Урокиназа, **лиофилизат ФС**

**для приготовления раствора**

**для** инфузий **Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на лекарственный препарат Урокиназа, лиофилизат для приготовления раствора для инфузий 10000 ME, 50000 ME, 100000 ME, 500000 ME.

Урокиназа является высокоочищенным протеолитическим ферментом, получаемым из культур клеток почек человека и человеческой урины, обладающий плазминогенной активностью, в состав которого в качестве активного центра входит аминокислота серин (синоним: сериновая протеаза), обладающая фибринолитическим действием. Представляет собой смесь фракций с молекулярной массой 33000 и более высокой молекулярной массой 54000, с преобладанием фракции с высокой молекулярной массой. Как прямой активатор плазминогена, фермент способен проникать в тромб и превращать в нем плазминоген в плазмин посредством гидролиза аргинин - валиновой связи. Плазмин разрушает фибрин, в результате чего происходит растворение тромба.

Важной отличительной особенностью фармакологического действия урокиназы является практическое отсутствие антигенных свойств и аллергической сенсибилизации, что особенно важно при повторных введениях препарата в больших дозах.

Активность урокиназы в препарате должна быть не менее 90 % и не более 111 % от заявленной активности.

В состав препарата входят вспомогательные вещества.

ПРОИЗВОДСТВО

Основными стадиями технологического процесса производства лекарственного препарата урокиназы лиофилизат для приготовления раствора для инфузий, являются: очистка и концентрирование фермента, стерилизация, лиофилизация, упаковка и маркировка готового препарата.

Препарат должен производиться в соответствии с требованиями [правил надлежащей производственной практики](http://docs.cntd.ru/document/499029882) и контроля качества лекарственных препаратов и соответствовать требованиям ОФС «Лекарственные средства для парентерального применения»

Все этапы процесса производства препарата должны быть валидированы, и должны гарантировать качество и безопасность его применения.

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

ИСПЫТАНИЯ

**Описание.** Белая лиофилизированная масса или порошок.

**Подлинность**

Урокиназа. Время полного лизиса тромба (сгустка) для плазмы человека и плазмы крупного рогатого скота должно быть не более 30 мин.

*Исходный испытуемый раствор с активностью урокиназы 5000 МЕ/мл.*

Содержимое одного флакона препарата с дозировкой 10000 ME растворяют в 2,0 мл, с дозировкой 50000 ME - в 10,0мл, с дозировкой 100000 ME – в 20,0 мл, с дозировкой 500000 ME - в 100,0 мл фосфатного буферного раствора pH 7,4

(активность урокиназы - 5000 МЕ/мл).

*Испытуемый раствор с активностью урокиназы 1000 МЕ/мл.*

К 1,0 мл исходного испытуемого раствора прибавляют 4 мл фосфатного буферного раствора pH 7,4 (активность урокиназы в растворе - 1000 МЕ/мл).

*Контрольный раствор.*

К 0,1 мл натрия хлорида раствора 0,9 % прибавляют 4 мл фосфатного буферного раствора pH 7,4.

Примечания

Плазма человека. Используют плазму человека для фракционирования ФС 42-0091-02 или плазму человека лиофильно высушенную. Во флакон с плазмой вносят 1,0 мл воды, во флакон с плазмой лиофильно высушенной - 5 мл воды, и растворяют содержимое при осторожном покачивании, избегая образования пены. Перед использованием полученный раствор выдерживают при температуре 25 °С в течение 20 мин.

Цитратная плазма крупного рогатого скота. Для использования в опыте флакон с плазмой размораживают на водяной бане или в термостате при температуре 37 °С. При наличии в оттаявшей плазме небольших сгустков ее процеживают через марлю.

Плазму хранят в замороженном состоянии при температуре от минус 10 °С до минус 20 °С во флаконах с крышкой, избегая ее оттаивания.

Раствор тромбина. Содержимое флакона с лиофилизированным порошком тромбина, выделенного из плазмы крови человека (500 NIH ЕД/флакон) растворяют в 25 мл фосфатного буферного раствора pH 7,4, получая раствор тромбина с активностью около 20 NIH ЕД/мл. (ед. NIH — единицы активности тромбина). Полученный раствор хранят в плотно укупоренной емкости при температуре от 4 °С до 8 °С, в течение - 7 дней.

Приготовление фосфатного буферного раствора с pH 7,4. 50 мл калия дигидрофосфата раствора 0,2 М и 39,5 мл натрия гидроксида раствора 0,2 М помещают в мерную колбу вместимостью 200 мл, прибавляют 50 мл воды и перемешивают. В случае необходимости, используя ортофосфорной кислоты раствор или натрия гидроксида раствор 0,2 М, устанавливают pH раствора равным 7,4 (потенциометрически). Доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Хранят в плотно укупоренном емкости при температуре от 4 °С до 8 °С. в течение - 7 дней.

Методика

Для определения используют две пробирки для гемолиза, в одну пробирку вносят 0,5 мл плазмы человека, в другую - 0,5 мл цитратной плазмы крупного рогатого скота. Пробирки помещают в водяной термостат при температуре 37 °С. Через 5 мин к содержимому каждой пробирки прибавляют 0,1 мл испытуемого раствора и 0,1 мл раствора тромбина. После добавления раствора тромбина пробирки аккуратно встряхивают, одновременно включают секундомер.

Параллельно проводят контрольный опыт, используя в аналогичных условиях вместо испытуемого раствора 0,1 мл натрия хлорида раствора 0,9 %.

Приблизительно через 1 мин после прибавления раствора тромбина в обеих пробирках с плазмой человека и цитратной плазмой крупного рогатого скота наблюдается образование сгустка, который должен полностью раствориться не более чем за 30 мин.

В контрольном опыте сгусток не должен растворяться в течение не менее 60 мин.

Альбумин. На иммуноэлектрофореграмме испытуемого раствора должна обнаруживаться линия преципитации, по локализации соответствующая линии преципитации альбумина на иммуноэлектрофореграмме раствора сравнения. Определение проводят методом иммуноэлектрофореза в агаровом геле с использованием боратного буферного раствора в соответствии с ОФС «Иммуноэлектрофорез в агаровом геле» или другим подходящим валидированным методом.

*Испытуемый раствор:*

Дозировки 10000 ME, 50000 ME, 100000 ME: содержимое флакона с препаратом растворяют в 2,0 мл воды (концентрация альбумина - около 5,0 мг/мл).

Дозировка 500000 ME: содержимое флакона с препаратом растворяют в 10 мл воды (концентрация альбумина - около 5,0 мг/мл).

Растворы хранят в плотно укупоренной емкости при температуре от 4 °С до 8 °С, в течение – 2- х дней.

*Контрольный образец (раствор сравнения).*

В качестве контрольного образца для приготовления растворов сравнения используют: - стандартную нормальную сыворотку крови человека;

 - поливалентную сыворотку против сывороточных белков крови человека

*Раствор сравнения*.

2,0 мл стандартной нормальной сыворотки крови человека помещают во флакон вместимостью 2,5 мл, прибавляют 0,1 мл раствора маркера альбумина и перемешивают (без интенсивного встряхивания). Раствор хранят в плотно укупоренной емкости при температуре от 4 °С до 8 °С, в течение – 2- х дней.

 При использовании поливалентной сыворотки против сывороточных белков крови человека (лиофилизат во флаконе), содержимое флакона растворяют в 2 мл воды для инъекций.

**Время растворения.** Время растворения не более 2 мин.

Испытание проводят на одном флаконе с препаратом.

К содержимому каждого флакона с помощью шприца прибавляют по 2,0 мл воды для препарата с дозировками 10000 ME, 50000 ME и 100000 ME, или 10,0 мл для препарата с дозировкой 500000 ME.

Включают секундомер и растворяют препарат, аккуратно вращая флакон. Отмечают время полного растворения препарата.

Примечание

Раствор препарата, приготовленный при проведении данного теста, восстановленный раствор, может быть использован для проведения испытаний по другим показателям: «Прозрачность», «Цветность», «рН», «Механические включения».

**Прозрачность.** Раствор препарата должен быть прозрачным или интенсивность опалесценции раствора не должна превышать интенсивности опалесценции эталона I. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

Цветность. Восстановленный раствор препарата желтого или зеленовато-желтого цвета должен выдерживать сравнение с эталоном цветности Y6 или GY6.

Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Степень окраски жидкостей» метод 2.

Допускается использовать для проведения испытания раствор препарата, полученный при определении времени растворения.

**рН.**  от 6,5 до 7,5. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с требованиями ОФС «Ионометрия».

Механические включения. Видимые частицы. Препарат должен соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

Невидимые частицы.

Содержание невидимых частиц должно составлять:

* размером > 10 мкм - не более 6000/флакон,
* размером > 25 мкм - не более 600/флакон.

Определение проводят счетно ­ фотометрическим методом в соответствии с требованиями ОФС «Невидимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения».

Потеря в массе при высушивании. Не более 3,0 %. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Потеря в массе при высушивании». Способ 3.

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

# Пирогенность. Должен быть апирогенным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность». Содержимое одного флакона препарата с дозировкой 10000 ME растворяют в 0,5 мл, с дозировкой 50000 ME - в 2,5 мл, с дозировкой 100000 ME – в 5 мл, с дозировкой 500000 ME - в 25 мл натрия хлорида раствора 0,9 % для инъекций. Испытуемый лекарственный препарат в количестве 1 мл на 1 кг массы кролика, подогретый до температуры 37 °С, вводят в ушную вену в течение 2 мин.

# Аномальная токсичность. Должен быть нетоксичным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Испытания проводят на морских свинках обоего пола с массой тела 250 – 300 г или на мышах. При проведении исследования на морских свинках двум животным внутрибрюшинно вводят по 5 мл восстановленного раствора препарата (тест-доза). Наблюдения за животными осуществляют в течение 7 суток.

# Для проведения испытания на мышах готовят раствор препарата с концентрацией 5000 МЕ/мл, используя содержимое 2 флаконов.

Тест-доза: 0,5 мл вводят в хвостовую вену мыши.Срок наблюдения 48 час.

 **Вирусная безопасность.**

Поверхностный Антиген вируса гепатита В (HBsAg)

# Должен отсутствовать. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест - систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения Российской Федерации, либо другим валидированным методом. Чувствительность тест - системы должна быть не более 0,2 МЕ/мл. Определение проводят в соответствии ОФС «Метод иммуноферментного анализа»

Испытуемый раствор. Готовят раствор препарата с концентрацией 33000 МЕ/мл, используя для этого содержимое одного флакона с препаратом (дозировки 50000 ME, 100000 ME, 500000 ME) или четырех флаконов (дозировка 10000 ME).

Антитела к ВИЧ-1 и ВИЧ-2

Антитела к вирусам иммунодефицита человека (ВИЧ-1, ВИЧ-2) должны отсутствовать.

Определение проводят в соответствии ОФС «Метод иммуноферментного анализа» либо другим валидированным методом.

Приготовление испытуемого раствора описано в разделе «Поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg)».

Антитела к вирусу гепатита С.

Антитела к вирусу гепатита С должны отсутствовать.

Исследования проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения Российской Федерации и имеющих 100 % чувствительность и специфичность, в соответствии с инструкциями по применению.

Определение проводят в соответствии ОФС «Метод иммуноферментного анализа» либо другим валидированным методом.

Приготовление испытуемого раствора описано в разделе «Поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg)».

Тромбопластические компоненты.

Предельная концентрация препарата, обладающая нулевой коагулирующей активностью, должна быть не менее 150 МЕ/мл.

*Испытуемый раствор с активностью урокиназы - 5000 МЕ/мл.*

Содержимое одного флакона препарата с дозировкой 10000 ME растворяют в 2,0 мл барбитал - буферного раствора с pH 7,4.

Содержимое одного флакона препарата с дозировкой 50000 ME растворяют в 10,0 мл барбитал - буферного раствора с pH 7,4.

Содержимое одного флакона препарата с дозировкой 100000 ME растворяют в 20,0 мл барбитал - буферного раствора с pH 7,4.

Содержимое одного флакона препарата с дозировкой 500000 ME растворяют в 100,0 мл барбитал - буферного раствора с pH 7,4.

*Испытуемый раствор с активностью урокиназы 2500 МЕ/мл.*

В пробирку для гемолиза с внутренним диаметром 1 см вносят 1,0 мл испытуемого раствора с активностью *урокиназы - 5000 МЕ/мл*, добавляют 1,0 мл барбитал - буферного раствора с pH 7,4 и перемешивают.

*Испытуемый раствор с активностью урокиназы 1250 МЕ/мл.*

В пробирку для гемолиза с внутренним диаметром 1 см вносят 1,0 мл испытуемого раствора с активностью *урокиназы - 2500 МЕ/мл*, добавляют 1,0 мл барбитал - буферного раствора с pH 7,4 и перемешивают.

*Испытуемый раствор с активностью урокиназы 625 МЕ/мл.*

В пробирку для гемолиза с внутренним диаметром 1 см вносят 1,0 мл испытуемого раствора с активностью *урокиназы - 1250 МЕ/мл*, добавляют 1,0 мл барбитал - буферного раствора с pH 7,4 и перемешивают.

*Испытуемый раствор с активностью урокиназы 312 МЕ/мл.*

В пробирку для гемолиза с внутренним диаметром 1 см вносят 1,0 мл испытуемого раствора с активностью *урокиназы - 625 МЕ/мл*, добавляют 1,0 мл барбитал - буферного раствора с pH 7,4 и перемешивают.

Методика

Готовят серию разведений испытуемого препарата в барбитал - буферном растворе с pH 7,4, получая растворы с содержанием урокиназы, соответствующей активности - 5000 МЕ/мл, 2500 МЕ/мл, 1250 МЕ/мл, 625 МЕ/мл и 312 МЕ/мл.

В штатив устанавливают шесть тщательно вымытых и высушенных пробирок для гемолиза с внутренним диаметром 1 см. Пронумеровывают пробирки от 1 до 6. Затем в пробирки вносят последовательно плазму, испытуемые растворы и барбитал - буферный раствор с pH 7,4 в количествах, указанных в прилагаемой таблице-схеме (табл 1).

Таблица 1. Схема распределения растворов в пробирках

|  |  |
| --- | --- |
| Испытуемый раствор в мл | Номер пробирки |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Плазма, мл | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| Раствор с активностью урокиназы 5000 МЕ/мл | 0,1 | - | - | - | - | - |
| Раствор с активностью урокиназы 2500 МЕ/мл. | - | 0,1 | - | - | - | - |
| Раствор с активностью урокиназы 1250 МЕ/мл. | - | - | 0,1 | - | - | - |
| Раствор с активностью урокиназы 625 МЕ/мл. | - | - | - | 0,1 | - | - |
| Раствор с активностью урокиназы 312 МЕ/мл. | - | - | - | - | 0,1 | - |
| Барбитал - буферный раствор с pH 7,4, мл | - | - | - | - | - | 0,1 |

Далее пробирки инкубируют при температуре (25,0 ± 0,5) °С в течение 5 мин, затем прибавляют по 0,1 мл кальция хлорида раствора 3,675 %, содержимое каждой пробирки осторожно перемешивают легким встряхиванием, одновременно включают секундомер. При проведении испытания рекомендуется использовать секундомер, позволяющий фиксировать промежуточные интер­валы времени (до 6 интервалов). Измеряют время свертывания плазмы в каждой пробирке.

Используя метод наименьших квадратов, строят график зависимости сокра­щения времени свертывания (ось ординат; ΔТ, мин) от десятичного логарифма концентрации препарата в испытуемом растворе (ось абсцисс; lgС, ME урокиназной активности в мл). Находят коэффициенты линейного уравнения, описывающего эту зависимость в виде ΔT=a·lgС + b.

Сокращение времени свертывания для каждого испытуемого раствора (ΔTi) вычисляют по формуле:

# (ΔTi)=T0 - Ti

# где: T0 -время свертывания плазмы в пробирке № 6 (холостой опыт), мин;

Ti  - время свертывания плазмы в пробирке с i-м испытуемым раствором, мин.

Точка пересечения полученного графика с осью абсцисс соответствует пре­дельной концентрации препарата (Спр), обладающей нулевой коагулирующей активностью.

Величину Спр в ME урокиназной активности в одном миллилитре вычисляют по формуле:

Спр = $10^{\frac{-b}{a}}$

где**:** b - численное значение свободного члена линейного уравнения, описы­вающего график зависимости сокращения времени свертывания от десятичного логарифма концентрации препарата в испытуемом растворе;

а - численное значение углового коэффициента линейного уравнения, опи­сывающего график зависимости сокращения времени свертывания от деся­тичного логарифма концентрации препарата в испытуемом растворе. Предельная концентрация препарата, обладающая нулевой коагулирующей активностью, должна быть не менее 150 МЕ/мл.

Примечания

Приготовление плазмы. С помощью стерильного пластикового шприца с иглой № 1, содержащего натрия цитрата раствор 3,8 %, проводят забор крови из сердца кролика, предварительно голодавшего в течение 12 ч. Конечное соотношение объемов крови и натрия цитрата раствора должно составлять 9:1. Кровь осторожно смешивают с раствором натрия цитрата, вращая шприц, и как можно быстрее центрифугируют при центробежном ускорении 1500-1800 g и температуре от 15 °С до 20 °С в течение 30 мин. Плазму хранят при температуре от 0 °С до 6 °С в течение -4 ч.

Приготовление натрия цитрата раствора 3,8 %. 3,8 г натрия цитрата помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 90 мл воды и перемешивают до полного растворения. Доводят объем раствора водой до метки и вновь перемешивают. Раствор хранят в плотно укупоренной емкости при температуре от 4 °С до 8 °С в течение - 7 дней.

Приготовление раствора кальция хлорида. 3,675 г кальция хлорида обезвоженного помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 90 мл воды и перемешивают. Доводят объем раствора водой до метки и вновь перемешивают. Хранят в плотно укупоренной емкости при температуре от 4 °С до 8 °С в течение - 7 дней.

Альбумин. - 10000 ME: от 9,0 до 11,0 мг/флакон

 - 50000 ME: от 9,0 до 11,0 мг/флакон

 - 100000 ME: от 9,0 до 11,0 мг/флакон

 - 500000 ME: от 45,0 до 55,0 мг/флакон

Испытания проводят методом эксклюзионной высокоэффективной хроматографии в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография».

*Подвижная фаза.* Буферный раствор, содержащий динатрия гидрофосфата 0,0312 М, натрия дигидрофосфата 0,0098 М, натрия хлорида 0,2 М и натрия азида 0,005 %.

В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 4,873 г динатрия гидрофосфата дигидрата, 1,741 г натрия дигидрофосфата дигидрата, 11,688 г натрия хлорида и 50 мг натрия азида. Прибавляют 950 мл воды очищенной и перемешивают до полного растворения навесок солей. Доводят объем раствора водой до метки и вновь перемешивают. Перед использованием подвижную фазу фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм и дегазируют любым подходящим способом. Хранят в плотно укупоренной емкости при комнатной температуре в течение - 7 дней.

*Испытуемый раствор.*

 Дозировки 10000 ME, 50000 ME, 100000 ME: содержимое флакона с препаратом растворяют в 2,0 мл воды (концентрация альбумина человека сывороточного - около 5,0 мг/мл).

 Дозировка 500000 ME: содержимое флакона с препаратом растворяют в 10,0 мл воды (концентрация *альбумина человека сывороточного* - около 5,0 мг/мл). Хранят в плотно укупоренной емкости при температуре от 4 °С до 8 °С в течение – 3-х дней.

*Калибровочный раствор альбумина человека сывороточный.*

5,0 мл стандартного альбумина человека раствора сывороточного 20 % помещают в мерную колбу вместимостью 200 мл. Объем раствора доводят водой до метки и перемешивают (концентрация альбумина человека сывороточного – около 5 мг/мл).

Раствор хранят в плотно укупоренной емкости при температуре от 4 °С до 8 °С в течение - 3 дней.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 600 x 7,5 мм, заполненная сорбентом с привитыми диольными группами, диаметр частиц 10 мкм, размер пор 250 Å, диапазон разделяемых молекулярных масс от 10000 до 500000. |
| Температура колонки | 20 °С. |
| Температура пробы | от 2 до 8 ° С |
| Скоростью потока | 0,6 мл/мин. |
| Детектор | Спектрофотометрический, 280 нм |
| Объем пробы | 50 мкл |
| Время хроматографирования | 75 мин. |
| Ожидаемые времена удерживания пиков: | - Полимеры альбумина - все пики с временем удерживания меньше времени удерживания пика димера альбумина,- Димер альбумина - около 29,9 мин.- Мономер альбумина - около 34,9 мин.- Урокиназа - широкий пик в области от 40 мин до 55 мин. |

Перед началом определения хроматографическую колонку промывают подвижной фазой до формирования стабильной базовой линии.

*Проверка пригодности хроматографической системы.* В колонку хроматографа вводят 50 мкл калибровочного раствора. Получают не менее 3 хроматограмм. Относительное стандартное отклонение суммы площадей пиков полимеров, димера и мономера альбумина человека сывороточного на повторных хроматограммах калибровочного раствора должно быть не более 1,5 %.

Проверка линейности хроматографического сигнала. В колонку хроматографа вводят 50 мкл раствора для проверки линейности хроматографического сигнала. Получают не менее 2 хроматограмм. Вычисляют открываемость (Z) человеческого сывороточного альбумина в процентах по формуле:

# Z = $\frac{S\_{плxc} ∙5∙P∙200∙100∙100}{S\_{кл }∙200∙100∙5∙P∙10}∙100=\frac{S\_{плxc}∙1000}{S\_{кл}},$

где: Sплхс - среднее значение суммы площадей пиков полимеров, димера и мономера альбумина человека сывороточного в серии хроматограмм раствора для проверки линейности хроматографического сигнала;

Sкл - среднее значение суммы площадей пиков полимеров, димера и мономера альбумина человека сывороточного в серии хроматограмм калибровочного раствора;

Р - содержание альбумина человека сывороточного в стандартном растворе альбумина человека сывороточного, проценты.

Рассчитанное значение Z должно быть не менее 95,0 % и не более 105,0 %.

Методика

В колонку хроматографа вводят 50 мкл испытуемого раствора. Получают не менее 2 хроматограмм.

Содержание альбумина человека сывороточного в препарате (X), в мг в одном флаконе, вычисляют по формуле:

Х = $\frac{S\_{исп}}{S\_{кл}}∙\frac{I∙5}{200}∙\frac{V}{1}$

где: $S\_{исп}$ - среднее значение суммы площадей пиков полимеров, димера и мономера альбумина человеческого сывороточного в серии хроматограмм испытуемого раствора;

$S\_{кл}$ - среднее значение суммы площадей пиков полимеров, димера и мономера альбумина человеческого сывороточного в серии хроматограмм калибровочного раствора;

1. - содержание альбумина человеческого сывороточного в стандартном растворе альбумина человеческого сывороточного (мг/мл);

5- объем альбумина стандартного раствора 20 %, использованного для приготовления калибровочного раствора, мл;

200 - объем калибровочного раствора, мл;

V - объем испытуемого раствора (равен 2 мл - для препарата с дозировками 10000 ME, 50000 ME, 100000 ME, 10 мл - для препаратов с дозировкой 500000 ME).

Содержание альбумина человека сывороточного в одном флаконе препарата с дозировками 10000 ME, 50000 ME, 100000 ME должно быть не менее 9,0 мг и не более 11,0 мг.

Содержание альбумина человека сывороточного в одном флаконе препарата с дозировкой 500000 ME должно быть не менее 45,0 мг и не более 55,0 мг

Типичные хроматограммы калибровочного и испытуемого растворов представлены на рисунках.

# C:\Users\FEDORO~1\AppData\Local\Temp\FineReader11\media\image3.jpegРисунок 1. Типичная хроматограмма калибровочного раствора.

# Идентификация пиков:

* полимеры альбумина - 22,086 мин и 25,328 мин,
* димер альбумина - 29,903 мин,
* мономер альбумина - 34,903 мин.

# image3

Рисунок 2. Типичная хроматограмма испытуемого раствора.

Идентификация пиков:

* полимеры альбумина - 22,193 мин и 27,190 мин,
* димер альбумина - 30,187 мин,
* мономер альбумина - 34,910 мин,
* урокиназа - 45,508 мин.

Примечание

* Приготовление раствора для проверки линейности хроматографического сигнала. 10,0 мл калибровочного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл. Объем раствора доводят водой до метки и перемешивают (концентрация альбумина человека сывороточного - около 0,5 мг/мл).
* Раствор используют свежеприготовленным.

Биологическая активность. от 90 до 111 % от заявленной активности.

Активность урокиназы в препарате определяют на основании ее способности преобразования плазминогена в плазмин в сравнении с аналогичной способностью стандартного образца урокиназы, откалиброванного в международных единицах (ME). Формирование плазмина определяют измерением времени до полного лизиса фибринового сгустка в условиях опыта.

За 1 ME активности урокиназы принимают активность определенного коли­чества Международного стандарта урокиназы (IRS). Активность IRS в ME аттестована Всемирной Организацией Здравоохранения (ВОЗ).

*Основной испытуемый раствор.* Содержимое одного флакона с препаратом независимо от заявленной активности растворяют в 10,0 мл альбумина раствор 3 %. Для препарата с дозировкой 10000 ME в качестве основного испытуемого раствора используют полученный раствор.

Для других дозировок препарата 1,0 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 5 мл, 10 мл или 50 мл (для заявленной активности урокиназы 50000 ME, 100000 ME или 500000 ME соответственно). Доводят объем раствора альбумина раствором 3 % до метки и перемешивают (концентрация урокиназы - 1000 МЕ/мл). Растворы хранят в плотно укупоренной емкости при температуре от 4 °С до 8 °С в течение 4 - 5 ч.

*Испытуемые растворы.*

*Испытуемый раствор И1* - концентрация урокиназы - 100 МЕ/мл.

2,5 мл основного испытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл. Доводят объем раствора альбумина раствором 3 % до метки и перемешивают

*Испытуемый раствор И2* - концентрация урокиназы - 66,667 МЕ/мл.

К 2,0 мл испытуемого раствора И1 прибавляют 1,0 мл альбумина раствора 3 %.

*Испытуемый раствор И3* - концентрация урокиназы - 44,444 МЕ/мл).

К 2,0 мл испытуемого раствора И2 прибавляют 1,0 мл альбумина раствора 3 %.

Растворы хранят в плотно укупоренной емкости при температуре от 4 °С до 8 °С в течение 4 - 5 ч.

*Основной стандартный раствор урокиназы*

Используя мерные пипетки, содержимое флакона стандарта урокиназы (IRS) растворяют в альбуминарастворе 3 % с таким расчетом, чтобы получить раствор с активностью 1000 МЕ/мл. Растворы хранят в плотно укупоренной емкости при температуре от 4 °С до 8 °С в течение 4 - 5 ч.

 *Стандартные растворы урокиназы.*

 Стандартный раствор С1, - концентрация урокиназы - 100 МЕ/мл.

2,5 мл основного стандартного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл. Доводят объем раствора альбумина раствором 3 % до метки и перемешивают.

 стандартный раствор С2;, концентрация урокиназы - 66,667 МЕ/мл).

К 2,0 мл стандартного раствора С1 прибавляют 1,0 мл альбумина раствора 3 %.

стандартный раствор *С3*; концентрация урокиназы - 44,444 МЕ/мл).

К 2,0 мл стандартного раствора С2 прибавляют 1,0 мл альбумина раствора 3 %.

Стандартные растворы приготовлены правильно, если время начала лизиса сгустка для раствора С1 не менее 3 мин, а для раствора С*з* - не более 20 мин. В противном случае корректируют аликвоту основного стандартного раствора урокиназы, взятую для приготовления стандартного раствора С1.

Растворы хранят в плотно укупоренной емкости при температуре от 4 °С до 8 °С в течение 4 - 5 ч.

Примечания

Приготовление буферного раствора с pH 7,4. 13,48 г динатрия гидрофосфата и 7,6 г натрия хлорида помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, прибавляют 900 мл воды, перемешивают. С помощью хлористоводородной кислоты раствора 1 М устанавливают pH полученного раствора равным (7,40 ± 0,05) (потенциометрически). Доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Раствор хранят в плотно укупоренной емкости при температуре от 4 °С до 8 °С в течение -5 сут.

 Приготовление альбумина раствора 3 %. 3.0 г альбумина сывороточного крупного рогатого скота помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 90 мл буферного раствора с pH 7,4. Перемешивают. Доводят объем раствора буферным раствором с pH 7,4 до метки и перемешивают.

Раствор хранят в плотно укупоренной емкости при температуре от 4 °С до 8 °С в течение 4-5 ч.

Приготовление раствора тромбина

Содержимое флакона тромбина лиофилизированного порошка растворяют в необходимом количестве альбумина раствора 3 %, получая тромбина раствор с активностью около 20 NIH ЕД/мл. Полученный раствор хранят в плотно укупоренной емкости при температуре от 4 °С до 8 °С в течение 4-5 ч.

 Приготовление фибриногена раствора бычьего. 0,10 г фибриногена бычьего помещают в мерную колбу вместимостью 20 мл, прибавляют 15 мл натрия хлорида раствора 0,9 %. Содержимое колбы перемешивают до полного растворения навески. Доводят объем раствора натрия хлорида раствором 0,9 % до метки и перемешивают.

Раствор хранят в плотно укупоренной емкости при температуре от 4 °С до 8 °С в течение 4-5 ч.

Методика

В штатив устанавливают шесть рядов пробирок с внутренним диаметром 5 мм по четыре пробирки в каждом ряду. Пробирки с первого ряда по третий маркируют символом «Сij», где «С» обозначает, что пробирка содержит пробу стандартного раствора урокиназы; индекс «i» указывает на номер стандартного раствора урокиназы и принимает значения от 1 до 3; индекс «j» соответствует номеру параллельного определения и принимает значения от 1 до 4. Пробирки с четвертого ряда по шестой маркируют символом «Иij», где «И» обозначает, что пробирка содержит испытуемый раствор; индекс «i» указывает на номер испытуемого раствора и принимает значения от 1 до 3; индекс «j» соответствует номеру параллельного определения и принимает значения от 1 до 4.

Пробирки помещают на водяную баню со льдом. В каждую пробирку вносят 0,2 мл соответствующего разведения стандартного или испытуемого образца, 0,2 мл буферного раствора с pH 7,4 и 0,1 мл тромбина человеческого раствора.

После этого пробирки переносят на водяную баню и инкубируют при темпе­ратуре 37,0 °С. Через 2 мин, используя автоматическую пипетку, на дно первой пробирки (пробирка с символом «Сij») вносят 0,5 мл фибриногена бычьего раствора, перемешивают содержимое пробирки, и оставляют на водяной бане. Последовательно, с интервалом в 15 с, аналогичным образом вносят по 0,5 мл фибриногена бычьего раствора в оставшиеся пробирки.

С помощью секундомера для каждой пробирки измеряют промежуток времени в с. от момента внесения фибриногена бычьего раствора до момента полного лизиса сгустка.

Активность препарата рассчитывают методом параллельных линий в соот­ветствии с ОФС. «Статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологическими методами». При построении графика используют зависимость времени полного лизиса сгустка от концентрации урокиназы, выраженной в единицах активности.

Активность урокиназы в препарате должна быть не менее 90 % и не более 111 % от заявленной активности. Границы доверительного интервала (Р=0,95) должны находиться в пределах от 80 % до 125 %.

# Транспортирование и хранение. В сухом, защищенном от света месте при температуре не выше 25 °С. В соответствии с ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».