**Рекомбинантный белок, содержащий ФС**

**аминокислотную последовательность**

**стафилокиназы Вводится впервые**

***Нуклеотидная последовательность гена рекомбинантной стафилокиназы и соответствующая этому гену аминокислотная последовательность белка рекомбинантной стафилокиназы***



Эмпирическая формула C711H1372N168O350S

Молекулярная масса 15500

Настоящая фармакопейная статья распространяется на субстанцию рекомбинантного белка, содержащего аминокислотную последовательность стафилокиназы. Действующим веществом препарата является неиммуногенная стафилокиназа, полученная с помощью технологии рекомбинантной ДНК с использованием штаммов *Escherichia coli*.

В отличие от нативной стафилокиназы в рекомбинантной молекуле стафилокиназы заменены 3 аминокислоты в иммунодоминантном эпитопе, что привело к отсутствию нейтрализующих антистафилокиназных антител при однократном введении и минимальному их образованию при повторном введении. Замена аминокислот в белке привела также к увеличению скорости образования комплекса плазминоген - рекомбинантная стафилокиназа по сравнению со скоростью образования комплекса плазминоген - нативная стафилокиназа и фибринселективности рекомбинантной стафилокиназы.

Специфическую активность субстанции рекомбинантного белка, содержащего аминокислотную последовательность стафилокиназы, выражают в виде удельной ферментативной активности, которая составляет от 121 900 до 182 100 МЕ/мг белка.

Субстанция предназначена для производства стерильных лекарственных форм для медицинского применения у больных с инфарктом миокарда.

ПРОИЗВОДСТВО

Субстанцию рекомбинантного белка, содержащего аминокислотную последовательность стафилокиназы *Staphylococcus aureus*, получают с помощью технологии рекомбинантной ДНК с применением генетически стабильных бактериальных штаммов *E. coli* (*E. coli MZ09*)или других генно-инженерных штаммов аналогичного назначения.

Технологический процесс производства субстанции рекомбинантной стафилокиназы осуществляют путем культивирования генно-инженерного штамма; отделения биомассы и дезинтеграции клеток; выделения рекомбинантного белка стафилокиназы с лидерным пептидом из шести гистидиновых остатков с последующими очисткой белка металлохелатной хроматографией, стерилизующей фильтрацией и лиофильной сушкой препарата.

Производственные штаммы. Производственные генно-инженерные штаммы должны быть депонированы в официальных коллекциях.

Производство субстанции должно осуществляться в соответствии с требованиями [правил надлежащей производственной практики](http://docs.cntd.ru/document/499029882) и контроля качества биотехнологических лекарственных препаратов и с соблюдением требований, указанных в ОФС «Биотехнологические лекарственные препараты» и ОФС «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК».

ИСПЫТАНИЯ

**Описание.** Белый аморфный порошок. Определение проводят визуальным методом.

**Подлинность.** Испытания проводят следующими методами: лизисом фибрина, электофорезом в ПААГ и иммуноблоттингом.

*Лизис фибрина.* Образование зон лизиса в фибриновом геле вследствие активации плазминогена (раздел «Специфическая активность»).

*Электрофорез в ПААГ.* Наличие основной окрашенной полосы белка с молекулярной массой от 15 до 16 кДа в сравнении с белками-маркерами (раздел «Чистота»). Испытания проводят методом электрофореза в ПААГ в соответствии с ОФС «Электрофорез в полиакриламидном геле».

*Иммуноблоттинг.* Испытуемая субстанция и рабочий стандартный образец (СО РБСФ) рекомбинантного белка, содержащего аминокислотную последовательность стафилокиназы, должны реагировать со специфическими антителами к стафилокиназе и их полосы должны иметь сравнимую подвижность и интенсивность.

Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение подлинности и чистоты иммунобиологических лекарственных препаратов методом вестерн-блот». В основе метода лежит перенос белка после проведения электрофореза в ПААГ на твердую подложку (нитроцеллюлозную мембрану), последующая обработка белковой полосы на мембране специфическими антителами и окраска связавшихся антител с помощью ферментативной цветной реакции.

Условия электрофореза, такие как концентрация полиакриламидных гелей, концентрация образцов и окраска геля отличаются от условий проведения электрофореза, описанных в разделе «Чистота».

*Раствор для разделяющего геля* готовят непосредственно перед заливкой: смешивают 2,3 мл акриламид : N,NI-метиленбисакриламид (29:1) раствор 30 % /раствор № 1/; 1,25 мл буферного раствора для разделяющего геля (Трис-HCl 1,5 M; pH 8,8) /раствор № 2/; 0,05 мл натрия додецилсульфата раствор 10 % /раствор № 4/; 1,4 мл воды бидистиллированной. К полученной смеси добавляют 6 мкл N,N,NI-тетраметилэтилендиамина (ТЕМЕД) и 16 мкл аммония персульфата раствор 10 % /раствор № 5/, перемешивают и выливают в пространство между стеклами в установке для заливки геля для полимеризации нижнего (разделяющего) геля так, чтобы высота раствора геля составила 5,3 см. Сверху осторожно наслаивают раствор № 6 для формирования ровной верхней границы разделяющего геля. Оставляют гель при (22 ± 2) оС на 1 ч (до полной полимеризации), после чего водный раствор сливают.

*Раствор для концентрирующего геля* готовят непосредственно перед заливкой: смешивают 0,27 мл акриламид : N,NI-метиленбисакриламид (29:1) раствор 30 % /раствор № 1/; 0,125 мл буферного раствора для концентрирующегогеля (Трис-HCl 2,0 M; pH 6,8) /раствор № 3/; 0,02 мл натрия додецилсульфата раствор 10 % /раствор № 4/; 1,59 мл воды бидистиллированной. К полученной смеси добавляют 4 мкл ТЕМЕД и 12 мкл аммония персульфата раствор 10 % /раствор № 5/, перемешивают и заливают сверху на разделяющий гель так, чтобы верхняя граница раствора формирующего геля находилась вровень с верхним краем более короткого стекла.

В концентрирующий гель вставляют тефлоновую гребёнку с зубцами соответствующего размера и оставляют гель при (22 ± 2) оС на 1 ч (до полной полимеризации). После окончания полимеризации стёкла с гелем аккуратно извлекают из заливочной рамки и устанавливают в электрофорезную камеру, в которую заливают рабочий буферный раствор для проведения электрофореза /раствор № 9/.

*Приготовление образцов для электрофореза*

*Образец А (испытуемый раствор):* К2 мкл раствора испытуемого образца (РИО) с концентрацией белка 1 мг/мл добавляют 98 мкл воды бидистиллированной и 100 мкл раствора для нанесения образцов на гель /раствор № 7/, перемешивают. Из полученной смеси отбирают 2 мкл и смешивают с 18 мкл разбавленного в 2 раза раствора для нанесения образцов на гель. В результате получают раствор, готовый для нанесения на гель, с концентрацией белка 1 мкг/мл.

*Образец Б (стандартный раствор)* готовят из2 мкл рабочего стандартного образца рекомбинантного белка, содержащего аминокислотную последовательность стафилокиназы (СО РБСФ, концентрация белка 1 мг/мл) /раствор № 10/ аналогично процедуре приготовления РИО. Получают стандартный раствор, готовый для нанесения на гель, с концентрацией белка 1 мкг/мл.

*Образец В (раствор маркеров молекулярного веса).* К 3 мкл препарата маркеров для электрофореза добавляют 7 мкл разбавленного в 2 раза раствора для нанесения образцов на гель.

*Проведение электрофореза*

Образцы А, Б и В выдерживают в кипящей водяной бане в течение 5 мин, центрифугируют при 10000 g в течение 1 мин, после чего отбирают по 10 мкл растворов образцов А, Б и В и наслаивают их, соответственно, во 2, 4 и 6 лунки концентрирующего геля. В остальные лунки вносят по 10 мкл разбавленного в 2 раза раствора для нанесения образцов на гель.

Электрофорез проводят в режиме стабилизации по току при Iconst = 20 mA. Электрофорез прекращают, когда краситель бромфеноловый синий достигнет нижнего края разделяющего геля.

*Подготовка и укладка нитроцеллюлозной мембраны для переноса белков*

Опускают 2 куска толстой фильтровальной бумаги, 2 пористые подложки и нитроцеллюлозную мембрану (9 х 7) см в охлажденный буфер для переноса /раствор № 11/.

Открытую кассету для фиксации геля помещают в плоский полипропиленовый поднос, в который налит слой буфера для переноса /раствор № 11/. На нее помещают пористую подложку, на подложку – смоченный буфером для переноса кусок толстой фильтровальной бумаги (на глубину не более 1 мм) без пузырьков воздуха.

Стекла с гелем извлекают из кассеты электрофорезной камеры, отрезают формирующий гель. Разделяющий гель переносят на подготовленную стопку из кассеты, подложки и фильтровальной бумаги. На гель помещают смоченную раствором № 11 нитроцеллюлозную мембрану (без пузырьков воздуха), на которую помещают смоченный раствором № 11 второй кусок толстой фильтровальной бумаги (без пузырьков воздуха). В последнюю очередь сверху помещают ещё одну пористую подложку, после чего кассету для фиксации геля закрывают.

*Перенос белков с геля на мембрану*

Кассету для фиксации геля устанавливают в камеру для переноса, помещённую в полипропиленовый контейнер, установленный на платформу магнитной мешалки. Кассету устанавливают в камеру таким образом, чтобы она располагалась между двумя платиновыми электродами, чтобы плоскость геля, нитроцеллюлозной мембраны и фильтровальной бумаги была бы перпендикулярна силовым линиям электростатического поля. Устанавливают охлаждающий элемент, полностью заполняют камеру раствором № 11, закрывают крышкой и включают магнитную мешалку (200 - 250 об/мин). Перенос белка из геля на мембрану проводят в режиме стабилизации напряжения при Uconst = 130 B при (20 ± 2) оС в течение 60 мин.

*Окраска мембраны и промывка*

Эффективность переноса белков из полиакриламидного геля на нитроцеллюлозную мембрану оценивают по окрашиванию полос маркеров красителем Понсо-С. Для этого нитроцеллюлозную мембрану помещают в контейнер с 50 мл раствора Понсо-С /раствор № 12/. Закрытый контейнер с красителем и мембраной устанавливают на качалку (55 об/мин) при (22 ± 2) оС на 5 мин, после чего раствор из контейнера сливают, добавляют в него несколько раз по 50 мл воды бидистиллированной с последующей выдержкой на качалке до полного удаления излишков красителя.

Отмытую мембрану фотографируют и отмечают на ней местоположение полос белковых маркеров.

*Отмывка мембраны от красителя Понсо-С*

Краситель Понсо-С отмывают с мембраны так, чтобы он не препятствовал в дальнейшем взаимодействию антител с белками. Для этого сливают воду из контейнера и добавляют в него несколько раз по 50 мл раствора № 16, инкубируя каждый раз мембрану с новой порцией раствора № 16 при постоянном перемешивании при 55 об/мин при (22 ± 2) оС в течение 5 мин с последующим сливом отмывочного раствора (до полной отмывки красителя и обесцвечивания полос).

*Инкубация мембраны, обработка антителами и отмывка от несвязавшихся антител*

Нитроцеллюлозную мембрану извлекают из контейнера и помещают в мешок из полиэтиленовой пленки, куда вносят 5 мл раствора № 17, после чего мешок запаивают со всех сторон так, чтобы в нем не осталось пузырьков воздуха и инкубируют при постоянном перемешивании (100 - 120 об/мин) при (22 ± 2) оС в течение 1 ч. После слива из мешка жидкости в него вносят 5 мл раствора первичных антител к стафилокиназе /раствор № 18/ и инкубируют мембрану в полиэтиленовом мешке при постоянном перемешивании (100 - 120 об/мин) при (22 ± 2) оС в течение 2 ч. После слива жидкости из мешка мембрану помещают в полипропиленовый контейнер, содержащий 50 мл раствора № 16. Мембрану отмывают от несвязавшихся антител, выдерживая её несколько раз в растворе № 16 при постоянном перемешивании при 55 об/мин при (22 ± 2) оС в течение 5 - 10 мин.

После отмывки мембрану переносят в полиэтиленовый мешок, куда добавляют 5 мл раствора вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена /раствор № 19/, после чего мешок запаивают со всех сторон так, чтобы в нем не осталось пузырьков воздуха и инкубируют при постоянном перемешивании (100 - 120 об/мин) при (22 ± 2) оС в течение 1 ч. Процедуру отмывки мембраны проводят, не допуская её пересыхания, как описано выше для отмывки мембраны от несвязавшихся первичных антител.

*Окрашивание полос на мембране*

После последней отмывки на поверхность мембраны наносят 5 мл раствора № 21 и инкубируют при (22 ± 2) оС, пока белковая полоса РБСФ не приобретет выраженную коричневую окраску (на фоне белого фильтра). После окрашивания мембрану помещают в воду бидистиллированную. Мембрану фотографируют во влажном виде, после чего её высушивают на поверхности фильтровальной бумаги при (22 ± 2) оС. Субстанция должна содержать только РБСФ.

Примечание (растворы №№ …)

1. Акриламид : N,NI-метиленбисакриламид (29:1) раствор 30 % фильтруют и хранят при (22 ± 2) оС не более 12 месяцев.
2. Буферный раствор для разделяющего геля (Трис-HCl 1,5 M; pH 8,8) фильтруют и хранят в стеклянной посуде при (4 ± 2) оС не более 12 месяцев.
3. Буферный раствор для концентрирующегогеля (Трис-HCl 2,0 M; pH 6,8) фильтруют и хранят в стеклянной посуде при (4 ± 2) оС не более 12 месяцев.
4. Натрия додецилсульфата раствор 10 % хранят в стеклянной посуде при (22 ± 2) оС не более 12 месяцев.
5. Аммония персульфата раствор 10 % готовят непосредственно перед проведением электрофореза и используют в тот же день.
6. Раствор № 6. В мерную колбу вместимосью 100 мл вносят 20 мл 96 % спирта, доводят водой бидистиллированной до метки и перемешивают. Хранят в стеклянной посуде при (22 ± 2) оС не более 12 месяцев.
7. Раствор для нанесения образцов. 4 мг красителя бромфеноловый синий вносят в полипропиленовую пробирку вместимостью 50 мл. Добавляют 2,38 мл воды бидистиллированной, 0,62 мл 2,0 M Трис-HCl (pH 6,8), 4 мл натрия додецилсульфата раствора 10 %, 1 мл β–меркаптоэтанола и 2 мл глицерина; перемешивают. Хранят при температуре минус (20 ± 2) оС не более 30 сут.
8. Буферный раствор концентрированный для проведения электрофореза и переноса. Глицина 144 г, трис(гидроксиметил) аминометана 30,5 г помещают в мерную колбу вместимостью 1 л, добавляют 800 мл воды бидистиллированной, перемешивают, контролируют рН (pH 8,3) и доводят до метки водой бидистиллированной. Раствор фильтруют и хранят в стеклянной посуде при (22 ± 2) оС не более 12 месяцев.
9. Рабочий буферный раствор для проведения электрофореза. В мерную колбу вместимостью 1 л вносят 100 мл буферного раствора концентрированного для проведения электрофореза (pH 8,3) /раствор № 8/, 10 мл натрия додецилсульфата раствора 10 % /раствор № 4/, доводят до метки водой бидистиллированной и перемешивают. Раствор готовят непосредственно перед проведением электрофореза. Хранению не подлежит.
10. Фосфатный буферный раствор (0,1 М, рН 7,6), содержащий 0,15 М натрия хлорида. Натрия дигидрофосфата дигидрата 3,9 г и натрия хлорида 2,195 г помещают в стеклянный стакан вместимостью 250 мл, добавляют 200 мл воды дистиллированной, растворяют и доводят рН с помощью натрия гидроксида раствора 40 % до значения 7,6. Переносят раствор в мерную колбу вместимостью 250 мл и доводят объем до метки водой. Раствор хранят при (4 ± 2) оС не более 3 сут.
11. Буферный раствор для переноса белков с геля на фильтр. В мерную колбу вместимостью 1 л вносят 100 мл буферного раствора концентрированного для проведения электрофореза (pH 8,3) /раствор № 8/, 150 мл 96 % этанола и доводят до метки водой бидистиллированной. Перед использованием раствор охлаждают до (4 ± 2) оС. Хранят при (4 ± 2) оС не более 1 месяца.
12. Раствор красителя Понсо-С с концентрацией 10 мг/мл. Навеску красителя Понсо-С 1 г вносят в мерную колбу вместимостью 100 мл и добавляют 50 мл воды бидистиллированной. Вносят 5 мл уксусной кислоты ледяной и доводят до метки водой бидистиллированной. Раствор фильтруют и хранят в стеклянной посуде при (4 ± 2) оС в течение 12 месяцев.
13. Буферный раствор 1 М Трис-HCl (pH 7,4). Раствор фильтруют и хранят в стеклянной посуде при (4 ± 2) оС не более 12 месяцев.
14. Натрия хлорида раствор 5 М. Раствор фильтруют и хранят в стеклянной посуде при (22 ± 2) оС в течение 5 лет.
15. Твин-20 раствор 10 %. Раствор хранят при (22 ± 2) оС не более 12 месяцев.
16. Раствор № 16. В мерную колбу вместимостью 1 л последовательно вносят 20 мл раствора № 13, 30 мл раствора № 14, 5 мл раствора № 15 и доводят объём до метки водой бидистиллированной. Раствор хранят в стеклянной посуде при (22 ± 2) оС не более 3 месяцев.
17. Раствор № 17. К навеске альбумина бычьего сывороточного (БСА) в количестве 210 мг добавляют 10,5 мл раствора № 16 и перемешивают до полного растворения альбумина. Раствор хранению не подлежит.
18. Раствор первичных антител. К 5 мл раствора № 17 добавляют 5 мкл раствора поликлональных антител кролика к стафилокиназе и перемешивают. Раствор хранению не подлежит.
19. Раствор вторичных антител. К навеске молока сухого в количестве 50 мг добавляют 5 мл раствора № 16 и перемешивают, добавляют 5 мкл раствора поликлональных антител козы к иммуноглобулинам G кролика, конъюгированных с пероксидазой хрена, и перемешивают. Раствор хранению не подлежит.
20. 3, 3I- диаминобензидина (ДАБ) раствор концентрированный. К навеске 100 мг добавляют 10 мл воды бидистиллированной и перемешивают, добавляют 3 – 5 капель хлористоводородной кислоты до полного растворения ДАБ. Раствор делят на порции для однократного применения и хранят при минус (20 ± 2) оС в течение 12 месяцев.
21. Раствор № 21. К 110 мкл раствора № 13 добавляют 5,09 мл воды бидистиллированной, 250 мкл раствора № 20, 50 мкл перекиси водорода раствора 3 % и перемешивают. Раствор хранению не подлежит.
22. Приготовление раствора СО РБСФ. Содержимое флакона со стандартным образцом (около 5 мг) растворяют в 5 мл фосфатного буферного раствора 0,1 М, рН 7,6, содержащего 0,15 М натрия хлорида, получая исходный раствор СО РБСФ с концентрацией белка около 1 мг/мл. Точную концентрацию РБСФ определяют спектрофотометрическим методом, как указано в разделе «Белок». Раствор хранят при температуре от минус 40 до минус 70 оС в течение 2 лет.
23. Приготовление раствора испытуемого образца (РИО). Содержимое флакона субстанции (около 5 мг) растворяют в 5 мл фосфатного буферного раствора 0,1 М, рН 7,6, содержащего 0,15 М натрия хлорида, получая РИО с концентрацией белка около 1 мг/мл. Раствор хранению не подлежит.

**Растворимость.** Субстанция легко растворима в 0,01 М растворе хлористоводородной кислоты и 0,01 М растворе натрия гидроксида, умеренно растворима в фосфатном буферном растворе (рН 7,6), практически не растворима в гексане и спирте 96 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Растворимость».

**Прозрачность раствора.** Должен быть прозрачным (0,1 % раствор субстанции в 0,01 М растворе хлористоводородной кислоты или в 0,01 М растворе натрия гидроксида, или в фосфатном буферном растворе (рН 7,6)). Определение проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

**Цветность раствора.** Должен быть бесцветным (0,1 % раствор субстанции в 0,01 М растворе хлористоводородной кислоты или в 0,01 М растворе натрия гидроксида, или в фосфатном буферном растворе (рН 7,6)). Определение проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

**Вода.** Не более 10 %. Около 0,4 г (точная навеска) субстанции титруют реактивом К. Фишера, конец титрования определяют потенциометрически. Испытание проводят по методу К. Фишера в соответствии с ОФС «Определение воды».

**Чистота.** Не менее 90 % рекомбинантного белка, содержащего аминокислотную последовательность стафилокиназы, в пересчёте на безводное вещество. Испытания проводят методом электрофореза в ПААГ в соответствии с ОФС «Электрофорез в полиакриламидном геле».

*Раствор для разделяющего геля* готовят непосредственно перед заливкой: смешивают 2,5 мл акриламид : N,NI-метиленбисакриламид (37,5:1) раствор 60 % /раствор № 1/; 2,5 мл буферного раствора для разделяющего геля (Трис-HCl 1,5 M; pH 8,8) /раствор № 2/; 0,1 мл натрия додецилсульфата раствор 10 % /раствор № 4/; 4,9 мл воды бидистиллированной. К полученной смеси добавляют 5 мкл ТЕМЕД и 50 мкл аммония персульфата раствор 10 % /раствор № 5/, перемешивают и выливают в пространство между стеклами в установке «для заливки геля» для полимеризации нижнего (разделяющего) геля так, чтобы высота раствора геля составила 5,3 см. Сверху наслаивают 0,4 мл воды бидистиллированной для формирования ровной верхней границы разделяющего геля. Оставляют гель на 1 ч до полной полимеризации при (22 ± 2) оС, после чего воду сливают.

*Раствор для концентрирующего геля* готовят непосредственно перед заливкой: смешивают 0,67 мл акриламид : N,NI-метиленбисакриламид (37,5:1) раствор 60 % /раствор № 1/; 2,5 мл буферного раствора для концентрирующегогеля (Трис-HCl 0,5 M; pH 6,8) /раствор № 3/; 0,1 мл натрия додецилсульфата раствор 10 % /раствор № 4/; 6,73 мл воды бидистиллированной. К полученной смеси добавляют 15 мкл ТЕМЕД и 75 мкл аммония персульфата раствор 10 % /раствор № 5/, перемешивают и заливают сверху на разделяющий гель так, чтобы верхняя граница раствора формирующего геля находилась вровень с верхним краем более короткого стекла.

В концентрирующий гель вставляют гребёнку с зубцами соответствующего размера и оставляют гель при (22 ± 2) оС на 1 ч (до полной полимеризации). После окончания полимеризации гребёнку из геля удаляют, из заливочной рамки извлекают стёкла с гелем и устанавливают в электрофорезную камеру, в которую заливают рабочий буферный раствор для проведения электрофореза /раствор № 9/.

*Приготовление образцов для электрофореза*

*Образец А (испытуемый раствор, РИО):* К20 мкл РИО с концентрацией белка 1 мг/мл добавляют 80 мкл воды бидистиллированной и 100 мкл раствора для нанесения образцов на гель /раствор № 7/, перемешивают. Получают раствор, готовый для нанесения на гель, с концентрацией белка 0,1 мг/мл (для нанесения на гель требуется 20 мкл).

*Образец Б (испытуемый раствор):* К40 мкл РИО /раствор № 13/ с концентрацией белка 1 мг/мл добавляют 60 мкл воды бидистиллированной и 100 мкл раствора для нанесения образцов на гель /раствор № 7/, перемешивают. Получают раствор, готовый для нанесения на гель, с концентрацией белка 0,2 мг/мл (для нанесения на гель требуется 20 мкл).

*Образец В (стандартный раствор):* К20 мкл РИО с концентрацией белка 1 мг/мл добавляют 80 мкл воды бидистиллированной и 100 мкл раствора для нанесения образцов на гель /раствор № 7/, перемешивают. Получают раствор, готовый для нанесения на гель, с концентрацией белка 0,1 мг/мл (для нанесения на гель требуется 20 мкл).

*Образец Г (раствор маркеров молекулярного веса).* К 3 мкл препарата маркеров для электрофореза, разведённого в 2 раза раствором для нанесения образцов на гель /раствор № 7/, добавляют 17 мкл разбавленного в 2 раза раствора для нанесения образцов на гель.

*Проведение электрофореза*

Образцы А, Б, В и Г выдерживают при (95 ± 5) оС в течение 5 мин, после чего по 20 мкл раствора каждого из образцов наслаивают в лунки концентрирующего геля. В контрольные лунки вносят по 10 мкл разбавленного в 2 раза раствора для нанесения образцов на гель.

Электрофорез проводят в режиме стабилизации по току при Iconst = 15 mA. Электрофорез прекращают, когда краситель бромфеноловый синий достигнет нижнего края разделяющего геля.

Гель извлекают из кассеты электрофорезной камеры и помещают в 200 мл уксусной кислоты раствор 10 % /раствор № 10/, предварительно налитого в подогреваемую металлическую емкость, доводят до кипения и кипятят в течение 5 мин. Затем гель переносят в подогреваемую металлическую емкость, содержащую 500 мл Кумасси раствор 0,1 % /раствор № 6/, доводят до кипения и инкубируют в слабо кипящем растворе Кумасси при (100 ± 2) оС в течение 30 мин. Затем гель переносят в подогреваемую металлическую емкость, содержащую 400 мл уксусной кислоты раствор 10 %, и доводят до кипения. После этого гель переносят в свежую порцию 400 мл этого же раствора. Процедуру повторяют несколько раз до тех пор, пока гель не станет бесцветным, а белковые полосы не приобретут ярко-синее окрашивание. Затем гель переносят в емкость с 200 мл воды бидистиллированной и выдерживают при (22 ± 2) оС в течение 10 мин.

Основная полоса при сравнении с белками-маркерами должна находиться в области 15,5 кДа.

После отмывки гель помещают в камеру трансиллюминатора для проведения сканирования и фотографирования геля.

Содержание РБСФ (*Х*) в субстанции вычисляют по формуле:

$Х=\frac{S\_{1}}{\sum\_{}^{}S\_{i}}∙100,$ (%), где

*S1* - площадь пика, соответствующего белковой полосе РБСФ;

$\sum\_{}^{}S\_{i}$- площади минорных пиков.

Содержание РБСФ не должно быть ниже 90 %.

Примечание. Приготовление растворов №№ 2, 4, 5, 12, 13 проводится, как описано в разделе «Подлинность» (Иммуноблоттинг).

1. Акриламид : N,NI-метиленбисакриламид (37,5:1) раствор 60 % фильтруют и хранят в темной стеклянной посуде при (22 ± 2) оС не более 12 месяцев.
2. Буферный раствор для разделяющего геля (Трис-HCl 1,5 M; pH 8,8).
3. Буферный раствор для концентрирующегогеля (Трис-HCl 0,5 M; pH 6,8) фильтруют и хранят в стеклянной посуде при (4 ± 2) оС не более 12 месяцев.
4. Натрия додецилсульфата раствор 10 %.
5. Аммония персульфата раствор 10 %.
6. Раствор № 6 (Кумасси раствор 0,1 %). В мерную колбу вместимостью 500 мл вносят Кумасси R-250 в количестве 0,5 г, добавляют около 400 мл воды бидистиллированной, затем добавляют 50 мл уксусной кислоты ледяной, перемешивают и доводят до метки водой бидистиллированной. Хранят в стеклянной посуде при (22 ± 2) оС не более 12 месяцев.
7. Раствор для нанесения образцов. Краситель бромфеноловый синий 5 мг вносят в полипропиленовую пробирку вместимостью 50 мл. Добавляют 1,75 мл воды бидистиллированной, 1,25 мл Трис-HCl 0,5 M (pH 6,8), 4 мл натрия додецилсульфата раствор 10 %, 1 мл β–меркаптоэтанола и 2 мл глицерина; перемешивают. Хранят при температуре минус (20 ± 2) оС не более 30 сут.
8. Буферный раствор концентрированный для проведения электрофореза. Глицина 72 г, натрия додецилсульфата 5,0 г, трис(гидроксиметил)аминометана 15,0 г помещают в мерную колбу вместимостью 1 л, добавляют 900 мл воды бидистиллированной, перемешивают, контролируют рН (pH 8,3) и доводят до метки водой бидистиллированной. Раствор фильтруют и хранят в стеклянной посуде при (22 ± 2) оС не более 12 месяцев.
9. Рабочий буферный раствор для проведения электрофореза. В мерную колбу вместимостью 1 л вносят 200 мл буферного раствора концентрированного для проведения электрофореза (pH 8,3) /раствор № 8/ и доводят до метки водой бидистиллированной. Раствор готовят непосредственно перед проведением электрофореза. Хранению не подлежит.
10. Приготовление уксусной кислоты раствор 10 % для фиксации и отмывки геля. В мерную колбу вместимостью 1 л вносят 100 мл уксусной кислоты ледяной и доводят до метки водой бидистиллированной. Раствор хранят в стеклянной посуде с притертой крышкой в вытяжном шкафу при (22 ± 2) оС не более 12 месяцев.
11. Приготовление хлористоводородной кислоты разведенной. Смешивают 100 мл хлористоводородной кислоты концентрированной и 200 мл воды бидистиллированнй. Раствор хранят в стеклянной посуде с притертой крышкой в вытяжном шкафу при (22 ± 2) оС не более 3 месяцев.
12. Приготовление раствора СО РБСФ (1 мг/мл).
13. Приготовление раствора испытуемого образца (РИО, 1 мг/мл).

**Посторонние примеси.** Не более 10 %. Содержание посторонних примесей (минорных белков) определяют методом электрофореза в ПААГ в соответствии с ОФС «Электрофорез в полиакриламидном геле» с последующим сканированием окрашенной электрофореграммы (раздел «Чистота»).

Содержание посторонних примесей (*Y*, %) рассчитывают по формуле:

$Y\_{i}=\frac{S\_{2}+… S\_{i}}{\sum\_{}^{}S\_{i}}∙100,$ где

*S1* – площадь пика, соответствующего белковой полосе РБСФ (15,5 кДа);

 *S2…I* – площади минорных пиков;

$\sum\_{}^{}S\_{i}$– сумма площадей всех пиков на хроматограмме испытуемого раствора.

На электрофореграмме испытуемого образца допускается наличие минорных белковых полос — в совокупности не более 10 % от общей интенсивности полос.

# Белок. От 4,5 до 5,5 мг/5 мл или от 0,9 до 1,1 мг/500 мл. Определение проводят спектрофотометрическим методом в соответствии с ОФС «Определение белка. Метод 1 (cпектрофотометрический)».

# *Приготовление разбавленного раствора исследуемого образца субстанции (РИОразб.).* Содержимое одного флакона субстанции растворяют в 5 мл 0,01 N раствора хлористоводородной кислоты или в 5 мл 0,1 М раствора фосфатного буферного, рН 7,6, содержащего 0,15 М натрия хлорида. Отбирают 1 мл полученного РИО и разводят водой для инъекций в 5 раз (*n*). Получают РИОразб., который используют свежеприготовленным.

# *Проведение анализа.* Концентрацию белка в РИОразб. определяют спектрофотометрическим методом при 280 нм (*D280*). В качестве раствора сравнения используют воду для инъекций.

# Концентрацию белка (*С*, мг/мл) рассчитывают по формуле:

$С=\frac{D\_{280}}{1,1∙ l} ,$ где

*D280* – оптическая плотность испытуемого образца при 280 нм;

*1,1* – коэффициент поглощения (соответствует оптической плотности раствора с концентрацией белка 1 мг/мл при толщине слоя, равной 1 см при длине волны 280 нм, мл/мг ∙ см);

*l* – толщина слоя кварцевой кюветы, см.

Содержание белка во флаконе (*X*, мг) рассчитывают по формуле:

*Х = C ∙ n ∙ V* , где

*V* – объём РИО, мл;

 *n –* разведение РИО.

**Специфическая активность.** Удельная ферментативная активность должна составлять от 121 900 до 182 100 МЕ/мг белка (расчетная величина).

Специфическую активность определяют по лизису фибрина и/или по амидолитической активности после активации плазминогена и образования эквимолярного комплекса с полученным плазмином.

1. *Определение активности по лизису фибрина*
	1. *Подготовка фибриновой пластины*

Смешивают 15 мл фибриногена человека раствор 0,4 % в фосфатном

буферном растворе 0,1 М, рН 7,6, и 15 мл агарозы раствор 2,0 %, термостатированных при (43 ± 1) оС, добавляют 0,3 мл раствора тромбина с активностью 20 ед.NIH/мл. Полученную смесь выливают в большую квадратную чашку Петри, установленную строго горизонтально, и оставляют при (22 ± 2) оС на 0,5 ч (для полимеризации фибрина). В застывшем геле вырезают лунки диаметром 2 – 3 мм на расстоянии друг от друга и от края геля не менее 15 мм таким образом, чтобы лунки располагались в несколько параллельных рядов (по 6 лунок в ряду).

Примечание. Допускается приготовление фибринового геля другими подходящими методами, в том числе без добавления агарозы.

* 1. *Приготовление разведений раствора СО РБСФ для построения калибровочного графика*

Для построения калибровочного графика из исходного раствора СО

РБСФ готовят рабочий раствор РСО № 1 с концентрацией белка 250 мкг/мл, используя для растворения БСА раствор 0,1 % в фосфатном буферном растворе 0,1 М, рН 7,6. Этот же буферный раствор с добавлением БСА используют для приготовления последующих разведений рабочего раствора РСО № 1.

* 1. *Приготовление испытуемых образцов*

Во флакон с 5 мг субстанции вносят 5 мл фосфатного буферного

раствора 0,1 М, рН 7,6, получая РИО с концентрацией белка примерно 1 мг/мл. Полученный исходный раствор разводят тем же буфером до концентрации белка 0,25 мг/мл. На данном этапе устанавливают точную концентрацию белка, как описано в разделе «Белок». С учетом полученных экспериментальных данных готовят все последующие разведения испытуемого образца с использованием БСА раствора 0,1 % в фосфатном буферном растворе 0,1 М, рН 7,6.

* 1. *Нанесение образцов на фибриновую пластину*

Подготовленные образцы РСО и РИО вносят в лунки фибриновой

пластины и оставляют примерно на 20 мин для диффузии образцов в гель, после чего выдерживают в суховоздушном термостате при (26 ± 1) оС в течение 16 – 20 ч.

Примечание. При использовании фибринового геля без агарозы после инкубации фибриновые пластины подсушивают при (22 ± 2) оС в течение 2 – 4 ч.

* 1. *Оценка результатов*

Если испытуемый образец проявляет фибринолитическую активность,

то вокруг лунки с образцом образуется зона лизиса фибрина, площадь которой прямо пропорциональна активности образца.

Зона лизиса фибрина представляет собой эллипс (или круг), площадь которого рассчитывают по формуле:

*Sэл. =* $π$ *∙ r1 ∙ r2* , где

*r1* – малый радиус, мм;

*r2* – большой радиус, мм.

Измеряют два взаимно перпендикулярных диаметра (малый и большой) каждой зоны лизиса с точностью до 0,25 мм и вычисляют площадь зон лизиса. Строят калибровочный график и/или таблицу зависимости величины площади зон лизиса (мм2) от активности СО РБСФ (МЕ/мл). Результаты интерполируют линейной функцией площади зон лизиса от активности СО РБСФ. Коэффициент корреляции должен быть $\geq 0,9.$

Аналогичным образом вычисляют площади зон лизиса испытуемых образцов, находят среднюю площадь для образцов с одинаковой концентрацией. С помощью калибровочного графика по вычисленной средней площади образца *РИОi* определяют активность этого образца (*АРИОi*, МЕ/мл) и рассчитывают удельную активность образца (*А РИО уд.i*, МЕ/мг) по формуле:

*А РИО уд.i = АРИОi /СРИОi* , где

*АРИОi* – ферментативная активность разведенного образца, определенная по калибровочному графику, МЕ/мл;

*СРИОi* – концентрация белка в разведенном образце, мг/мл.

Затем рассчитывают среднее значение удельной ферментативной активности испытуемого образца:

*А РИО уд. =* $\sum\_{}^{}А РИО уд.i$ */n*

Примечание (растворы №№ …)

1. Фосфатный буферный раствор (0,1 М, рН 7,6). Раствор хранят при (4 ± 2) оС не более 3 сут.
2. Бычьего сывороточного альбумина (БСА) раствор 0,1 % в фосфатном буферном растворе (0,1 М, рН 7,6). Раствор хранят при (4 ± 2) оС не более 4 недель.
3. Фибриноген человека раствор 0,4 %. Навеску фибриногена рассчитывают с учетом содержания общего и коагулируемого белка в фибриногене по формуле:

$m=\frac{4 ∙15 ∙100 ∙100}{w1∙ w2} ,$где

4 – концентрация коагулируемого белка, мг/мл;

15 – объём буферного раствора, мл;

$w1-$ содержание общего белка в фибриногене, %;

*w2* $-$ содержание коагулируемого белка, %.

К навеске фибриногена добавляют 15 мл фосфатного буферного

раствора 0,1 М, рН 7,6, помещают в водяную баню при (43 ± 1) оС и перемешивают до полного растворения. Раствор фибриногена хранению не подлежит.

1. Агарозы раствор 2 %. Навеску агарозы (0,3 г) суспендируют в 15 мл фосфатного буферного раствора 0,1 М, рН 7,6, содержащего 0,15 М натрия хлорида, нагревают на кипящей водяной бане до растворения агарозы и охлаждают до (43 ± 1) оС.
2. Раствор тромбина с концентрацией 20 ед.NIH/мл. Во флакон с тромбином вносят рассчитанный объём фосфатного буферного раствора 0,1 М, рН 7,6, и перемешивают до растворения тромбина. Объём буфера рассчитывают по формуле:

*Vбф = Eтр / 20 , где*

*Eтр*– активность тромбина (стандартная), ед.NIH;

20 – требуемая активность тромбина, ед.NIH/м.

Раствор тромбина хранят при температуре минус (20 ± 2) оС не более 2

месяцев.

1. Натрия едкого раствор 40 %. Раствор хранят в стеклянной посуде с притертой пробкой при (22 ± 2) оС не более 3 месяцев.
2. СО РБСФ раствор готовят, как описано в разделе «Подлинность» (Примечание п. 22).
3. *Определение амидолитической акивности РБСФ после активации*

*плазминогена*

Субстанция сама не обладает амидолитической (амидазной)

активностью, но при ее взаимодействии с гликозилированным плазминогеном (Glu-плазминогеном, ПГ) в эквимолярных количествах образуется сначала неактивный комплекс Плазминоген-Субстанция, который постепенно превращается в активный комплекс Плазмин(Пл)-Субстанция, способный расщеплять хромогенный амидный субстрат, освобождая при этом окрашенное соединение π-нитроанилин. По нарастанию интенсивности окраски раствора при 405 нм можно измерить кинетику реакции и рассчитать активность комплекса.

*2.1 Подготовка разведений СО РБСФ*

Рассчитывают молярную концентрацию белка (*См*) в исходном растворе СО РБСФ по формуле:

$См=\frac{С\_{0}}{15500}, мкМ ,$ где

*Со* – точная концентрация белка в растворе СО РБСФ, г/л;

15,5 – молярная масса РБСФ, кДа.

Из исходного раствора СО РБСФ готовят рабочий раствор – РСО РБСФ с концентрацией 5 мкМ. Для этого рассчитывают конечный объём РСО

(*Vрсо* , мл) и объём буферного раствора для разведения (*VA,* мл):

Конечный объём РСО рассчитывают из соотношения:

*См ∙ 0,5 = 5 ∙ Vрсо* , где

*Vрсо* - конечный объём рабочего раствора стандартного образца, мл;

0,5 – объём исходного раствора СО РБСФ, мл;

5 – конечная концентрация РСО РБСФ, мкМ.

Объём буферного раствора для разведения (*VA,* мл) рассчитывают по формулам:

 $Vрсо=\frac{С\_{м}}{10},$ где

 *Vрсо* = *Vрсо – 0,5*

Из рабочего раствора РСО РБСФ с концентрацией 5 мкМ готовят разведения для построения калибровочного графика, смешивая заданные объемы РСО и буфера А для получения конечных концентраций РСО: 4,0; 3,0; 2,0 и 1,5 мкМ.

*2.2 Подготовка разведений плазминогена*

Из исходного раствора Glu-плазминогена с концентрацией 5 мкМ (ПГ-5) готовят разведения, смешивая заданные объемы (ПГ-5) и буфера А для получения конечных концентраций плазминогена: 4,0; 3,0; 2,0 и 1,5 мкМ.

*2.3 Приготовление различных концентраций эквимолярного комплекса*

*плазмин-СО РБСФ (Пл-СО РБСФ)*

Смешивают равные объемы (по 300 мкл) разведений РСО РБСФ и ПГ одинаковой концентрации. Получают растворы с эквимолярными соотношениями ПГ-РБСФ, которые инкубируют при (37± 1) °C в течение 90 мин, затем помещают в лед (для остановки реакции). В результате получают следующие концентрации эквимолярного комплекса Пл-СО РБСФ: 2,5; 2,0; 1,5; 1,0 и 0,75 мкМ.

*2.4 Измерение амидолитической активности эквимолярных комплексов Плазмин-СО РКСФ*

В кювету спектрофотометра (1 мл, 1 см), содержащую 100 мкл раствора хромогенного субстрата и 850 мкл буферного раствора Б, вносят 50 мкл раствора эквимолярного комплекса Пл-СО РБСФ определенной концентрации и снимают кинетику гидролиза субстрата по образованию продукта π-нитроанилина при (25 ± 1) °C, измеряя оптическое поглощение при 405 нм через 10 с в течение 1 мин. Чтобы вычислить амидолитическую (амидазную) активность (*∆А405/мин*) для всех концентраций комплекса Пл-СО РБСФ, находят тангенс угла наклона начальных линейных участков кинетических кривых по формуле:

$$b=\frac{∆y}{∆x} или b=\frac{∆А\_{405}}{∆t} .$$

*2.5 Определение примеси плазмина в реактиве плазминогена по* *фоновому гидролизу хромогенного субстрата в отсутствии активатора* *(СО РБСФ)*

Из каждого разведения раствора плазминогена отбирают по 300 мкл, добавляют по 300 мкл буферного раствора А, получая при этом те же концентрации плазминогена, что при образовании комплексов с СО РБСФ. Пробы инкубируют при (37± 1) °C в течение 90 мин и затем помещают в сосуд со льдом. Отбирают по 50 мкл каждой пробы и измеряют скорость фонового гидролиза хромогенного субстрата (*∆А°405/мин*), как описано выше.

*2.6 Построение калибровочного графика зависимости амидолитичес-*

*кой активности от концентрации СО РБСФ в комплексе Пл-СО* *РБСФ*

Для каждой концентрации комплекса Пл-СО РБСФ вычисляют истинное значение амидолитической активности (*AKi*) по разности амидолитических активностей реакционных смесей с СО РБСФ (*∆А405/мин*)*i* и контрольных растворов без СО РБСФ (*∆А°405/мин*)*i* с теми же концентрациями плазминогена. Строят калибровочную зависимость амидолитической активности (*AKi*) от концентрации комплекса Пл-СО РБСФ (мкМ).

*2.7 Приготовление растворов испытуемой субстанции*

Содержимое флакона с испытуемой субстанцией (около 5 мг) растворяют в 5 мл фосфатного буферного раствора 0,1 М, рН 7,6, содержащего 0,15 М натрия хлорида (буфер Б). Получают исходный раствор испытуемого образца (ИО ФТП) с концентрацией белка около 1 мг/мл. Точную концентрацию *Сфтпо* (ИО ФТП) определяют спектрофотометрически, как описано в разделе «Белок».

Рассчитывают молярную концентрацию исходного раствора ИО ФТП (*См фтп*)так же, как и при приготовлении раствора СО РБСФ.

Из исходного раствора ИО готовят рабочий раствор - РИО ФТП с концентрацией 5 мкМ. Для этого рассчитывают конечный объем РИО и объем буфера А.

$Vрио=\frac{С\_{М фтп}}{10},$

 *VА* = *Vрио – 0,5;* где

*Vрио –* конечныйобъем рабочего раствора испытуемого образца, мл;

*VA* *–* объем буфера дли разведения (буфер А), мл;

*0,5* *–* объем исходного раствора ИО ФТП, мл;

*5* *–* конечная концентрация РИО ФТП, мкМ.

Смешивают 0,5 мл исходного раствора ИО субстанции и рассчитанный объем буфера А, получая РИО с концентрацией 5 мкМ. Из этого раствора с использованием буферного раствора А готовят разведения, соответствующие концентрации РИО: 4,0; 3,0; и 2,0 мкМ.

*2.8 Приготовление различных концентраций эквимолярного комплекса*

*Плазмин-Фортеплазе (Пл-ФТП)*

Смешивают равные объемы (по 300 мкл) разведений РИО и ПГ одинаковой концентрации, получая пробы с эквимолярными соотношениями Плазминоген-РИО. Пробы инкубируют при (37± 1) °C в течение 90 мин, затем помещают в лед. В результате получают следующие концентрации эквимолярного комплекса Пл-ФТП: 2,0; 1,5; и 1,0 мкМ.

*2.9 Измерение амидолитической активности эквимолярного комплекса Пл-ФТП и определение активности субстанции*

Измерение амидолитической активности различных концентраций комплекса Пл-ФТП проводят аналогично измерению амидолитической активности растворов комплекса Пл-СО РБСФ.

Получают средние значения амидолитических активностей для каждой из трех концентраций раствора комплекса Пл-ФТП (*∆А405/мин*). Вычитают среднее значение фонового гидролиза для этих же концентраций плазминогена (амидолитическуго активность контрольных растворов без СО РБСФ (*∆А°405/мин*)) *–* получают истинное значение амидазной активности комплексов Пл-ФТП (*АФi*).

По калибровочному графику зависимости амидазной активности комплекса Пл-СО РБСФ от концентрации СО РБСФ, входящего в комплекс, находят, какой концентрации СО РБСФ *(Ссо i)* соответст­вует каждое значение *АФi* комплекса Пл-ФТП и вычисляют удельную специфическую активность для каждого образца субстанции (*Аудi*, МЕ/мг) по формуле:

$Аудi=\frac{Ссо i ∙ 15500 ∙149000}{Срио i ∙ 15500} =\frac{Ссо i ∙ 149000}{Срио i} ,$где

*Ссо i -* концентрации СО РБСФ, мкМ;

*Срио i -* концентрация РИО ФТП в *i* комплексе Пл-ФТП, мкМ;

15500 - молярная масса Фортеплазе (ФТП), г/моль;

149000 - удельная активность СО РБСФ, МЕ/мг.

Затем вычисляют среднее значение удельной активности для всех образцов субстанции:

$А\_{рио уд}=\frac{А\_{уд1}+…+А\_{удi}}{n},$ где

*n* - количество образцов субстанции.

Примечание (растворы №№ …)

1. Динатрия гидрофосфата раствор 0,2 М. Раствор хранят при (4 ± 2) оС не более 7 сут.
2. Натрия дигидрофосфата раствор 0,2 М. Раствор хранят при (4 ± 2) оС не более 7 сут.
3. Na-фоcфатный буферный раствор 0,1 М, pH 7,6, содержащий 0,15 М натрия хлорида.
4. Na-фосфатный буферный раствор 0,1 М, pH 7,6, содержащий 0,15 М натрия хлорида и 20 %глицерин (буфер А).
5. Приготовление 5 мкМ раствора Glu-плазминогена (ПГ-5). Во флакон, содержащий 1 мг плазминогена, добавляют 2,174 мл буферного раствора А. Получают раствор плазминогена с концентрацией 0,46 мг/мл или 5 мкМ.
6. Приготовление раствора хромогенного субстрата. Во флакон, содержащий 25 мг субстрата, добавляют 5,68 мл воды дистиллированной. Получают исходный раствор субстрата с концентрацией 4,4 мг/мл (8 мМ, М.м. 551).
7. Приготовление раствора СО РБСФ. Содержимое флакона со стандартным образцом РБСФ (около 5 мг) растворяют в 5 мл 0,1 М фосфатного буферного раствора, pH 7,6, содержащего 0,15 М натрия хлорида (буфер Б). Получают исходный раствор СО РБСФ с концентрацией белка около 1 мг/мл. Определяют точную концентрацию РБСФ (*Со*) спектрофотометрически, как описано в разделе «Белок». Раствор хранят при температуре от минус 40 до минус 70 оС в течение 2 лет.

**Общая ферментативная активность**.Общая ферментативная активностьдолжна составлять:

- от 548 550 до 1 001 550 МЕ – во флаконе 5 мл или
 - от 109 710 000 до 200 310 000 МЕ – во флаконе 500 мл.

Общую ферментативную активность субстанции (*Аобщ*, МЕ/флакон) рассчитывают по формуле:

*Аобщ = Ауд ∙ Q,* где

*Ауд* – среднее значение удельной ферментативной активности субстанции (раздел «Специфическая активность»), МЕ/мг;

*Q* – среднее значение белка во флаконе, определенное для показателя «Белок» (раздел «Белок»), мг.

**Пирогенность.** Должна быть апирогенной. Тест-доза 0,133 мг субстанции в 0,5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида для инъекций на 1 кг массы тела кролика. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность».

**Аномальная токсичность.** Должна быть нетоксичной. Тест-доза 0,312 мг субстанции в 0,5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида для инъекций на одну мышь. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность».

**Стерильность.** Должна быть стерильной. Испытание проводят методом мембранной фильтрации в соответствии с ОФС «Стерильность». Образцы субстанции, предназначенные для контроля стерильности, растворяют в Na-фоcфатном буферном растворе 0,1 М, pH 7,6, до концентрации белка примерно 1 мг/мл.

**Остаточная ДНК штамма-продуцента.** Менее 1 ppm. Испытание проводят методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией в режиме реального времени или другим валидированным методом в соответствии с ОФС «Определение остаточной ДНК» и ОФС «Лекарственные средства, полученные методами рекомбинантных ДНК».

Осуществляют контроль только плазмидной ДНК штамма-продуцента, так как количество копий плазмидной ДНК на несколько порядков выше количества хромосомной ДНК. В качестве контрольной ДНК используют фрагмент, полученный амплификационным методом ПЦР ДНК штамма-продуцента. В качестве маркерного гена для проведения ПЦР выбирают ген стафилокиназы *SakXH Staphylococcus aureus*.

**Содержание иммунореактивных белков *E. coli*.** Не более 10 ppm (или 10 нг на мг субстанции). Определение проводят методом количественного твердофазного иммуноферментного анализа в соответствии с ОФС «Определение остаточных белков клетки-хозяина» и ОФС «Лекарственные средства, полученные методами рекомбинантных ДНК». Для проведения испытаний используют готовые наборы реагентов.

Приготовление раствора испытуемого образца проводят путем добавления к 5 мг субстанции 5 мл фоcфатного буферного раствора 0,1 М, pH 7,6, содержащего 0,15 М натрия хлорида. Получают раствор с концентрацией белка примерно 1 мг/мл, который разводят тем же буфером до концентрации белка 0,25 мг/мл, после чего определяют точную концентрацию белка, как описано в разделе «Белок».

**Хранение.** При температуре от 2 до 25 °С в сухом защищенном от света месте в соответствии с ОФС «Лекарственные средства, полученные методами рекомбинантных ДНК», ОФС «Фармацевтические субстанции», ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств» и ОФС «Хранение лекарственных средств».