los IFA se concentraron dos veces y además se diluyeron las muestras una parte de muestra y una de diluyente.^(1,2) De esta manera se obtuvieron muestras de cada

IFA a 140 y 35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ valores que coincidieron con las regiones altas y bajas de la curva de calibración.

El material de referencia Prot T del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) se empleó como control positivo del ensayo a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Soluciones

Solución carbonato: Se pesó un gramo de Carbonato de Sodio y se disolvió en 50 mL de Hidróxido de Sodio 1N, 500 μL de Tartrato de Sodio y Potasio 2% y 500 μL de Sulfato de cobre 1%.

Solución reveladora: Reactivo de Folin-Ciocalteu disuelto 1:2.

Procedimiento del Lowry modificado a microplacas

Se aplicaron 100 μL de la curva de calibración, las muestras y el control positivo Prot T por triplicado en la placa de 96 pocillos (Nunc Maxisorp, Dinamarca). Posteriormente, se añadieron 200 μL de la solución carbonato y se dejó reposar la placa durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después se añadieron 20 μL de la Solución reveladora y se mantuvo durante 30 min a temperatura ambiente en total oscuridad. Finalmente se realizó la lectura de la Absorbancia en un espectrofotómetro (Thermo Fisher Multiskan, China) a 620 nm. Los valores de Absorbancia de los IFA obtenidos se interpolaron en la curva de calibración y se calcularon las concentraciones de proteínas totales.

Parámetros de Validación

Especificidad

La especificidad del método de Lowry se determinó para descartar la posible interferencia entre la solución salina a 0,9 % que se empleó como excipiente en la formulación de la vacuna y el IFA. Se realizó un ensayo donde se aplicaron las muestras de BT18IFA001 concentrada a 140 $\mu\text{g}/\text{mL}$, se adicionaron concentraciones crecientes de 0; 9; 18 y 36 mg/mL, respectivamente de NaCl. Se estableció como criterio de aceptación que no existieran diferencias

entre los valores de concentración para cada muestra mediante la prueba t de Student con una $p > 0,5$.

Linealidad y paralelismo

La linealidad y paralelismo se determinaron mediante 3 ensayos de Lowry. Se construyeron dos curvas de manera concomitante: una con la BSA y la otra con el IFA BT18IFA001. Se aplicaron 6 diluciones del IFA y del material de referencia en un rango de concentraciones entre 200 y 40 $\mu\text{g/mL}$. Con los valores de Absorbancia obtenidos se confeccionaron curvas descritas por una función lineal mediante el método de los mínimos cuadrados y con la ecuación:

$$y = b x + a$$

Donde b: pendiente de la recta y a: intercepto con el eje y.

Se realizó el análisis estadístico mediante una regresión lineal. Se evaluó la significación estadística de la pendiente: $b > 0$ ($p < 0,05$) el coeficiente de correlación (r) superior a 0.99. Además. Se comprobó que no existieran diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las pendientes de las curvas de calibración y la realizada con el lote BT18IFA001.

Precisión: incluye repetibilidad, precisión intermedia y exactitud.

Repetibilidad

La repetibilidad del método se determinó mediante un ensayo de Lowry realizado por un solo analista. Se emplearon los tres lotes obtenidos del ingrediente activo: BT18IFA001, BT18IFA002 y BT18IFA003. Cada lote se empleó en el ensayo a concentraciones de 140; 70 y 35 $\mu\text{g/mL}$, valores correspondientes a las regiones alta, media y baja de la curva de calibración. Se calcularon los valores de concentración y los coeficientes de variación (CV) y la desviación estándar entre las tres réplicas de cada una de las muestras. Como criterio de aceptación se tuvo en cuenta que los valores de CV fueran inferiores al 5 %.

Precisión intermedia

Los ensayos de precisión intermedia se llevaron a cabo por dos analistas en tres días diferentes. Para ello se empleó el ingrediente activo BT18IFA001 a concentraciones de 140; 70 y 35 $\mu\text{g/mL}$ (alta, media y baja). Se calculó la desviación

estándar y el CV de cada réplica. Además, se calculó el CV entre las diluciones alta, media y baja entre los dos analistas. Se compararon los resultados entre analistas por medio de una prueba de Fisher para una $p = 0,05$. Como criterios de aceptación se establecieron los valores de los CV inferiores al 5 % y que los valores de concentración obtenidos para cada analista no presenten diferencias significativas

Exactitud

La exactitud del método se determinó mediante un ensayo de Lowry. Se empleó el ingrediente activo BT18IFA001 a concentraciones de 140; 70 y 35 $\mu\text{g/mL}$ alta, media y baja. Las concentraciones obtenidas en cada caso se compararon con un valor de referencia, que se seleccionó a partir del ensayo de Precisión intermedia. Se determinó el porcentaje de recuperación según la ecuación:

$$\left(\frac{\text{Concentración calculada}}{\text{Concentración esperada}}\right) * 100\%$$

Se determinaron las diferencias entre el porcentaje de recuperación (valor obtenido) y el 100% (valor esperado) mediante la prueba t de *Student* con una $p = 0,05$.

Resultados

Se demostró que el método es específico, ya que no existen diferencias significativas (prueba t de *Student*, $p > 0,5$) en los valores de concentración entre las muestras de BTIFA001 y las muestras con concentraciones crecientes de NaCl (fig. 1).

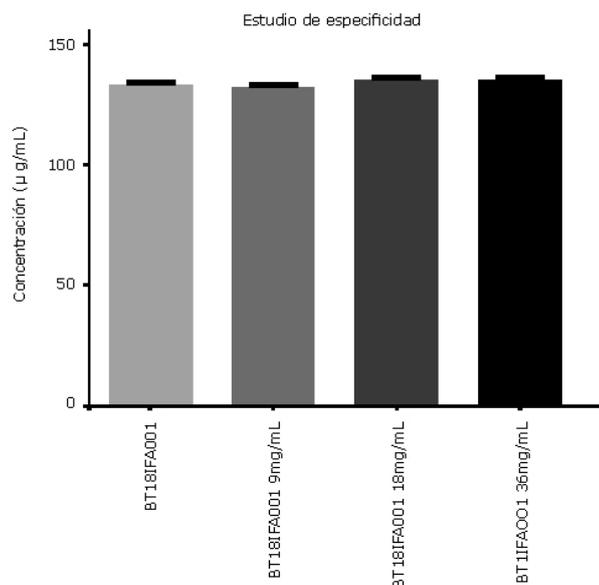


Fig. 1- Estudio de especificidad con muestras construidas a concentraciones crecientes de NaCl.

En todos los ensayos se evidenció la linealidad y el coeficiente de correlación fue mayor que 0,99. La regresión lineal mostró que los valores de las pendientes obtenidas en cada uno de los 3 ensayos resultaron mayores que 0 ($p < 0,05$). Las curvas de BSA y del IFA BT18IFA001 son paralelas, ya que no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre las pendientes ($p > 0,05$) (fig. 2). Así, quedó demostrado que la técnica cumple con los parámetros de linealidad y paralelismo.

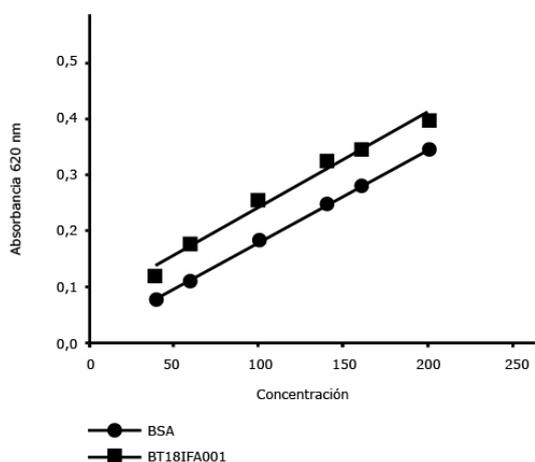


Fig. 2- Comportamiento lineal y paralelo del patrón BSA y del ingrediente activo BT18IFA001.

Las réplicas de todas las muestras que se emplearon en el estudio de repetibilidad cumplieron con el criterio de aceptación para este parámetro con un CV menor que el 5 % (tabla 1).

Tabla 1- Estudio de repetibilidad

Extracto alergénico	Diluciones	Concentración de réplicas (µg/mL)			Concentración promedio (µg/mL)	SD	CV %
		1	2	3			
BT18IFA001	alta	113,490	116,900	109,770	113,387	3,566	3,145
	media	67,350	66,110	67,970	67,143	0,947	1,411
	baja	41,650	40,410	40,720	40,927	0,645	1,577
BT18IFA002	alta	111,630	113,800	108,530	111,320	2,649	2,379
	media	66,730	68,590	65,180	66,833	1,707	2,555
	baja	41,650	41,340	41,960	41,650	0,310	0,744
BT18IFA003	alta	119,370	118,440	118,750	118,853	0,474	0,398
	media	70,750	69,520	70,750	70,340	0,710	1,010
	baja	42,580	43,500	41,960	42,680	0,775	1,815

En el estudio de precisión intermedia los CV de las concentraciones obtenidas fueron menores que el 5 %. Los valores de CV para las concentraciones alta, media y baja obtenidas por cada analista no presentan diferencias significativas entre sí (prueba de Fisher $p \geq 0,05$) (tabla 2 y tabla 2.1).

Tabla 2 - Estudio de Precisión intermedia

Analista	Concentración	Día 1	Día 2	Día 3	Conc. prom. c/analista (µg/mL)	SD	CV %
1	alta	114,063	120,517	117,790	117,457	3,240	2,758
	media	68,047	73,430	68,990	70,156	2,871	4,092
	baja	42,313	44,887	40,863	42,688	2,038	4,773
2	alta	117,090	119,490	124,443	120,341	3,750	3,116
	media	71,167	70,543	75,660	72,457	2,792	3,853
	baja	42,995	43,000	45,050	43,682	1,182	2,706

Tabla 2.1 - Estudio de Precisión intermedia

Internalista	Prom (µg/mL)	CV total %	P. Fisher
Concentración alta	118,899	1,715	0,855
Concentración media	71,305	2,284	0,971
Concentración baja	43,184	1,626	0,505

Los porcentajes de recuperación en el ensayo de exactitud para cada una de las muestras analizadas fueron del 100 %. No hubo diferencias significativas entre el porcentaje de recobrado de las muestras y el 100 % (prueba t de Student, $p > 0.05$) (tabla 3).

Tabla 3 - Estudio de exactitud

Muestra	Concentración	Concentración Calculada (µg/mL)	Concentración Esperada (µg/mL)	R %	t. Student
BT18IFA001	Alta	118,297	118,899	0,995	0,325
	Media	71,187	71,305	0,998	0,424
	Baja	43,254	43,184	1,002	0,459

Discusión

Los productos alergénicos son preparaciones cuyo componente activo proviene de una fuente natural. Por la variabilidad intrínseca de las materias primas alergénicas se ha establecido un sistema de estandarización que garantice la consistencia del producto en cada lote.⁽¹⁶⁾ La estandarización de vacunas de alérgenos es un proceso complejo internacionalmente por la coexistencia de diferentes enfoques prevalecientes en Europa y Estados Unidos.⁽¹⁷⁾ En Cuba contamos con una regulación específica que define los requisitos de registro de los productos alergénicos, la cual establece criterios similares con la Guía Europea.^(12,18) Las normas de buenas prácticas de fabricación y control de la calidad de productos alergénicos exigen que todo el proceso sea descrito y validado en los niveles de ingrediente activo y de producto terminado.⁽¹⁹⁾ Los parámetros

evaluados en esta validación estuvieron en concordancia no solo con los exigidos por el CECMED, sino también con los recomendados por agencias internacionales como la EMA (*European Medicines Agency*).⁽²⁰⁾

La Monografía de la Farmacopea Europea para productos alergénicos ha establecido una serie de pruebas bioquímicas e inmunológicas en vista al control de la calidad de los productos alergénicos. Dentro de estas pruebas se encuentra el ensayo del contenido de proteínas totales.⁽¹¹⁾ En este sentido se evaluó y validó la técnica de Lowry modificado a microplacas para la cuantificación del contenido de proteínas totales del IFA de Prolinem BT. La precisión del método se encuentra dentro de la tolerancia exigida para los ensayos de proteínas según la farmacopea europea, en este caso entre el 80-120 % del contenido de proteínas, que equivale a 64 - 96 µg/mL, según los límites de especificación de calidad.

Los CV obtenidos en la validación se corresponden con los descritos en la literatura y lo reportado por otros grupos de investigación que han validado la técnica.⁽²¹⁾ Los valores están muy por debajo del 5 % que es el límite superior establecido por el CECMED. Los IFA, de manera general, suelen brindar un CV más reducido que productos terminados en ensayos fisicoquímicos por la influencia de la concentración del analito.⁽¹⁴⁾

Los resultados de esta validación se considerarán válidos siempre y cuando la técnica se realice como está establecido, necesitándose una revalidación si existieran cambios reales o posibles en su ejecución, realizándose una validación parcial si son cambios menores en el método o una revalidación exhaustiva (revalidación de todos los parámetros aplicables), cuando sean cambios mayores o resultados fuera de especificación imputables al método analítico.

Esta validación demostró que los resultados obtenidos con el método de Lowry en microplacas, para la cuantificación de proteínas totales, son confiables y reproducibles, lo cual es importante para el control de calidad del IFA de la vacuna antialérgica experimental PROLINEM-BT.

Referencias Bibliográficas

1. Pascal D, Matucci A, Rossi O, Vidal C. The disease burden in patients with respiratory allergies induced by house dust mites: a year-long observational survey in three European countries. *Clin. Transl. Allergy*. 2020;10(27):1-12. DOI: [10.1186/s13601-020-00331-0](https://doi.org/10.1186/s13601-020-00331-0)
2. Miller JD. The Role of Dust Mites in Allergy. *Clinic Rev Allerg Immunol*. 2019;57:312-29. DOI: [10.1007/s12016-018-8693-0](https://doi.org/10.1007/s12016-018-8693-0)
3. Santos E, Asam C, Lackner P, Hofer H, Wallner M, Silva Pinheiro C, *et al*. Allergens of *Blomia tropicalis*: An Overview of Recombinant Molecules. *Int Arch Allergy Immunol*. 2017;172(4):203-14. DOI: [10.1159/000464325](https://doi.org/10.1159/000464325)
4. Labrada A. Desarrollo a ciclo completo de las primeras vacunas estandarizadas de alérgenos de ácaros para la inmunoterapia del asma en Cuba. La Habana: Editorial Universitaria; 2012. DOI: [10.13140/RG.2.2.31180.26249](https://doi.org/10.13140/RG.2.2.31180.26249)
5. Di Felice G, Colombo P. Nanoparticle–allergen complexes for allergen immunotherapy. *Int J Nanomedicine*. 2017;12:4493-4504. DOI: [10.2147/IJN.S134630](https://doi.org/10.2147/IJN.S134630)
6. Chang A, Ochoa R, Climent Y, Macías C, Rodríguez L, Valenzuela C, *et al*. A single dose of SARS-CoV-2 FINLAY-FR-1A vaccine enhances neutralization response in COVID-19 convalescents, with a very good safety profile: An open-label phase 1 clinical trial. *The Lancet Regional Health - Americas*. 2021;4:100079-090. DOI: [10.1016/j.lana.2021.100079](https://doi.org/10.1016/j.lana.2021.100079)
7. Ramírez W, Bourg V, Torralba D, Facenda E, Tamargo B, González B, *et al*. Safety of a proteoliposome from *Neisseria meningitidis* as adjuvant for a house dust mite allergy vaccine. *J Immunotoxicol*. 2017;14(1):152-59. DOI: [10.1080/1547691X.2017.1346007](https://doi.org/10.1080/1547691X.2017.1346007)
8. Jensen E, Roth F, Jordakieva G, Pali I. Allergens and adjuvants in Allergen Immunotherapy for immune activation, tolerance and resilience. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2021;9(5):1780-89. DOI: [10.1016/j.jaip.2020.12.008](https://doi.org/10.1016/j.jaip.2020.12.008)
9. Mateo M, Ramírez W, Torralba D, Revilla Y, Cruz R, Espinosa BL, García A, *et al*. LIBRO DE RESÚMENES, Prolinem-BT, vacuna de segunda generación para la alergia a *Blomia tropicalis*. *Revista VacciMonitor*. 2022 [acceso 18/04/2022];61. Disponible

en:

<https://vaccimonitor.finlay.edu.cu/index.php/vaccimonitor/article/view/313/512>

10. Samalea R, Torralba D, Martínez D, Ramírez W, Mateo M, Oliva Y, *et al.* Desarrollo de la formulación, escalado y estabilidad de la vacuna antialérgica de *Dermatophagoides siboney* adyuvada con gel de hidróxido de aluminio. Revista CENIC Ciencias Biológicas. 2019 [acceso 18/04/2022];49(2):1-14. Disponible en: <https://revista.cnic.edu.cu/index.php/RevBiol/article/view/186>

11. European Pharmacopoeia. Monograph on allergen products. 2017 [acceso 18/04/2022]:1063. Disponible en: https://file.wuxuwang.com/yaopinbz/EP9/EP9.0_01__351.pdf

12. CECMED. Requisitos para las solicitudes de inscripción en el registro de medicamentos de uso humano de productos alergénicos. CECMED: La Habana, 2002 [acceso 19/01/2022]. Disponible en: https://www.cecmecmed.cu/sites/default/files/adjuntos/Reglamentacion/Reg_30-02.pdf.

13. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal Biol Chem.* 1951;193:265-75. PMID: [14907713](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14907713/)

14. Fryer HJ, Davis GE, Manthrope M, Varon S. Lowry protein assay using a automatic microtiter plate spectrophotometer. *Anal Biochem.* 1986;153(2):262-6. DOI: [10.1016/0003-2697\(86\)90090-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90090-4)

15. Resolución No. 40 del 2014. Anexo No.1 de las Buenas Prácticas para Laboratorios de Control de Medicamentos. Validación de Métodos Analíticos. CECMED; 2014 [acceso 28/12/2021]:1-30. Disponible en: <https://www.cecmecmed.cu/reglamentacion/aprobadas/resolucion-cecmecmed-40>

16. Zimmer J, Bonertz A, Vieths S. Quality requirements for allergen extracts and allergoids for allergen immunotherapy. *Allergol Immunopathol.* 2017;45(S1):4-11. DOI: [10.1016/j.aller.2017.09.002](https://doi.org/10.1016/j.aller.2017.09.002)

17. Bonertz RG, Hoefnagel M, Timon M, Slater J, Rabin R. Challenges in the implementation of EAACI guidelines on allergen immunotherapy: A global perspective on the regulation of allergen products. *Allergy.* 2018;73:64-76. DOI: [10.1111/all.13266](https://doi.org/10.1111/all.13266)

18. Lehnigk U. Allergen immunotherapy in the European regulatory environment. Medical Writing. 2018 [acceso 28/12/2021];27(1):30-4 ISSN 2047-4814. Disponible en: https://journal.emwa.org/vaccines-and-immunotherapies/allergen-immunotherapy-in-the-european-regulatory-environment/article/3583/lehnigk_-allergen-immunotherapy-in-the-european-regulatory-environment.pdf.
19. International scientific guideline: Guideline on allergen products: Production and quality issues. EMEA/CHMP/BWP. Adopted by the Therapeutic Goods Administration (TGA). 2007 [acceso 28/12/2021]. Disponible en: <https://www.tga.gov.au/resources/resource/international-scientific-guidelines/international-scientific-guideline-guideline-allergen-products-production-and-quality-issues>
20. ICH guideline Q2(R2) Validation of analytical procedures. A Notice by the Food and Drug Administration. 2022 [acceso 28/12/2021]. Disponible en: <https://www.federalregister.gov/documents/2022/08/29/2022-18516/q2r2-validation-of-analytical-procedures-and-q14-analytical-procedure-development-international>.
21. Yglesias A, Viera A, Suárez Y, Torres JR, Ochoa R. Validation of Modified Lowry for the Determination of Total Protein Concentration of *Rhopalurus junceus* Scorpion Venom. Biomed J Sci & Tech Res. 2020;28(3):21627-32. DOI: <https://doi.org/10.26717/BJSTR.2020.28.004655>

Conflicto de intereses

No existe conflicto de intereses entre los autores ni con la institución.

Contribuciones de los autores

Conceptualización: Maytee Mateo.

Curación de datos: Yarelis Martínez

Recolección y procesamiento de los datos: Yarelis Martínez, Wendy Ramírez, Maytee Mateo.

Análisis formal: Yarelis Martínez, Wendy Ramírez, Alexis Labrada.

Investigación: Yarelis Martínez, Anette García, Yenisleidy Revilla.

Validación: Yarelis Martínez, Anette García, Yenisleidy Revilla.

Redacción del borrador original: Yarelis Martínez.

Software: Yarelis Martínez.

Revisión y edición de escritura: Wendy Ramírez, Alexis Labrada.

Metodología: Maytee Mateo.

Visualización: Maytee Mateo.

Adquisición de fondos: Alexis Labrada.

Administración de proyectos: Alexis Labrada.

Recursos: Alexis Labrada.

Financiación

El estudio fue financiado por el Centro Nacional de Biopreparados.