**Коллагеназа лиофилизат, ФС**

**для приготовления раствора**

**для местного и парентерального**

**применения Взамен ФС 42-3375-97**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на лекарственный препарат коллагеназа лиофилизат, для приготовления раствора для местного и парентерального применения.

Активным веществом препарата является коллагеназа - [фермент](http://alnam.ru/book_e_chem.php?id=234), относящийся к протеолитическим средствам, расщепляющим пептидные связи в определенных участках спирализованных областей коллагена, избирательно действует на коллаген, полипептидную цепь, вызывая его деструкцию.

В отношении других ферментов коллаген проявляет очень высокую степень устойчивости.

ПРОИЗВОДСТВО

Субстанцию для производства препарата коллагеназа, синтезируют из культуры бактерий газовой гангрены Clostridium hictolyticum, штамм 468 в анаэробных условиях. Основными стадиями технологического процесса производства лекарственного препарата коллагеназы лиофилизат для приготовления раствора для местного и парентерального применения, являются: синтез, очистка, концентрирование фермента коллагеназы, стерилизация, лиофилизация, упаковка и маркировка готового препарата.

Культивирование C. histolyticum проводят с использованием казеиново-соево-пепсинной среды, которая обеспечивает получение нетоксичной, высокоактивной коллагеназы.

Культуральную жидкость отделяют от микробной массы микрофильтрацией. Очистку и концентрирование фермента проводят на ультрафильтрационных мембранах с порогом задержания веществ по молекулярной массе 50000, с последующей отмывкой концентрированной коллагеназы последовательно стерильной апирогенной водой и натрия хлорида раствором 0,9 % до исчезновения азотистых веществ в фильтрате.

Очищенный фильтрат стерилизуют через мембранные фильтры и концентрированный очищенный препарат лиофилизируют.

Штаммы - продуценты C. histolyiticum 468 должны быть депонированы в официальных коллекциях культур микроорганизмов.

Препарат должен производиться в соответствии с требованиями [правил надлежащей производственной практики](http://docs.cntd.ru/document/499029882) и контроля качества лекарственных препаратов, обеспечивающими его качество и безопасность применения для человека.

Производство препарата должно осуществляться с соблюдением требований, указанных в ОФС «Биотехнологические лекарственные препараты».

ИСПЫТАНИЯ

**Описание.** Порошок или пористая масса белого цвета.

**Растворимость. Р**астворим в воде, натрия хлорида растворе 0,9 %, новокаина растворе 0,5 % в течение 1 мин при температуре (20 ± 2) °С после добавления в ампулу 0,5 мл растворителя при встряхивании. Определение проводят в соответствии с ОФС «Растворимость».

**Подлинность.** Должен лизировать коллаген. Определение проводят по разделу «Количественное определение».

**Однородность массы.** Отклонение массы содержимого одной ампулы от средней массы не должно превышать ± 15 %. Масса содержимого ампулы от 3 мг до 6 мг в зависимости от дозы розлива. Определение проводят в соответствии с ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм».

**Прозрачность.** Должен выдерживатьсравнение с эталоном I. Определение проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей». Предварительно 0,01 г препаратарастворяютв 5 мл воды.

**Цветность.** Должен быть бесцветным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей». Предварительно 0,01 г препаратарастворяют в 5 мл воды.

**рН.** От 6,3 до 7,3 (0,1 % водный раствор препарата). Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

# Механические включения. Должен выдерживать требования, указанные в ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

# Потеря в массе при высушивании. Не более 3 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании» (методика определения потери массы при высушивании в иммунобиологических лекарственных препаратах).

# Пирогенность. Должен быть апирогенным. Тест-доза 5 КЕ (коллагеназная активность) препарата на 1 кг массы кролика в объеме 5 мл натрия хлорида раствора 0,9 % «для инъекций». Испытуемый лекарственный препарат, подогретый до температуры 37 °С, вводят в ушную вену в течение 2 мин. Определение проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность».

# Аномальная токсичность. Должен быть нетоксичным. Тест-доза 100 КЕ в 0,5 мл воды для инъекций внутривенно в расчете на мышь. Срок наблюдения 48 ч. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность».

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

**Количественное определение.** (коллагеназная активность КЕ). Активность 1 мг препарата должна быть не менее 100 КЕ. Определение проводят в соответствии ОФС «Определение активности ферментных препаратов».

За единицу коллагеназной активности (КЕ) принимается такое количество препарата, которое при температуре 37 °С в течение 1 мин растворяет 1 мкг окрашенного коллагена.

*Раствор препарата.*

Для приготовления 1 % раствора препарата 0,01 г (точная навеска) растворяют в 1 мл трис-буферного раствора рН 7,5.

Раствор используют свежеприготовленным.

*Раствор стандартного образца (СО) коллагеназы.*

Для приготовления1 %раствора СО коллагеназы 0,01 г (точная навеска) растворяют в 1 мл трис-буферного раствора рН 7,5.

Раствор используют свежеприготовленным.

Методика.

В 3 пробирки вносят по 5 мг (точная навеска) коллагена, окрашенного активным оранжевым красителем ЖТ или 4 КТ (винилсульфоновые красители).

В пробирку №1 (испытуемая) вносят 1 % раствор препарата в трис- буферном растворе pH 7,5 (0,02 Моль/л) в объеме, количественно содержащем 50 мкг белка, в пробирку №2 вносят коллагеназы СО раствор 1 % в трис- буферном растворе pH 7,5 в объеме, также количественно содержащем 50 мкг белка по схеме, представленной ниже, и доводят общий объем реакционной смеси в пробирках трис-буферным раствором рН 7,5 до 1 мл.

Схема

|  |  |
| --- | --- |
| Содержание белка в СО коллагеназы (мкг/мг) | Объем 1 %СО коллагеназы, содержащего 50 мкг белка (мкл) |
| 26 | 192 |
| 27 | 185 |
| 28 | 179 |
| 29 | 172 |
| 30 | 167 |

В пробирку №3 (контрольная) вносят 1 мл трис-буферного раствора рН 7,5. Все пробирки закрывают, перемешивают и выдерживают в термостате при температуре 37 °С в течение 40 мин. Затем пробирки помещают на 3 мин в холодную баню с температурой (10 ± 2) °С, после чего в каждую пробирку прибавляют по 4 мл трис-буферного раствора рН 7,5 и перемешивают. Содержимое пробирок фильтруют через фильтры обеззоленные "синяя лента". Измеряют значения оптических плотностей на спектрофотометре при длине волны 510 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм в фильтрате испытуемого раствора препарата (D2) и раствора СО коллагенозы (D1) по сравнению с фильтратом контрольного раствора.

Определение проводят не менее в трех параллельных измерениях с использованием трех различных навесок испытуемого препарата.

Активность (А) в коллагеназных единицах на миллиграмм препарата вычисляют по формуле:

|  |  |
| --- | --- |
| A |  |

где: Ас- ферментативная активность СО коллагеназы в КЕ/мг;

D2 – значение оптической плотности испытуемого раствора препарата;

D1 – значение оптической плотности раствора СО коллагеназы;

К - коэффициент, выравнивающий концентрации растворов испытуемого препарата и стандартного образца, равный 1,1.

Активность 1 мг препарата должна быть не менее 100 КЕ.

Для определения активности препарата в ампуле определяют массу препарата в каждой из 10 ампулах от серии по разности масс с препаратом и пустой ампулы.

Содержание препарата в ампуле (X) в КЕ вычисляют по формуле:

X = АˑВ,

где: А - активность препарата, КЕ/мг;

В - средняя масса препарата в ампуле, мг.

Содержание препарата в ампуле должно быть не менее 90 % и не более

120 % от количества КЕ, указанного на ампуле (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 КЕ).

Примечания

Приготовление трис-буферного раствора pH 7,5 (0,02 Моль/л). 0,548 г кальция хлорида, 1,211 г трис (гидроксиметиламинометана) и 0,877 г натрия хлорида помещают в мерную колбу вместимостью 500 мл, растворяют в 400 мл воды, доводят pH хлористоводородной кислотой раствором 0,5 М до 7,5. Объем раствора доводят водой до метки и перемешивают.

Раствор годен при хранении от 2 до 8 °С, в течение 14 сут.

Приготовление окрашенного коллагена. В стеклянный стакан наливают 500 мл воды температуры 40 °С, добавляют 10 г натрия карбоната, 25 г натрия хлорида и 2,5 г красителя - активного оранжевого ЖТ или 4 КТ. При значении pH равному 8,0 ± 0,1 в стакан помещают 10 г коллагена.

Выдерживают в термостате при температуре 40 °С, периодически помешивая, в течении 2 ч. Отмывают водой от остатков красителя и высушивают при комнатной температуре, измельчают на гомогенизаторе.

# Общий белок. Содержание белка в 1 мг препарата должно быть в пределах от 20 до 30 мкг.

# Определение проводят в соответствии ОФС «Определение белка» (Метод Лоури, метод А).

# *Испытуемый раствор.*

# Около 0,025 г препарата (точная навеска) растворяют в 5 мл воды очищенной (0,5 % раствор).

# *Стандартный образец.*

Альбумин бычий сывороточный лиофилизированный (БСА).

*Стандартный раствор альбумина бычьего сывороточного (БСА).*

0,05 г БСА растворяют в 5,0 мл воды (1 мг/мл).

Содержание белка в препарате рассчитывают по калибровочному графику.

Содержание белка (Б) в микрограммах на 1 миллиграмм препарата вычисляют по формуле:

*Б*=

где: Р - содержание белка в испытуемом растворе препарата найденные по калибровочному графику, мкг;

а - навеска препарата, мг.

*Калибровочный график*.

Из стандартного раствора БСА 1 мг/мл готовят калибровочные растворы с содержанием 50, 100, 200, 300 и 400 мкг белка в 1 мл и проводят реакцию по методу Лоури с реактивом Фолина-Чокальтеу разведённого.

# Калибровочный график строят, откладывая на оси абсцисс количество белка в мкг, а по оси ординат оптическую плотность испытуемого раствора.

Калибровочный график строят при каждом определении.

# **Удельная активность.** (расчетная величина). Не менее 3000 КЕ на 1 мг белка.

Удельную активность (УА) препарата в КЕ на миллиграмм белка вычисляют по формуле:

УА =,

где:  *А* - активность препарата, КЕ/мг;

*В* - содержание белка в препарате, мкг/мг;

1000 - коэффициент перевода содержания белка в препарате из микрограммов в миллиграммы.

**Упаковка и маркировка.** В соответствии с ОФС «Лекарственные формы», ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

# Транспортирование и хранение. В сухом, защищенном от света месте при температуре от 4 до 8 °С. В соответствии с ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

# Хранить в недоступном для детей месте.