**Полимурамил, раствор ФС**

**для внутримышечного**

**введения Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на полимурамил, раствор для внутримышечного введения, представляющий собой композицию высокоочищенных фрагментов пептидогликана клеточной стенки грамотрицательных бактерий семейства *Enterobacteriaceae*.

Полимурамил, раствор для внутримышечного введения, содержит от 160 до 240 мкг активного вещества в 0,5 мл раствора.

Препарат содержит белки и нуклеиновые кислоты (не более 2%).

Препарат является иммуностимулирующим средством, направленно влияющим на факторы защиты организма от инфекции.

ПРОИЗВОДСТВО

Технологический процесс производства лекарственного препарата полимурамила, раствора для внутримышечного введения, состоит из стадий приготовления и розлива стерильного водного раствора полимурамила.

Основной стадией технологического процесса производства субстанции полимурамила является глубинное культивирование грамотрицательных бактерий *Salmonella typhi* штамм Ту-2 № 4446 или других аналогичных штаммов семейства *Enterobacteriaceae.* Культуральную жидкость инактивируют, отделяют и промывают биомассу, которую затем экстрагируют с целью выделения нерастворимого пептидогликана клеточной стенки бактерий.

Для получения фрагментов пептидогликана проводят препаративный ферментативный гидролиз пептидогликана с помощью эндо-N-ацетилмурамидаз, например лизоцима, с одновременным отводом мурамилпептидов из реакционной смеси диализом. Диализат концентрируют и подвергают хроматографической очистке с последующей лиофилизацией целевого продукта (субстанции).

Субстанция полимурамила должна содержать активного вещества не менее 830 мг/г (метод ВЭЖХ), азота – от 8 до 12 % (метод Кьельдаля), воды – не более 15 % (метод Фишера). Остальные показатели – в соответствии с требованиями, предъявляемыми к субстанции полимурамила.

Производственные штаммы. Производственный штамм *S. typhi Ту-2 № 4446* должен отвечать следующим требованиям: находиться в S-форме; морфологические, культуральные и физико-химические свойства должны быть стабильными в течение года при хранении в лиофилизированном состоянии; LD50 производственного штамма должна быть не выше 20 микробных клеток при внутрибрюшинном введении мышам стандартной массы.

Производственные штаммы должны быть депонированы в официальных коллекциях.

Производство субстанции и лекарственного препарата полимурамила, раствора для внутримышечного введения, должно осуществляться в соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты» и ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения» с соблюдением [правил надлежащей производственной практики](http://docs.cntd.ru/document/499029882) и контроля качества биотехнологических препаратов.

ИСПЫТАНИЯ

**Описание.** Бесцветная прозрачная жидкость. Определение проводят визуальным методом.

**Подлинность.** Время удерживания основных пиков на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания основных пиков на хроматограмме стандартного образца полимурамила. Испытания проводят методом ВЭЖХ в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография».

*Подвижная фаза A (ПФА).* 0,01 % раствор трифторуксусной кислоты в воде очищенной.

*Подвижная фаза Б (ПФБ).* 0,01 % раствор трифторуксусной кислоты в ацетонитриле.

*Раствор стандартного образца (СО) полимурамила.* СО в количестве 20 мкл наносят на колонку (специального приготовления не требуется).

*Испытуемый раствор*. Препарат с заявленной концентрацией полимурамила (специального приготовления не требуется).

*«Холостая» проба.* Используют воду очищенную.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка  Температура колонки  Скорость потока  Детектор  Объем пробы  Время хроматографирования | 150 x 4,6 мм; силикагель октадецильный с размером частиц 5 мкм  (22 ± 2) °С  1,0 мл/мин  УФ, 200 нм  20 мкл  21 мин |

Элюирование проводят в режиме программирования состава подвижной фазы в соответствии с программой градиентного элюирования, указанной в таблице ниже (при необходимости градиент может быть скорректирован с целью улучшения разделения пиков).

*Режим хроматографирования*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Время,  мин | ПФА,  % | ПФБ,  % |
| 0→2 | 98 | 2 |
| 2→17 | 98→88 | 2→12 |
| 17→17,1 | 88→98 | 12 → 2 |
| 17,1→21 | 98 | 2 |

Колонку уравновешивают в течение 5 мин, используя смесь подвижных фаз А и Б в соотношении 1:1; затем не менее 10 мин, используя смесь подвижных фаз А и Б в соотношении 98:2, до стабильной базовой линии.

В хроматограф последовательно вводят «холостую» пробу, стандартный раствор полимурамила (не менее 3 раз), испытуемый раствор (не менее 3 раз).

*Проверка пригодности хроматографической системы*

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по основным пикам на хроматограмме стандартного раствора полимурамила, должна быть не менее 2000 теоретических тарелок;

- фактор ассиметрии, рассчитанный по пику А на хроматограмме стандартного раствора полимурамила, должен быть не менее 1,0 и не более 2,0. Фактор асимметрии для пика А рассчитывают по формуле:

где

- ширина пика на 5 % его высоты;

*а* - расстояние от фронта пика до его высоты, измеренное на 5 % его высоты;

- относительное стандартное отклонение результатов отдельных измерений времени удерживания каждого пика при повторных введениях проб не должно превышать, соответственно, 2,0 и 5,0 %;

- разрешение между пиками А и В на хроматограмме стандартного раствора полимурамила должно быть не менее 8,0. Разрешение между пиками А и В рассчитывают по формуле:

где

- время удерживания пика А;

- время удерживания пика В;

- ширина пика на половине его высоты.

**Молекулярные параметры.** Суммарная площадь двух основных пиков (константы распределения Кd = 0,7 ± 0,05 и Кd = 0,8 ± 0,05) должна составлять не менее 75 % от площади всех пиков на хроматограмме. Испытания проводят методом эксклюзионной хроматографиив соответствии с ОФС «Эксклюзионная хроматография».

*Подвижная фаза.* 0,1 М раствор аммония ацетата*.*

*Испытуемый раствор.* К 100 мкл раствора препарата полимурамила добавляют 100 мкл 0,2 М раствора аммония ацетата.

*Стандартный раствор.* К 100 мкл раствора СО добавляют 100 мкл 0,2 М раствора аммония ацетата.

*«Холостой» раствор.* 0,1 М раствор аммония ацетата*.*

*Калибровочный раствор (0,01 % раствор декстрана 70 и 0,01 % раствор натрия азида).* 10 мг декстрана 70 и 10 мг натрия азида растворяют в 100 мл 0,1 М раствора аммония ацетата и перемешивают в течение 1 мин.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 300 х 7,5 мм, силикагель гидрофильный для хроматографии с размером частиц 10 мкм. Допускается использование альтернативных колонок, удовлетворяющих требованиям пригодности хроматографической системы |
| Температура колонки | (22 ± 2) °С |
| Скорость потока | 1,0 мл/мин |
| Режим элюирования | изократический |
| Детектор | УФ, 220 нм  Рефрактометрический (с температурой оптического блока 26 оС) – для детектирования калибровочного раствора |
| Объем пробы | 20 мкл |
| Время хроматографирования | 15 мин. |

*Калибровка колонки.* Калибровку колонки для определения полного (*Vt*) и свободного (*Vо*) объема проводят, нанося на колонку 20 мкл калибровочного раствора.

Для определения *Кd* пиков на хроматограмме используют формулу:

где

*Ve* – объём элюции соответствующего пика, мл;

*Vo –* объём элюции декстрана, мл;

*Vt –* объём элюции натрия азида, мл.

Значение *Ve* получают при использовании УФ-детектора, для определения значений *Vo* и *Vt* используют пики декстрана 70 и азида натрия, соответственно, на хроматограмме, полученной с рефрактометрическим детектором (скорость элюции 1 мл/мин).

*Проведение хроматографии.* В колонку последовательно вводят «холостой» раствор (20 мкл), стандартный раствор (по 20 мкл, не менее 3 раз),испытуемый раствор (по 20 мкл, не менее 3 раз). При необходимости, объём вводимых проб может быть увеличен до 100 мкл.

*Проверка пригодности хроматографической системы*

Хроматографическая система считается пригодной, если:

* относительное стандартное отклонение результатов отдельных измерений времени удерживания и площади каждого пика А и В, рассчитанные по серии (не менее трех) хроматограмм стандартного раствора, не должно превышать, соответственно, 2,0 и 5,0 %;
* число теоретических тарелок, рассчитанное по основным пикам (А, В), должно быть не менее 2000;
* отношение *максиум/минимум* между пиками А и В должно быть не менее 5.

*Учёт результатов*

Суммарное содержание в смеси двух основных пиков (*Х, %*)

вычисляют по формуле:

где

– суммарная площадь основных пиков на хроматограмме испытуемого раствора (Кd = 0,7 ± 0,05 и Кd = 0, 8 ± 0,05);

– суммарная площадь всех пиков на хроматограмме испытуемого раствора. При расчёте величины *S2* не учитывают пики в районе *Vo* и *Vt*,а также возможные отрицательные пики.

Область интегрирования: от Кd = 0,5 до Кd = 0,9. Способ интегрирования – опусканием перпендикуляра к базовой линии.

**Прозрачность.** Должен быть прозрачным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

**Цветность.** Должен быть бесцветным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

**pH.** От 5,0 до 7,3. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

**Механические включения.** Препарат должен выдерживать требования по содержанию видимых и невидимых механических включений.

Видимые механические включения должны соответствовать требованиям, указанным в ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах». Испытание проводят визуально.

Невидимые механические включения должны соответствовать требованиям, указанным в ОФС «Невидимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения». Испытание проводят счетно-фотометрическим методом.

**Извлекаемый объем.** Не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

**Белок.** Не более 2 % (для субстанции – не более 1 %). Определение проводят колориметрическим методом Бредфорда в соответствии с ОФС «Определение белка» (метод 3).

Для построения калибровочного графика готовят исходный раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА) с концентрацией 1 мг/мл.

Для приготовления испытуемого раствора содержимое 25 ампул лиофилизируют. Полученный лиофилизат взвешивают и растворяют в 100 мкл воды дистиллированной. Затем добавляют 5 мл реактива Бредфорда, перемешивают и оставляют при (22 ± 2) оС на 5 – 45 мин, после чего измеряют оптическую плотность при 595 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют смесь 0,1 мл воды дистиллированной и 5 мл реактива Бредфорда. Концентрацию белка в испытуемом растворе препарата (*С*, мг/мл) определяют по калибровочному графику.

Содержание белка в препарате (*Хб*, %) рассчитывают по формуле:

(%), где

*С* – концентрация белка в растворе препарата, мг/мл;

*а* – навеска лиофилизата, мг.

**Нуклеиновые кислоты.** Не более 2 % (для субстанции – не более 1 %). Определение проводят спектрофотометрическим методом Спирина в соответствии с ОФС «Определение нуклеиновых кислот по методу Спирина в иммунобиологических лекарственных препаратах».

Для приготовления испытуемого раствора содержимое 50 ампул лиофилизируют. Полученный лиофилизат взвешивают, переносят в круглодонную колбу и растворяют в 1 мл воды деионизированной. Затем добавляют 5 мл 0.5 М раствора хлорной кислоты. Смесь нагревают на кипящей водяной бане в течение 20 мин. После охлаждения пробу центрифугируют при 2000 об/мин в течение 20 мин. Оптическую плотность надосадочной жидкости измеряют на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 10 мм при двух длинах волн: 270 и 290 нм (*А*270 и *А*290 соответственно). Контрольным раствором сравнения служит 0.5 М раствор хлорной кислоты.

Содержание нуклеиновых кислот (*Xн*, мкг/мл) вычисляют но формуле:

где

*А*270 и *А*290 – значения оптической плотности при соответствующей длине волны;

0,19 – значение дельта *А* (*А*270 - *А*290), которое имеет гидролизат нуклеиновых кислот, содержащий 1 мкг нуклеинового фосфора в 1 мл раствора;

10,3 – коэффициент пересчета количества фосфора в количественное содержание нуклеиновых кислот;

6,0 – разведение препарата.

Процентное содержание нуклеиновых кислот в препарате рассчитывают по формуле:

(%), где

*Хн* – содержание нуклеиновых кислот, мкг;

*а* – навеска лиофилизата, мкг.

**Пирогенность.** Должен быть апирогенным (ОФС «Пирогенность»). Тест-доза 20 мкг субстанции в 0,25 мл 0,9 % раствора натрия хлорида для инъекций на кг массы животного.

**Аномальная токсичность.** Должен быть нетоксичным (ОФС «Аномальная токсичность»). Препарат (субстанцию) вводят внутривенно по 100 мкг полимурамила в 0,5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида для инъекций на мышь стандартной массы. Наблюдение за животными ведут 5 сут.

**Стерильность.** Должен быть стерильным.Определение проводят методом прямого посева в соответствии с ОФС «Стерильность».

**Количественное определение.** Полимурамила от 160 до 240 мкг в

0,5 мл препарата.Определение проводят методом ВЭЖХ в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография» (раздел «Подлинность»).

Для количественного определения полимурамила используют хроматограммы, полученные при анализах согласно разделу «Подлинность». При расчете используют площади пиков, выходящие в интервале от 2 до 21 мин. При расчете не учитывают пики, присутствующие на хроматограмме холостого раствора, а также минорные пики полимурамила.

Приготовление стандартного и исследуемого растворов аналогично описанному в разделе «Подлинность».

Расчет проводят по формуле:

где

*Xп* - содержание основного вещества в исследуемом образце,

мкг/0,5 мл;

*S* - суммарная площадь пиков исследуемого образца на хроматограмме испытуемого раствора с интервалом времени удерживания от 2 до 21 мин;

*Sо* - суммарная площадь пиков СО на хроматограмме стандартного раствора с интервалом времен удерживания от 2 до 21 мин;

*Р* - содержание основного вещества в стандартном образце (СО) полимурамила, мкг/0.5 мл.

**Специфическая активность.** Концентрация фактора некроза опухолей альфа (ФНО-α) должна быть от 200 до 3000 пг/мл в пяти исследованных в одном опыте культурах мононуклеарных клеток (МНК получены от пяти доноров). Стимуляцию МНК (106 кл/мл, 200 мкл) проводят препаратом полимурамила в конечной концентрации 10 мкг/мл, инкубируя смесь с содержанием (5 ± 0,5) % диоксида углерода(37 ± 0,5) при (37 ± 0,5) °С в течение 24 ч.

Определение ФНО-α проводят методом количественного твердофазного иммуноферментного анализа в соответствии с ОФС «Метод иммуноферментного анализа». Для проведения испытаний используют готовые наборы реагентов, разрешенных к применению в практике здравоохранения Российской Федерации, в соответствии с инструкциями по применению.

**Транспортирование и** **хранение.** При температуре от 2 до 8 °С в защищенном от света месте. В соответствии с требованиями ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения», ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств» и ОФС «Хранение лекарственных средств». Не замораживать.