**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРЦИИ**

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

**Дорназа альфа ФС**

***Dornase alfa* Вводится впервые**

|  |
| --- |
| LKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSYIVQILSRYDIALVQEVRDSHLTAVGKLLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPAIVRFFSRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDSADTTATPTHCAYDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAISDHYPVEVMLK |
| C1321H1999N339O396S9 | М.м. 29 25  |

Настоящая фармакопейная статья распространяется на субстанцию дорназы альфа, полученную методами генной инженерии с использованием клеток яичника китайских хомячков

Субстанция должна соответствовать ОФС «Лекарственные средства, получаемые методом рекомбинантной ДНК», ОФС «Биотехнологические лекарственные препараты» и ниже приведенным требованиям.

Cодержит не менее 91,0 % и не более 105,0 % C1321H1999N339O396S9 дорназы альфа в пересчёте на сухое и свободное от остаточных органических растворителей вещество.

**Описание.** Прозрачная бесцветная или желтоватого цвета жидкость

**Подлинность**

1. Основные полосы на электрофореграммах испытуемого раствора и раствора стандартного образца дорназы альфа должны совпадать по подвижности. Определение проводят методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в восстанавливающих условиях с окрашиванием раствором Кумасси (ОФС «Электрофорез в полиакриламидном геле»).

2. Хроматографический профиль испытуемого раствора должен соответствовать хроматографическому профилю раствора стандартного образца дорназы альфа(ОФС «Пептидное картирование»)*.* Определение проводят в сочетании с методом ВЭЖХ

*Подвижная фаза А (ПФА)* В химический стакан вместимостью 1 л помещают около 1,54 г аммония ацетата, растворяют в 900 мл воды, доводят pH раствора уксусной кислотой ледяной до 4,0 ± 0,05. Полученный раствор переносят в мерную колбу вместимостью 1 л, доводят объем раствора водой до метки, перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

*Подвижная фаза Б (ПФБ)* В мерную колбу вместимостью 500 мл помещают 400 мл ацетонитрила для ВЭЖХ, 50 мл раствора *(ПФА)* и тщательно перемешивают. Доводят полученный раствор ацетонитрилом до метки, фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм и дегазируют.

*Буферный раствор рН 8,6.* В химический стакан вместимостью 200 мл помещают около 96,0 г мочевины, 8,8 г трис(гидроксиметил)амино-метана, 0,332 г (точная навеска) (этилендинитрил)тетрауксусной кислоты, растворяют в 150 мл воды, доводят рН раствора хлористоводородной кислотой концентрированной до 8,6$\pm $0,1. Полученный раствор переносят в мерную колбу вместимостью 200 мл, доводят объем раствора водой до метки, перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Срок годности - 5 сут при температуре от 15 до 25 °С.

*1 М раствор дитиотреитола.* В полипропиленовую пробирку вместимостью 1,5 мл помещают около 0,154 г (точная навеска) дитиотреитола, прибавляют 1,0 мл воды и перемешивают.

Срок годности - 6ч при температуре от 2 до 8 °С.

*0,1 М раствор аммония гидрокарбоната.* Около 7,9 г аммония гидрокарбоната помещают в химический стакан вместимостью 1 л, растворяют в 900 мл воды, переносят в мерную колбу вместимостью 1 л, доводят объем раствора водой до метки, перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Срок годности - 2 сут при температуре от 2 до 8 °С в плотно укупоренной таре.

*Раствор трипсина*. Для восстановления содержимое флакона с лиофилизатом трипсина (20 мкг) осторожно растворяют в 20 мкл буфера.

Раствор используют свежеприготовленным.

*Раствор Пептид-N-гликозидазы (ПНГазы).* Содержимое флакона ПНГазы растворяют в воде для получения раствора с активностью фермента около 500 ЕД/мл.

Раствор используют свежеприготовленным.

*Контрольный раствор.* В химический стакан вместимостью 1 л помещают около 8,77 г натрия хлорида и около 0,15 г (точная навеска) кальция хлорида дигидрата, растворяют в 900 мл воды и тщательно перемешивают. Значение pH раствора должно быть от 5,7 до 6,3. Доведение pH кислотным или щелочным реагентом до установленных пределов не допускается. Полученный раствор переносят в мерную колбу вместимостью 1 л, доводят объем раствора водой до метки, фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм и дегазируют.

Срок годности - 5 сут при температуре от 2 до 8 °С.

*Испытуемый раствор.* Субстанция-раствор без пробоподготовки.

*Гидролизованный испытуемый раствор, гидролизованный раствор стандартного образца (СО) дорназы альфа и контрольный раствор с трипсином*. В пробирку вместимостью 15 мл помещают по 0,5 мл испытуемого раствора, СО дорназы альфа и контрольного раствора. В каждую пробирку прибавляют по 10,0 мл буферного раствора pH 8,6, уравновешивают и центрифугируют при (5000 ± 50) g в течение 25 мин при температуре от 15 до 25 °С.

После окончания центрифугирования в пространстве над мембраной должно остаться около 1,0 мл жидкости (по градуировке на пробирке). Затем прибавляют по 10 мл буферного раствора pH 8,6, уравновешивают и центрифугируют при тех же условиях. Процедуру повторяют еще 1 раз. Если в пространстве над мембраной осталось более 1 мл жидкости, проводят дополнительное центрифугирование при тех же условиях в течение 1-2 мин без прибавления буферного раствора pH 8,6.

После этого растворы переносят в полипропиленовые пробирки вместимостью 1,5 мл, прибавляют буферный раствор pH 8,6 до общего объема около 1 мл. В каждую пробирку помещают по 5 мкл 1 М раствора дитиотреитола, тщательно перемешивают на вихревом смесителе и выдерживают при температуре от 15 до 25 °С в течение 4 ч.

После чего охлаждают на льду в течение 10-15 мин, прибавляют по 12,5 мкл 1 М раствора йодуксусной кислоты, перемешивают и оставляют в защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С на 30 мин. Затем прибавляют по 25 мкл 1 М раствора дитиотреитола и перемешивают.

Полученные растворы помещают в ультрафильтрационные пробирки вместимостью 15 мл. В каждую пробирку прибавляют по 10 мл 0,1 М раствора аммония гидрокарбоната, уравновешивают и центрифугируют при (5000 ± 50) g в течение 25 мин при температуре от 2 до 8 °С.

После окончания центрифугирования в пространстве над мембраной должно остаться около 1,0 мл жидкости (по градуировке на пробирке). Прибавляют по 10 мл 0,1 М раствора аммония гидрокарбоната, уравновешивают и центрифугируют при тех же условиях. Процедуру повторяют еще 1 раз.

Если в пространстве над мембраной осталось более 1 мл жидкости, проводят дополнительное центрифугирование при тех же условиях в течение 1-2 мин без прибавления 0,1 М раствора аммония гидрокарбоната.

После этого растворы переносят в полипропиленовые пробирки вместимостью 1,5 мл, прибавляют 0,1 М раствор аммония гидрокарбоната до общего объема около 1 мл.

Затем в каждую пробирку вносят по 25 мкл раствора ПНГазы, тщательно перемешивают и инкубируют при температуре (37,0 ± 1,0) °С в течение 15,5 ч. Полученные растворы центрифугируют при (20 000 ± 50) g в течение 1 мин, прибавляют 5 мкл раствора трипсина и снова инкубируют при температуре (42 ± 1) °С в течение 2 ч.

Реакцию останавливают прибавлением 100 мкл 10 % раствора трифторуксусной кислоты. Полученные растворы центрифугируют при (13500 ± 50) g в течение 10-15 мин. Надосадочную жидкость осторожно автоматической пипеткой переносят в полипропиленовые пробирки вместимостью 1,5 мл.

Срок годности полученных растворов - 2 сут при температуре от 2 до 8 °С.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Предколонка | 4,0× 3,0 мм, октадецилсиликагель для хроматографии, 5 мкм |
| Колонка | 150 × 2,1 мм, октадецилсиликагель для хроматографии, 5 мкм |
| Скорость потока | 0,3 мл/мин |
| Детектор | УФ-детектор, 210 нм; |
| Объем пробы | 100 мкл; |
| Температура колонки | (30 ± 5) °С; |
| Время хроматографирования | не менее 160 мин |

*Режим хроматографирования*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Время, мин | ПФА, % | ПФБ, % |
| 0 |  |  |
| 135 | 55 | 45 |
| 140 | 0 | 100 |
| 142 | 0 | 100 |
| 143 | 100 | 0 |
| 145 | 100 | 0 |
| 146 | 0 | 100 |
| 148 | 0 | 100 |
| 149 | 100 | 0 |
| 160 | 100 | 0 |

Перед началом определения хроматографическую колонку уравновешивают ПФА до формирования стабильной базовой линии.

В хроматограф последовательно вводят контрольный раствор с трипсином (1 инжекция), гидролизованныий раствор СО дорназы-альфа (5 инжекций), гидролизованный испытуемый раствор (3 инжекции).

Пики, принадлежащие контрольному раствору с трипсином, при оценке хроматограммы не учитывают,

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- время удерживания пика должно быть от 15,5 до 18 мин, от 32 до 37 мин

- разрешение между пиками должно быть не менее 1,5;

- значения ширины пиков на половине их высоты, отложенной от базовой линии не должны превышать 0,5 мин.

- относительное стандартное отклонение времени удерживания и площади пиков а, b, с должно быть не более 2 %;

- коэффициент симметрии пиков должен быть не более 1,5;

- эффективность колонки для пика с должна быть не менее 150 000 теоретических тарелок.

3. Должна проявлять специфическую биологическую активность в пределах установленных норм (по разделу «Специфическая активность»).

**Прозрачность.** Должен быть прозрачным или не превышать эталон сравнения I. Определение проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

**Цветность.** Должна быть бесцветной или не превышать эталон Y6. Определение проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

**рН.** От 5,6 до 6,0. Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

**Бактериальные эндотоксины.** Не более 10 ЕЭ/мл. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины».

**Стерильность.** Должна быть стерильной. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Стерильность» методом прямого посева или мембранной фильтрации.

**Количественное определение.** От 0,9 до 1,1 мг/мл. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение белка», метод 1 (спектрофотометрический).

Испытуемый раствор. 5,0 мл субстанции-раствора помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора контрольным раствором до метки и перемешивают (около 0,5 мг/мл).

Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора при длине волны 280 нм и 320 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Определение проводят в 3 повторностях, полученные значения оптических плотностей усредняют.

**Биологическая активность**. От 800 до 1300 ЕД/мл. Определение проводят колориметрическим методом c использованием субстрата ДНК с метиловым зеленым.

50 % раствор натрия гидроксида. В химический стакан вместимостью 100 мл помещают около 50,0 г натрия гидроксида, осторожно растворяют в 80 мл воды, охлаждают, переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Срок годности - 3 мес при температуре от 2 до 8 °С в плотно укупоренной пластиковой таре.

*Буферный раствор А.*В мерный химический стакан вместимостью 250 мл помещают около 1,2 г (гидроксиэтил)-пиперазинэтансульфоновой кислоты, около 74 мг (точная навеска) динатриевой соли (этилендинитрил)тетрауксусной кислоты дигидрата, растворяют в 150 мл воды, доводят pH раствора 50 % раствором натрия гидроксида до 7,5 ± 0,1. Полученный раствор переносят в мерную колбу вместимостью 200 мл, доводят объем раствора водой до метки, перемешивают, фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм и дегазируют.

Срок годности - 2 мес при температуре от 2 до 8 °С.

Раствор натриевой соли ДНК. В полипропиленовую пробирку вместимостью 50 мл помещают около 50 мг (точная навеска) натриевой соли ДНК из спермы лосося, прибавляют 25 мл буферного раствора А и тщательно перемешивают в течение 2-4 ч на орбитальном встряхивателе со скоростью 100 об/мин при комнатной температуре до получения гомогенного раствора (около 2,0 мг/мл).

Срок годности - 1 мес при температуре от 2 до 8 °С.

Буферный раствор В. химический стакан вместимостью 500 мл помещают 200 мл воды прибавляют 286 мкл уксусной кислоты ледяной, тщательно перемешивают и доводят pH раствора 1 М раствором натрия гидроксида до 4,20 ± 0,05.

Срок годности - 2 мес при при температуре от 2 до 8 °С.

0,4 % раствор метилового зеленого. В мерный химический стакан вместимостью 25 мл помещают около 0,100 г (точная навеска) метилового зеленого, растворяют в 15 мл буферного раствора *В*, доводят объем раствора буферным раствором *В* до метки и тщательно перемешивают. Полученный раствор переносят в полипропиленовую пробирку вместимостью 50 мл, прибавляют 25 мл хлороформа, тщательно перемешивают. Выдерживают смесь в течение 5 мин при комнатной тепературе для разделения фаз.

После разделения смеси на 2 слоя, осторожно отбирают верхний слой с метиловым зеленым и переносят его в другую полипропиленовую пробирку вместимостью 50 мл, прибавляют 25 мл хлороформа и повторяют экстракцию аналогичным образом еще 7 раз. Затем фазу с метиловым зеленым переносят в мерный химический стакан вместимостью 50 мл с магнитным перемешивающим элементом, помещают на магнитную мешалку в вытяжной шкаф и перемешивают в течение 2 часов для удаления остаточных количеств хлороформа. После чего, полученный раствор переносят в полипропиленовую пробирку вместимостью 50 мл.

Срок годности - 1 год при температуре от 2 до 8 °С.

10 % раствор натрия азида. Около 10,0 г натрия азида помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 80 мл воды, доводят объем раствора водой до метки, фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм и дегазируют.

Срок годности - 6 мес при температуре от 2 до 8 °С.

20 % раствор полисорбата 20. В коническую колбу вместимостью 200 мл помещают 18 мл полисорбата 20, прибавляют 80 мл воды, перемешивают, фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм и дегазируют.

Срок годности - 1 мес при температуре от 2 до 8 °С.

Буферный раствор С. Около 0,60 г (точная навеска) HEPES для буферных растворов, 0,06 г (точная навеска) кальция хлорида дигидрата, 0,04 г (точная навеска) магния хлорида, 0,25 г (точная навеска) БСА, 100 мкл 10 % раствора натрия азида и 250 мкл 20 % раствора полисорбата 20 помещают в химический стакан вместимостью 250 мл, растворяют в 80 мл воды, доводят pH раствора 1 М раствором натрия гидроксида до 7,5 ± 0,1. Полученный раствор помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки, перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Срок годности - 1 мес при температуре от 2 до 8 °С.

Субстрат ДНК с метиловым зеленым. 25,0 мл раствора натриевой соли ДНК, 1,5 мл 0,4 % раствора метилового зеленого и 6,0 мл буферного раствора С помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, осторожно перемешивают и выдерживают при комнатной температуре в течение 12 ч при постоянном перемешивании.

Срок годности - 1 мес при температуре от 2 до 8 °С.

Контрольный раствор. Приготовление описано в разделе «Подлинность».

Испытуемый раствор. Субстанция - раствор без пробоподготовки.

Разведения СО дорнзаы альфа. Разведение № 1 готовят с учетом количественного содержания дорназы альфа в СО по паспорту.

Объем буферного раствора С (V1), в мкл, для приготовления разведения № 1 рассчитывают по формуле:

V1=$\frac{С\_{0}∙1000}{50}$ $∙$ 40$-40$

Со - содержание дорназы альфа в СО по паспорту, в мг/мл;

50 - содержание дорназы альфа в разведении № 1 СО, в мг/мл;

40 - объем СО, взятый для приготовления разведения № 1 СО, в мл;

1000 - коэффициент пересчета мкг в мг.

Остальные разведения СО дорназы альфа готовят по следующей схеме:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| №№пробирок | Объем, мкл | Содержаниедорназы альфамкг/мл |
| СОдорназы альфа | №№ пробирок | Буферный раствор С |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| 1 | 40 |  |  |  |  |  |  |  | - | - | V1 | 50 |
| 2 | - | 180 |  |  |  |  |  |  |  | - | 820 | 9 |
| 3 | - | - | 267 |  |  |  |  |  |  |  | 733 | 2,4 |
| **4\*** | - | - | - | 50 | - | - | - | - | - | - | 950 | **0,12** |
| **5\*** | - | - | - | - | 360 | - | - | - | - | - | 240 | **0,0719** |
| **6\*** | - | - | - | - | - | 360 | - | - | - | - | 240 | **0,0431** |
| **7\*** | - | - | - | - | - | - | 360 | - | - | - | 240 | **0,0258** |
| **8\*** | - | - | - | - | - | - | - | 360 | - | - | 240 | **0,0155** |
| **9\*** |  |  |  |  |  |  |  |  | 360 | - | 240 | **0,0093** |
| **10\*** |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 360 | 240 | **0,0056** |

\* - Для анализа используют разведения СО №№ 4-10.

Разведения испытуемого раствора. Разведение № 1 готовят с учетом содержания дорназы альфа по разделу «Количественное определение». Объем буферного раствора С (V2), в мкл, для разведения № 1 испытуемого раствора рассчитывают по формуле:

V2=$\frac{C∙1000}{50}$ $∙$ 40$-40$,

где:

С - содержание дорназы альфа (по разделу «Количественное определение»), в мг/мл;

50 - содержание дорназы альфа в разведении № 1 испытуемого раствора, в мг/мл;

40 - объем субстанции-раствора, взятый для приготовления разведения № 1 испытуемого раствора, в мл;

1000 - коэффициент пересчета мкг в мг.

Остальные разведения испытуемого раствора готовят по следующей схеме:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| №№пробирок | Объем, мкл | Содержаниедорназы альфамкг/мл |
| СОдорназы альфа | №№ пробирок | Буферный раствор С |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| 1 | 40 |  |  |  |  |  |  |  | - | - | V1 | 50 |
| 2 | - | 180 |  |  |  |  |  |  |  | - | 820 | 9 |
| 3 | - | - | 267 |  |  |  |  |  |  |  | 733 | 2,4 |
| **4\*** | - | - | - | 50 | - | - | - | - | - | - | 950 | **0,12** |
| **5\*** | - | - | - | - | 360 | - | - | - | - | - | 240 | **0,0719** |
| **6\*** | - | - | - | - | - | 360 | - | - | - | - | 240 | **0,0431** |
| **7\*** | - | - | - | - | - | - | 360 | - | - | - | 240 | **0,0258** |
| **8\*** | - | - | - | - | - | - | - | 360 | - | - | 240 | **0,0155** |
| **9\*** |  |  |  |  |  |  |  |  | 360 | - | 240 | **0,0093** |
| **10\*** |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 360 | 240 | **0,0056** |

Проведение анализа

В лунки 96-луночного несорбирующего планшета вносят в 2 повторностях по 100 мкл буферного раствора С, разведений СО (пробирки №№ 4-10) и разведений испытуемого раствора (пробирки №№ 4-10). Затем в каждую лунку прибавляют по 100 мкл субстрата ДНК с метиловым зеленым. Содержимое лунок осторожно пипетируют (не менее 8 раз), избегая образования пузырей. После чего планшет заклеивают пленкой и инкубируют без перемешивания в термошейкере в течение 4 ч при температуре (37 ± 0,5) °С.

Измеряют оптическую плотность содержимого лунок на биохимическом и иммуноферментном анализаторе при длинах волн 630 и 492 нм.

Биологическую активность дорназы альфа в субстанции-растворе, в ЕД/мл, рассчитывают по формуле:

А= Асо $∙$$\frac{IC50\_{СО}}{IC50\_{ИР}}$

где: Асо - активность дорназы альфа по сертификату анализа на СО, в

ЕД/мл;

IС50со - полумаксимальная концентрация ингибирования, полученная по графику с разведениями СО;

IС50ир - полумаксимальная концентрация ингибирования, полученная по графику с разведениями испытуемого раствора.

**Остаточные белки клетки-хозяина.** Не более 110 нг/мг. Определение проводят в соответствии ОФС «Определение остаточных белков клетки-хозяина».

**Остаточная ДНК.** Не более 50 пг/мл. Определение проводят в соответствии ОФС «Определение остаточной ДНК».

**Хранение.** При температуре от 2 до 8°С в защищенном от света месте. В соответствии с ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств». Не замораживать.