

FARMACOPÉIA BRASILEIRA

6ª EDIÇÃO



Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Farmacopeia
Brasileira,
6ª edição

Volume II – Monografias

Produtos Biológicos

Brasília
2019

PRODUTOS BIOLÓGICOS

DALTEPARINA SÓDICA	PB001-00
ENOXAPARINA SÓDICA	PB002-00
HEPARINA CÁLCICA	PB003-00
HEPARINA CÁLCICA SOLUÇÃO INJETÁVEL	PB004-00
HEPARINA DE BAIXO PESO MOLECULAR	PB005-00
HEPARINA DE BAIXO PESO MOLECULAR SOLUÇÃO INJETÁVEL	PB006-00
HEPARINA SÓDICA BOVINA	PB007-00
HEPARINA SÓDICA SUÍNA	PB008-00
HEPARINA SÓDICA SOLUÇÃO INJETÁVEL	PB009-00
INSULINA	PB010-00
INSULINA HUMANA	PB011-00
INSULINA HUMANA INJETÁVEL	PB012-00
INSULINA HUMANA ISOFANA SUSPENSÃO	PB013-00
INSULINA HUMANA ISOFANA SUSPENSÃO E INSULINA HUMANA INJETÁVEL	PB014-00
INSULINA HUMANA ZINCO SUSPENSÃO	PB015-00
INSULINA HUMANA ZINCO SUSPENSÃO ESTENDIDA	PB016-00
INSULINA INJETÁVEL	PB017-00
INSULINA LISPRO	PB018-00
NADROPARINA CÁLCICA	PB019-00
SORO ANTIBOTRÓPICO (PENTAVALENTE)	PB020-00
SORO ANTIBOTRÓPICO (PENTAVALENTE) E ANTILAQUÉTICO	PB021-00
SORO ANTIBOTRÓPICO (PENTAVALENTE) E ANTICROTÁLICO	PB022-00
SORO ANTIBOTRÓPICO (PENTAVALENTE), ANTICROTÁLICO E ANTILAQUÉTICO	PB023-00
SORO ANTIBOTULÍNICO (TRIVALENTE)	PB024-00
SORO ANTICROTÁLICO	PB025-00
SORO ANTIDIFTÉRICO	PB026-00
SORO ANTIELAPÍDICO (BIVALENTE)	PB027-00
SORO ANTIESCORPIÔNICO	PB028-00
SORO ANTILONÔMICO	PB029-00
SORO ANTILOXOSCÉLICO (TRIVALENTE)	PB030-00
SORO ANTIRRÁBICO	PB031-00
SORO ANTITETÂNICO	PB032-00
SORO REAGENTE DE TIPAGEM SANGUÍNEA ANTI-A PARA USO HUMANO	PB033-00
SORO REAGENTE DE TIPAGEM SANGUÍNEA ANTI-A,B PARA USO HUMANO	PB034-00
SORO REAGENTE DE TIPAGEM SANGUÍNEA ANTI-B PARA USO HUMANO	PB035-00
SORO REAGENTE DE TIPAGEM SANGUÍNEA ANTI-RH (ANTI-D, ANTI-C, ANTI-E, ANTI-C, ANTI-E E ANTI-CW) PARA USO HUMANO	PB036-00
SOROS HIPERIMUNES PARA USO HUMANO	PB037-00
TINZAPARINA SÓDICA	PB038-00
TOXOIDE TETÂNICO ADSORVIDO	PB039-00
VACINA ADSORVIDA DIFTERIA E TÉTANO ADULTO	PB040-00

VACINA ADSORVIDA DIFTERIA E TÉTANO INFANTIL	PB041-00
VACINA ADSORVIDA DIFTERIA, TÉTANO E PERTUSSIS	PB042-00
VACINA ADSORVIDA DIFTERIA, TÉTANO, PERTUSSIS E HAEMOPHILUS INFLUENZAE B (CONJUGADA)	PB043-00
VACINA ADSORVIDA DIFTERIA, TÉTANO, PERTUSSIS, HEPATITE B (RECOMBINANTE) E HAEMOPHILUS INFLUENZAE B (CONJUGADA)	PB044-00
VACINA ADSORVIDA DIFTERIA, TÉTANO, PERTUSSIS, POLIOMIELITE 1, 2 E 3 (INATIVADA) E HAEMOPHILUS INFLUENZAE B (CONJUGADA)	PB045-00
VACINA BCG	PB046-00
VACINA CAXUMBA (ATENUADA)	PB047-00
VACINA FEBRE AMARELA (ATENUADA)	PB048-00
VACINA HAEMOPHILUS INFLUENZAE B (CONJUGADA)	PB049-00
VACINA HEPATITE B (RECOMBINANTE)	PB050-00
VACINA INFLUENZA (ANTÍGENO DE SUPERFÍCIE, INATIVADA)	PB051-00
VACINA INFLUENZA (FRAGMENTADA, INATIVADA)	PB052-00
VACINA MENINGOCÓCICA ACWY (POLISSACARÍDICA)	PB053-00
VACINA MENINGOCÓCICA C (CONJUGADA)	PB054-00
VACINA POLIOMIELITE 1, 2 E 3 (ATENUADA)	PB055-00
VACINA POLIOMIELITE 1, 2 E 3 (INATIVADA)	PB056-00
VACINA RAIVA (INATIVADA)	PB057-00
VACINA ROTAVÍRUS HUMANO (ATENUADA)	PB058-00
VACINA RUBÉOLA (ATENUADA)	PB059-00
VACINA SARAMPO (ATENUADA)	PB060-00
VACINA SARAMPO, CAXUMBA, RUBÉOLA	PB061-00
VACINA SARAMPO, CAXUMBA, RUBÉOLA E VARICELA (ATENUADA)	PB062-00
VACINA SARAMPO, RUBÉOLA	PB063-00
VACINA VARICELA (ATENUADA)	PB064-00
VACINAS PARA USO HUMANO	PB065-00

VACINA HAEMOPHILUS INFLUENZAE B (CONJUGADA)**Vaccinum haemophili stirpe b conjugatum**

A vacina *Haemophilus influenzae* b (conjugada) é uma preparação líquida ou liofilizada de polissacarídeo capsular, obtido a partir de uma cepa de *Haemophilus influenzae* tipo b, covalentemente ligado a uma proteína carreadora.

O polissacarídeo de ribosil-ribitol-5-fosfato (PRP) é um polímero composto de unidades alternadas de ribose e ribitol, covalentemente agrupadas por um fosfato por meio de ligações de fosfatodiestéster. A proteína carreadora, quando conjugada ao polissacarídeo, é capaz de induzir uma resposta imunológica dependente de célula-T.

A produção do polissacarídeo tipo B é baseada no sistema de lote semente, que é uma quantidade de ampolas contendo *H. influenzae* tipo b liofilizado, de composição uniforme, obtido a partir de uma cepa liofilizada de procedência conhecida. Os meios de cultura utilizados para preservar a viabilidade da cepa liofilizada, ou congelada, não devem ser constituídos de proteínas de origem animal. É recomendado que o PRP produzido pelo lote semente seja caracterizado por espectrometria de ressonância magnética nuclear.

O micro-organismo *H. influenzae* tipo b é cultivado em um meio líquido, adequado que não contém polissacarídeos de alto peso molecular. Se algum componente do meio contiver substâncias originárias do sangue, o processo deve ser validado para comprovar que após a purificação elas não são detectadas. Ao final do cultivo verifica-se a pureza da cultura por exame microscópico, inoculação da amostra em meios de cultivo adequados e aglutinação da cultura com antissoro específico. A cultura pode ser inativada. O PRP é separado do meio de cultivo e purificado por um método adequado.

POLISSACARÍDEO HAEMOPHILUS INFLUENZAE (PRP)

O polissacarídeo purificado somente pode ser utilizado na preparação do conjugado se cumprir os seguintes requisitos.

Identificação. O PRP é identificado por um *Método imunoquímico (5.6)* ou outro método validado, como espectrometria por ressonância magnética nuclear.

Umidade. O teor de umidade do polissacarídeo é determinado por análise termogravimétrica em balança de lâmpada halógena. A perda de peso é determinada em uma amostra seca a 60 °C durante 60 minutos. Transferir 120 mg da amostra para naveta, programar o analisador de umidade e, após o término da análise, transferir quantitativamente a amostra para um balão volumétrico de 10 mL e adicionar água ultrapurificada.

Distribuição por tamanho molecular. Corresponde a porcentagem de PRP, eluído antes de um dado valor de coeficiente de distribuição (Kd) ou dentro de uma faixa de valores de Kd. A distribuição das dimensões moleculares do PRP pode ser determinada por *Cromatografia líquida de alta eficiência (5.2.17.4)* de exclusão por tamanho. O método é realizado usando-se coluna de gel filtração de 300 x 7,8 mm para partículas de 10 µm, com fluxo de *Fase móvel* de 0,3 mL/minuto. As colunas são mantidas a uma temperatura constante de 25 °C. A eluição é monitorada usando-se um detector refractométrico para análise de PRP.

Fase móvel: preparar solução de cloreto de sódio 0,2 M e trometamina 0,01 M. Homogeneizar e, se necessário, ajustar para o pH 7,0. Filtrar num filtro de membrana de 0,45 µm antes do uso.

Solução de PRP: preparar solução de PRP a 4 mg/mL em *Fase móvel*.

Injetar 100 µL de amostras da solução de polissacarídeo a cada 60 minutos.

Para análise dos dados, é necessária a determinação do volume de exclusão total (V_0) e do volume de inclusão total (V_t). O V_0 e o V_t são determinados, respectivamente, com dextrana com peso molecular próximo a $K_d = 0,3$ e azida sódica.

Os polissacarídeos contêm uma fração de alto peso molecular eluindo no volume morto. O volume de eluição desses polissacarídeos de alto peso molecular, também, pode ser usado para determinar o volume morto da coluna. Na determinação da distribuição de peso molecular, o valor de K_d é determinado pela equação:

$$K_d = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0} \quad \text{ou} \quad K_d = \frac{R_t(V_e) - R_t(V_0)}{R_t(V_t) - R_t(V_0)}$$

em que

$R_t(V_e)$ = tempo de retenção do polissacarídeo analisado;

$R_t(V_0)$ = tempo de retenção de V_0 ;

$R_t(V_t)$ = tempo de retenção de V_t .

Para calcular a quantidade de polissacarídeo eluído a um $K_d \leq 0,30$, o volume de eluição correspondente a um $K_d = 0,30$ é determinado segundo a expressão:

$$V_e = [3,0(V_t - V_0)] + V_0$$

Com o valor de V_e , a porcentagem de polissacarídeo eluído a $K_d \leq 0,30$ é então determinada marcando esse valor no cromatograma e integrando a área do pico até esse ponto.

Um valor aceitável é estabelecido, especificamente, para o produto e cada partida de PRP deve cumprir com esse limite. Os limites para produtos aprovados, utilizando as fases estacionárias indicadas, são registrados, para informação, na **Tabela 1**.

O método de *Cromatografia líquida (5.2.17.4)* de detecção por espalhamento de luz também pode ser utilizado.

Outros métodos validados, como determinação do grau de polimerização ou do peso molecular médio e a dispersão das massas moleculares, podem substituir o teste para *Distribuição por tamanho molecular* descrito.

Concentração de PRP. A concentração de PRP é determinada por *Método imunológico (5.6)*, *Cromatografia líquida de troca aniônica com detecção amperométrica pulsada (5.2.17.3)* ou Ribose por espectrofotometria (Orcinol). Se for utilizado o teor de ribose, proceder conforme descrito em *Espectrofotometria de absorção no visível (5.2.14)*.

Solução padrão de D-ribose: diluir *D-ribose* em água destilada para a obtenção de uma solução a 25 µg/mL. Distribuir e armazenar as alíquotas a -20 °C.

Solução A: pesar, com exatidão, cerca de 50 mg de cloreto de ferro hexa-hidratado e dissolver em 100 mL de ácido clorídrico concentrado.

Reagente de orcinol: pesar 375 mg de orcinol monoidratado e dissolver em 5 mL de álcool etílico a

96% (v/v). Adicionar à *Solução A* na proporção de 1:20 e homogeneizar.

O polissacarídeo Hib é um polímero de ribosil-ribitol-5-fosfato e pode ser quantificado medindo-se o teor de ribose. A determinação do teor de ribose baseia-se na medição espectrofotométrica da absorvância de um complexo de coloração verde, formado pela reação entre o *Reagente de orcinol* e a ribose nas subunidades do polímero. Dentro da faixa da análise, a absorvância é proporcional à concentração de ribose. Para a curva analítica, pipetar, para cada um de 5 tubos de ensaio, 0 µL, 100 µL, 200 µL, 300 µL e 400 µL de *Solução padrão de D-ribose*. Adicionar água destilada a cada um dos tubos até 400 µL. Para a análise, dissolver o polissacarídeo purificado para 0,05 mg/mL em água destilada e pipetar 400 µL da solução amostra para os tubos. Adicionar a cada tubo 800 µL de *Reagente de orcinol* e colocá-los a 100 °C por 20 minutos. Deixar esfriar à temperatura ambiente e ler a absorvância a 669 nm. Os teores de ribose das amostras obtidas da curva analítica são expressos em microgramas de ribose por mililitro *versus* a massa do polissacarídeo seco. Calcular o porcentual (p/p) de D-ribose de acordo com a expressão:

$$\% \text{ D - ribose} = \frac{\text{massa de D - ribose } (\mu\text{g}) \text{ obtida da curva padrão}}{\text{massa de polissacarídeo } (\mu\text{g})} \times 100$$

O limite mínimo deve estar de acordo com o registro do produto aprovado pela autoridade regulatória nacional.

Fósforo. Proceder conforme descrito em *Espectrofotometria de absorção no visível (5.2.14)*. O método pode ser baseado na medida espectrofotométrica da absorvância da coloração azul formada pela redução de um complexo fosfomolibdico pelo ácido ascórbico.

Solução padrão: dissolver 109,7 mg de fosfato de potássio monobásico em 250 mL de água destilada. Diluir 5 mL da solução anterior para 100 mL com água destilada.

Solução A: pesar 2,5 g de molibdato de amônio e adicionar 100 mL de água destilada.

Solução B: no momento do uso, pesar 10 g de ácido ascórbico e adicionar 100 mL de água destilada.

Solução C (Complexo fosfomolibdico e ácido ascórbico): no momento do uso, misturar as soluções na seguinte ordem: 1 volume de ácido sulfúrico 3 M, 1 volume de *Solução A*, 2 volumes de água destilada e 1 volume de *Solução B*.

Reativo de mineralização: 5 mL de ácido sulfúrico concentrado e 5 mL de ácido perclórico a 70% (p/p).

Dissolver 25 mg de polissacarídeo purificado em água destilada, transferir, quantitativamente, para balão volumétrico de 50 mL, completar o volume com água destilada e homogeneizar. Para a mineralização, pipetar 100 µL dessa solução, transferir para um tubo de ensaio e adicionar 100 µL de *Reativo de mineralização*. O teste é realizado em triplicata. Aquecer a 250 °C até que haja descoloração completa (quatro horas). O branco (1 mL de água destilada) e as soluções padrão (0,5 mL, 1,0 mL, 1,5 mL e 2,0 mL de *Solução padrão*) são tratados de forma idêntica. Para o desenvolvimento de coloração, após esfriar cada tubo, adicionar 4 mL de *Solução C*. Aquecer o conteúdo dos tubos a 37 °C por 120 minutos para desenvolver uma coloração azul do complexo fosfomolibdico. Medir a absorvância das soluções amostras e padrões a 825 nm utilizando o branco como célula de referência. O teor de fósforo da amostra é determinado utilizando-se uma curva de calibração estabelecida a partir dos valores obtidos para as soluções padrão. Calcular o porcentual de fósforo por meio da fórmula:

$$\% \text{ de fósforo} = \frac{\text{concentração da amostra obtida na curva padrão } (\mu\text{g/tubo})}{0,1 \times \text{concentração da amostra } (\mu\text{g de polissacarídeo seco/mL})} \times 100$$

Os limites devem estar de acordo com o registro do produto aprovado pela autoridade regulatória nacional.

Proteína. Proceder conforme descrito em *Espectrofotometria de absorção no visível (5.2.14)*. O ensaio sugerido é baseado no método de Lowry, em que há desenvolvimento da coloração azul do quelato de cobre em presença de proteínas.

Solução estoque padrão de albumina de soro bovino: pesar 20 mg de albumina bovina (BSA) e completar para 100 mL com água destilada.

Solução alcalina de cobre: misturar 0,5 mL de tartarato de sódio e potássio a 2% (p/v) em água destilada, com 0,5 mL de sulfato cúprico penta-hidratado a 1% (p/v) em água destilada. Ajustar para 50 mL com carbonato de sódio a 2% (p/v) em hidróxido de sódio 0,1 M.

Reagente Folin diluído: misturar 50 mL de reagente fosfomolibdotúngstico (reagente de Folin-Ciocalteu-fenol) com 50 mL de água destilada. Essa solução tem de ser preparada no momento do uso.

Em tubos de ensaio adicionar 0 μL , 10 μL , 25 μL , 50 μL , 100 μL e 200 μL da *Solução estoque padrão de albumina de soro bovino*. Ajustar o volume em cada tubo para 200 μL com água destilada. Se necessário, diluir as amostras contendo cerca de 10 mg/mL de polissacarídeo dessecado e adicionar 200 μL em cada tubo. Adicionar 200 μL de água destilada como solução branco. Adicionar aos tubos de soluções padrão, branco e amostra na seguinte ordem: 1 mL de *Solução alcalina de cobre*, misturar e deixar reagir por 10 minutos; 100 μL de *Reagente Folin diluído*, misturando imediatamente. Após 30 minutos, as soluções são centrifugadas e as absorvâncias das soluções padrão e das soluções amostra são medidas a 750 nm. A concentração de proteína na amostra é expressa como microgramas por mililitro. Calcular a porcentagem de proteína de acordo com a expressão:

$$\% \text{ de proteína} = \frac{\text{concentração obtida da curva padrão } (\mu\text{g/tubo})}{\text{concentração da amostra } (\mu\text{g de polissacarídeo seco/mL})} \times 100$$

No máximo 1% (p/p), calculado em relação à base seca.

Ácido nucleico. Proceder conforme descrito em *Espectrofotometria no ultravioleta (5.2.14)*. O ácido nucleico residual de uma amostra contendo pelo menos 1 mg/mL de polissacarídeo dessecado é medido por espectrofotometria de absorção no ultravioleta em 260 nm. A absorvância de uma solução de ácido nucleico aquoso a 10 g/L em uma célula espectrofotométrica de 1 cm de largura a 260 nm é de 200.

$$\% \text{ de ácido nucleico} = \frac{\text{leitura da amostra} \times 50}{\text{massa de polissacarídeo seco (mg)}} \times 100$$

No máximo 1% (p/p), calculado em relação à base seca.

Reagentes residuais. Quando for relevante, devem ser realizados testes para determinar resíduos de reagentes utilizados durante a inativação e purificação. Um valor aceitável para cada reagente é estabelecido especificamente para o produto e cada partida de PRP deve cumprir com esse limite.

Caso os métodos para remoção de um reagente residual tenham sido validados, o teste no PRP pode ser omitido.

Endotoxinas bacterianas (5.5.2.2). No máximo 10 UE/ μ g de PRP.

PROTEÍNA CARREADORA

A proteína carreadora, quando conjugada ao PRP, deve ser capaz de induzir uma atividade imunogênica adequada. As proteínas são produzidas por meio da cultura dos respectivos microrganismos, na qual é verificada a pureza bacteriana. O cultivo pode ser inativado e a proteína é purificada por métodos adequados. As proteínas aprovadas e seus respectivos métodos de conjugação são informados na **Tabela 1**.

Componente diftérico. A anatoxina diftérica é produzida como descrito na monografia de *Vacina adsorvida difteria e tétano infantil*. Cumpre com os requisitos para anatoxina diftérica purificada, exceto para o teste de esterilidade, o qual não é requerido.

Componente tetânico. A anatoxina tetânica é produzida como descrito na monografia de *Toxoide tetânico adsorvido*. Cumpre com os requisitos para anatoxina tetânica purificada, exceto para o teste de esterilidade, o qual não é requerido.

Proteína diftérica CRM 197. Contém, no mínimo, 90% de proteína diftérica CRM 197, determinada por um método adequado. Alguns testes devem ser realizados, para validação ou rotineiramente, para demonstrar ausência de toxicidade no produto.

A proteína a ser utilizada na conjugação deve cumprir com os seguintes requisitos.

No caso de se utilizar como proteína carreadora o complexo proteico da membrana externa de *Neisseria meningitidis* grupo B (OMP), proceder ao teste de *Pirogênios (5.5.2.1)*. Injetar em cada coelho 0,25 μ g de OMP por quilograma de peso corpóreo.

Tabela 1 – Características do produto e especificações para o PRP e proteína carreadora.

Carreador		Polissacarídeo <i>Haemophilus</i>		Conjugação		
Tipo	Pureza	Quantidade nominal por dose	Tipo de PRP	Quantidade nominal por dose	Método de conjugação	Procedimento
Anatoxina Diftérica	Maior do que 1500 Lf /mg de nitrogênio	18 μ g	PRP de peso reduzido Kd:0,6-0,7	25 μ g	Ativação do PRP por brometo de cianogênio	Anatoxina diftérica ativada (D-AH ⁺), ativação do PRP por brometo de cianogênio PRP ativado-HA (PRP-cov.-HA) + Anatoxina Tetânica + EDAC
Anatoxina Tetânica	Maior do que 1500 Lf /mg de nitrogênio	20 μ g	PRP \geq 50% Kd \leq 0,30	10 μ g	Mediada por carbodiimida	Anatoxina Tetânica + EDAC
Proteína Diftérica CRM 197	Maior do que 90% de proteína diftérica	25 μ g	PRP de peso reduzido Dp=15-35 ou 10-35	10 μ g	Aminação redutora (método de 1 passo) ou ativação	Conjugação direta do PRP com a proteína CRM 197

				por N- hidroxisuccinimida	ativação cianoborohidri da
Membrana proteica externa de Meningococos grupo B (OMP)	Vesículas proteicas da membrana externa: ≤ 8% de lipopolissacarídeo	125 µg ou 250 µg	PRP de peso reduzido Kd ≤ 0,6, usando agarose de ligação cruzada para cromatografia R ou M _w > 50 x 10 ³	7,5 ou 15 µg	Ligação tioéter
					Ativação do PRP por CDI PRP-IM + BuA2 + BrAc = PRP-BuA2-BrAc + OMP tioativada

O PRP é modificado quimicamente para possibilitar a conjugação, sendo parcialmente despolimerizado antes ou após o procedimento. Antes da conjugação, grupos funcionais ativos podem ser introduzidos na proteína ou no PRP. Para determinar a consistência, a extensão da derivação é monitorada nessa etapa da produção. O conjugado é obtido pela ligação covalente de PRP e proteína. Os grupos funcionais residuais não reativos, mas potencialmente reatogênicos, podem estar presentes após o processo de conjugação. O processo deve ser validado para comprovar que grupos funcionais reativos não permanecem após a produção. O conjugado é então purificado para remoção de reagentes e submetido aos controles relacionados a seguir. Os limites aplicados para alguns desses controles estão listados na **Tabela 2**. Para uma vacina liofilizada, que é submetida ao processo de liofilização que pode afetar o componente a ser analisado, alguns testes podem ser realizados no lote final.

Concentração de PRP. A concentração de PRP é determinada por *Método imunológico (5.6)*, *Cromatografia líquida de troca aniônica com detecção amperométrica pulsada (5.2.17.3)* ou *Ribose*. Quando o teor de polissacarídeo for determinado pela concentração de ribose, proceder conforme descrito em *Concentração de PRP*, em *Polissacarídeo Haemophilus influenzae (PRP)*. O teor de polissacarídeo é calculado multiplicando-se o teor de ribose, expresso em micrograma por mililitro, pelo fator 2,488.

Proteína livre. A concentração pode ser determinada diretamente por um método adequado ou por derivação, por meio do cálculo dos resultados de outros testes. O valor deve estar dentro dos limites aprovados para o produto.

Proteína. Proceder conforme descrito em *Proteína*, em *Polissacarídeo Haemophilus influenzae (PRP)*. O resultado é calculado em microgramas por mililitro.

Razão polissacarídeo/proteína. Quociente entre concentração de polissacarídeo e concentração proteica. Para cada conjugado, a relação deve estar de acordo com a faixa aprovada no registro do produto aprovado pela autoridade regulatória nacional.

Reagentes residuais. A remoção de reagentes residuais tais como: cianeto, EDAC (etildimetilaminopropilcarbodiimida) e fenol, é confirmada por testes adequados ou por validação do processo.

Distribuição por tamanho molecular. Proceder conforme descrito em *Distribuição por tamanho molecular*, em *Polissacarídeo Haemophilus influenzae (PRP)*.

Para calcular a quantidade do conjugado eluído a um $K_d \leq 0,20$, o volume de eluição correspondente a um $K_d = 0,20$ é determinado segundo a expressão:

$$V_e = [0,2(V_t - V_o)] + V_o$$

Com o valor de V_e , a porcentagem de polissacarídeo eluído a $K_d \leq 0,20$ é então determinada, marcando esse valor no cromatograma e integrando a área do pico até esse ponto.

Para o conjugado, o valor aceitável deve estar de acordo com o registro do produto aprovado pela autoridade regulatória nacional.

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpre o teste. Utilizar para cada meio de cultivo 10 mL ou o equivalente a 100 doses, o que for menor.

Tabela 2 – Requisitos para o conjugado a granel.

<i>Teste</i>	<i>Proteína carreadora</i>			
	<i>Anatoxina diftérica</i>	<i>Anatoxina tetânica</i>	<i>Proteína diftérica CRM 197</i>	<i>Membrana proteica externa de Meningococo grupo B (OMP)</i>
PRP livre	< 37%	< 20%	< 25%	< 15%
Proteína livre	< 4%	< 1%	< 1% ou < 2%, dependendo do método de conjugação	Não aplicável
Razão PRP/ Proteína	1,25 – 1,8	0,30 – 0,6	0,3 – 0,7	0,05 – 0,1
Peso molecular (Kd):		$\geq 80\%$ para $K_d \leq 0,20$		
agarose de ligação cruzada para cromatografia	95% < 0,75	60% < 0,2	50%	85% < 0,3
agarose de ligação cruzada para cromatografia	0,6 – 0,7	85% < 0,5	0,3 – 0,6	

No preparo da vacina, produto acabado a granel, pode ser adicionado um adjuvante, um conservante antimicrobiano e um estabilizador, antes da diluição final com diluente adequado. Antes do envase, amostras do produto são submetidas aos controles a seguir.

Timerosal. Quando aplicável, proceder conforme descrito na monografia de *Vacinas para uso humano*. No máximo 200 ppm.

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpre o teste.

O produto é envasado em recipientes adequados e, se for o caso, liofilizado, rotulado e submetido aos controles requeridos.

IDENTIFICAÇÃO

O teste deve ser realizado por um *Método imunológico* (5.6) aprovado, utilizando anticorpos específicos para o polissacarídeo purificado.

CARACTERÍSTICAS

pH (5.2.19). Determinar o pH na amostra da vacina ou, no caso do componente liofilizado, o pH deve ser determinado após a reconstituição com o diluente adequado. Os limites devem ser determinados pelo histórico no registro do produto.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Umidade residual. Proceder conforme descrito na monografia de *Vacinas para uso humano*. No máximo 3,0%.

Concentração de Polissacarídeo. A concentração de PRP é determinada por *Método imunológico* (5.6), *Cromatografia líquida de troca aniônica com detecção amperométrica pulsada* (5.2.17.3) ou Ribose por espectrofotometria (Orcinol). Se for utilizado o teor de ribose, proceder conforme descrito em *Espectrofotometria de absorção no visível* (5.2.14). Para vacina liofilizada, dissolver o conteúdo de 20 frascos em cerca de 4 mL de água destilada e remover a lactose por diálise. Diluir o líquido dialisado residual a 10 mL com água destilada e determinar o teor de ribose da vacina conforme descrito em *Concentração de PRP*, em *Polissacarídeo Haemophilus influenzae (PRP)*. O teor de PRP da vacina é calculado multiplicando-se o teor de ribose, expresso como micrograma por mililitro, por 2,488 e é, no mínimo, 80% da concentração declarada no rótulo.

Distribuição por tamanho molecular. É a porcentagem de PRP, eluído antes de um dado valor Kd ou dentro de uma faixa de valores Kd, determinada por *Cromatografia líquida de alta eficiência* (5.2.17.4) de exclusão por tamanho, conforme descrito em *Distribuição por tamanho molecular*, para o *Polissacarídeo Haemophilus influenzae (PRP)*. Para um lote de vacina, uma amostra de 5 doses da vacina é diluída em 2,5 mL de *Fase móvel*. Um valor aceitável é estabelecido, especificamente, para o produto e cada lote de vacina deve cumprir com esse limite. Os limites para produtos aprovados, utilizando as fases estacionárias indicadas, são listados, para informação, na **Tabela 2**.

Polissacarídeo livre. No máximo 20%. A concentração de PRP livre é determinada após a remoção do conjugado por formação de um complexo PRP-proteína carreadora-anticorpo ou por outros métodos validados. Verificar no sobrenadante, por *Método imunológico* (5.6), o teor de polissacarídeo de Hib e a ausência de conjugado. Calcular a porcentagem de polissacarídeos livres na vacina segundo a expressão:

$$\% \text{ de PRP livre} = \frac{\text{teor de PRP do sobrenadante}}{\text{teor total de PRP da vacina}} \times 100$$

Timerosal. Quando aplicável, proceder conforme descrito na monografia de *Vacinas para uso humano*. No máximo 200 ppm. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpre o teste.

Endotoxinas bacterianas (5.5.2.2). Cumpre o teste. No máximo 25 UE/dose. Caso a vacina contenha algum componente que possa interferir no ensaio, deve ser realizado o teste de *Pirogênios (5.5.2.1)*.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Cumpre o estabelecido na monografia de *Vacinas para uso humano*.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.