**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

**Дезоксирибонуклеиновая ФС**

**кислота плазмидная**

**[сверхскрученная кольцевая**

**двуцепочечная],**

**субстанция – раствор**

***Acidum Desoxyribonucleinicum***

***Plasmidum substantia – solutio* Вводится впервые**

 Настоящая фармакопейная статья распространяется на генотерапевтическое лекарственное средство – дезоксирибонуклеиновая кислота плазмидная [сверхскрученная кольцевая двуцепочечная], субстанция – раствор, получаемое в результате непрерывного производственного цикла биосинтезом в клетках *Еscherichia coli* (штамм ТОР 10/рСMV-VEGF 165), в состав которого в качестве активного вещества входит сверхскрученная плазмидная ДНК рСMV-VEGF 165, 4853 пар оснований (дезоксирибонуклеиновая кислота плазмидная) 1 г, а также вспомогательные вещества.

 Рекомбинантная плазмидная ДНК состоит из фрагмента регуляторного участка (22 нуклеотидных пар), который определяет транскрипцию гена, мини-гена VEGF, при экспрессии которого синтезируется изоформа VEGF, состоящая из 165 аминокислот, сигнала сплайсинга, сигнала полиаденилирования и терминатора транскрипции SV40, обеспечивающие синтез зрелой РНК гена и вспомогательных областей, необходимых для эффективного биосинтеза плазмидной ДНК в клетках штамма-продуцента *Е. coli.*является высокоочищенной сверхскрученной формой плазмиды pCMV-VEGF165, которая кодирует фактор роста эндотелия сосудов (Vascular endothelial growth factor, VEGF) под управлением промотора – контролирующего участка дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). Рекомбинантная плазмидная ДНК включает в состав следующие компоненты: фрагмент регуляторного участка (22 нуклеотидные пары), обусловливающий транскрипцию гена, миниген VEGF, на фоне протекания экспрессии которого продуцируется содержащая 165 аминокислот изоформа VEGF, терминатор транскрипции SV40, сигнал сплайсинга, сигнал полиаденилирования, обеспечивающие выработку зрелой рибонуклеиновой кислоты (РНК) гена и вспомогательных областей, требуемые для эффективного процесса биосинтеза плазмидной ДНК, происходящего в клетках штамма-продуцента *Escherichia coli*.

 Субстанция содержит ***человеческий ген VEGF 165*** в форме сверхскрученной плазмиды высокой степени очистки, кодирующий процесс синтеза фактора роста сосудистого эндотелия под контролем управляющего участка ***ДНК.*** В основе такого механизма действия - ***терапевтического ангиогенеза*** лежит использование запрограммированного процесса образования и роста сосудов.

 ***Рекомбинантная ДНК*** включает большое число компонентов. При проникновении внутрь клеток человека молекул такой плазмиды начинается процесс выработки ***VEGF***, который стимулирует клетки эндотелия, что в свою очередь, приводит к ***васкуляризации*** (росту кровеносных сосудов) в области введения. Клетки эндотелия принимают участие в презентации ***антигенов***, вазоконстрикции и вазодилатации, а также являются важнейшими элементами кровеносных сосудов (артерий, вен, капилляров). Активизация ***рецепторов VEGF*** 1 и 2 типа позволяет вовлечь в процесс ***ангиогенеза*** различные внутриклеточные рецепторные сигнальные каскады.

 Субстанция должна соответствовать требованиям ОФС «Генотерапевтические лекарственные препараты» и ОФС «Требования к клеточным культурам-субстратам производства биологических лекарственных препаратов». Раздел Молекулярно-генетические методы идентификации клеточных культур.

 **Описание.** Стеклообразная или белая твердая масса. При размораживании – бесцветная прозрачная жидкость.

 **Подлинность**

*Секвенирование кодирующего участка*

 Последовательность всех нуклеотидов кодирующего участка должна совпадать с указанной в описании методики.

 Субстанция является подлинной, если в кодирующей области обнаружено соответствие всех нуклеотидов эталонной последовательности. Допускается наличие не более 2-х нераспознанных нуклеотидов в каждой из цепей ДНК, если комплементарные им нуклеотиды распознаны и соответствуют эталонной последовательности.

 Для проведения секвенирования используют готовые наборы растворов олигонуклеотидов, с концентрацией 3,2 мкМ согласно нижеприведенного списка, по 1 мкл на реакцию терминации.

|  |  |
| --- | --- |
| Наименование олигонуклеотида |  Последовательность |
| ASQF2 | 5'- CGCAAATGGGCGGTAGGGGTG-3' |
| ASQF3 | 5'- GAGGAGTCCAACATCACCAT - 3' |
| ASQR1 | 5'- CGGFTCTGACGGTTCACTA - 3' |
| ASQR2 | 5'- TGGCCTTGGTGAGGTTTGAT - 3' |

 Проводят получение фрагментов одноцепочечных ДНК, меченых флюоресцентными красителями и терминированных дидеоксинуклеотидами c помощью готового набора для капиллярного анализатора.

 Для проведения испытаний в 6 полипропиленовых пробирок вносят по 0,3 мкг ДНК в испытуемом образце, по 1 мкл каждого из олигонуклеотидов, по 8 мкл реагента Terminator Ready Reaction Mix из состава готового набора и 10,7 мкл стерильной воды для проведения ПЦР. Полученную смесь перемешивают на лабораторном смесителе, сбрасывают капли со стенок в микроцентрифуге в течение 5 с со скоростью не менее 5 тыс. об/мин.

НЕ ДОПУСКАЕТСЯ самостоятельное приготовление реагента. Реагент хранят в составе набора при температуре минус 20° С. Использование реагента после окончания срока годности набора, хранящегося вне коробки набора или перенесенного из одной коробки набора в другую НЕ ДОПУСКАЕТСЯ.

 Подготовленные пробы помещают в гнезда ДМК-амплификатора и проводят амплификацию фрагментов по следующей программе:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Шаг программы | Температура º С | Время инкубации, сек | Количество повторностей |
| 1 | 96 | 60 | 1 |
| 2 | 96 | 10 | 25 |
| 3 | 50 | 5 | 25 |
| 4 | 60 | 240 | 25 |
| 5 | 4 | 600 | 1 |

Программу выполняют в следующей последовательности: шаг 1; 25 повторений шагов 2,3,4; шаг 5.

 Получают электрофореграммы фрагментов терминированных цепей ДНК на капиллярном анализаторе, оснащенном каппилярами POP-7 polymer. 38-cni или аналогичным, для этого переносят по 5 мкл полученных фрагментов в гнезда микропланшета прибора и запускают программу выполнения электрофоретического разделения фрагментов, используя модули команд, входящие в штатный набор модулей команд программного обеспечения прибора. Электрофорез и регистрацию результатов проводят в автоматическом режиме работы прибора, вмешательство оператора в ход электрофореза и регистрации результатов НЕ ДОПУСКАЕТСЯ.

Проводят построение сборки (comig) для всех результатов секвенирования испытуемого образца при помощи программного обеспечения прибора.

Проводят сравнение полученной последовательности нуклеотидов

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 601 | CAACTCCGCC | CCATTGACGC | AAATGGGCGG | TAGGCGTGTA | CGGTGGGAGG |
| 651 | TCTATATAAG | CAGAGCTGGT | TTAGTGAACC | GTCAGATCCG | CTAGTGGATC |
| 701 | CAAAGAATTC | GGGCCTCCGA | AACCATGAAC | TTTCTGCTGT | CTTGGGTGCA |
| 751 | TTGGAGCCTT | GCCTTGCTGC | ТСТАССТССА | CCATGCCAAG | TGGTCCCAGG |
| 801 | CTGCACCCAT | GGCAGAAGGA | GGAGGGCAGA | ATCATCACGA | AGTGGTGAAG |
| 851 | TTCATGGATG | TCTATCAGCG | CAGCTACTGC | CATCCAATCG | AGACCCTGGT |
| 901 | GGACATCTTC | CAGGAGTACC | CTGATGAGAT | CGAGTACATC | TTCAAGCCAT |
| 951 | CCTGTGTGCC | CCTGATGCGA | TGCGGGGGCT | GCTGCAATGA | CGAGGGCCTG |
| 1001 | GAGTGTGTGC | CCACTGAGGA | GTCCAACATC | ACCATGCAGA | TTATGCGGAT |
| 1051 | САААСС'ГСАС | CAAGGCCAGC | ACATAGGAGA | GATGAGCTTC | CTACAGCACA |
| 1101 | ACAAATGTGA | ATGCAGACCA | AAGAAAGATA | GAGCAAGACA | AGAAAATCCC |
| 1151 | TGTGGGCCTT | GCTCAGAGCG | GAGAAAGCAT | TTGTTTGTAC | AAGATCCGCA |
| 1201 | GACGTGTAAA | TGTTCCTGCA | AAAACACAGA | CTCGCGTTGC | AAGGCGAGGC |
| 1251 | AGCTTGAGTT | AAACGAACGT | ACTTGCAGAT | GTGACAAGCC | GAGGCGGTGA |
| 1301 | CCCGGGTGGG | GTACCAGGTA | AGTGTACCCA | ATTCGCCCTA | TAGTGAGTCG |
| 1351 | ТАТТАСААТТ | CACTGGCCGT | CGTTTTACAA | CGTCGTGACT | GGGAAAACCC |

Подчеркиванием обозначен кодирующий (анализируемый) участок, фланкирующие последовательности приведены для удобства сравнения последовательностей.

 **Прозрачность.** Должна быть прозрачной или не превышать эталон сравнения 1. Определение проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

**Цветность**. Должна быть бесцветной или не превышать эталон сравнения В9.

**рН.** От 7,4 до 8,2. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

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

**Родственные соединения.** Не более 5 %.Определение проводят методом ионнообменной ВЭЖХ в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография».

Ионообменная хроматография ДНК основана на адсорбции молекул ДНК на неподвижной фазе, содержащей привитые группы четвертичного аммония и десорбции ДНК при элюции возрастающим градиентом концентрации натрия хлорида. Вследствие увеличения плотности отрицательного заряда на поверхности сверхскрученной кольцевой ДНК ее элюция происходит при большей ионной силе, чем элюция релаксированного кольцевого или линейного варианта.

Для проведения анализа используют аналитический градиентный жидкостный хроматограф высокого давления, оснащенный ручным или автоматическим инжектором, позволяющим вводить пробы объемом 20 мкл, термостатом колонок, спектрофотометрическим детектором, позволяющим вести детекцию при длине волны 260 им и системой обработки данных. Допускается использование детектора с фиксированной длиной волны 254 нм, при этом порядок проведения анализа и расчета результатов не изменяется.

Условия хроматографии

Хроматографическая колонка: 5 х 50 мм, анионообменная высокого разрешения с размером зерен 9 мкм;

Температура колонки: 40 ºС;

Детекция: при длине волны 260 нм;

Скорость потока: 0,5 мл/мин;

Объем вводимых проб: 20 мкл;

Предельное давление в системе 40 атм.

 Разделение проводят по следующей программе градиента:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Время, мин | Раствор А, % | Раствор В, % | Режим элюции |
| 0 -4 | 100 | 0 | Изократический |
| 4-44 | 100 -40 | 0 -60 | Линейныйградиент |
| 44-48 | 40 -0 | 60 -100 | Линейныйградиент |
| 48-50 | 0 | 100 | Изократический |
| 50-52 | 0 -100 | 100 – 0 | Линейныйградиент |
| 52-54 | 100 | 0 | Изократический |

*Проверка пригодности хроматографической системы*

 Хроматографическую систему промывают попеременно раствором А в течение не менее 10 мин, раствором В в течение не менее 10 мин, раствором А в течение не менее 10 мин.

 Определяют время удерживания основного пика соответствующий сверхскрученной форме плазмидной ДНК ( Тсс), мин.

Вычисляют фактор асимметрии основного пика (Т) по формуле:

 Т = W005 / 2а;

 где: W0,05 - ширина пика на высоте 5 % от базовой линии, мин;

 а - расстояние от фронта пика до перпендикуляра, проведенного из максимума пика до базовой линии, мин.

 Вычисляют коэффициент разрешения (R) между основным пиком и вторым по величине пиком, соответствующим релаксированной форме плазмиды по формуле:

 R = 2 ( t2-t,)/(W1+ W2)

где: t и t2 - время удерживания двух пиков, последовательно расположенных на хроматограмме раствора для испытания пригодности, мин;

 W, и W2 - ширина пиков на уровне базовой линии.

*Система считается пригодной, если выполняются следующие условия*

Тсс – время удерживания основного пика в интервале 35-45 мин;

Т – фактор ассиметрии основного пика - не более 2,0;

R- разрешение между основным пиком и вторым по величине до базовой линии не менее 1,2.

 При необходимости добиваются выполнения требований на пригодность хроматографической системы изменением соотношения основных компонентов буферных растворов.

 В хроматографическую систему вводят разведенный СО (1:40). Ввод СО повторяют до получения сходимости результатов. Далее последовательно вводят СО (1:20) и (1:10) до получения сходимости результатов. Затем вводят разведенный раствор испытуемого образца (1:20). Проводят интегрирование пиков хроматограмм с помощью программного обеспечения к прибору.

 Для вычисления результатов трех разведений СО анализа строят калибровочный график зависимости площадей основных пиков от количества основного вещества с помощью программного обеспечения к прибору.

 Измеряют площадь основного пика на хроматограмме раствора испытуемого образца в разведении 1:20, измеряют площади всех пиков, кроме основного на хроматограмме неразведенного испытуемого образца. Вычисляют концентрацию основного вещества по площади основного пика па хроматограмме разведения 1:20 испытуемого образца при помощи построенной калибровочной кривой.

Вычисляют долю родственных соединений (С), в процентах, по формуле:

С = 100 % · (V,+V2+...+V„) / (Vn·20+V,+V2+...+Vn),

 Где: V|...Vn - площади всех детектированных пиков, кроме основного, на хроматограмме неразведенного испытуемого образца;

V0 - площадь основного пика на хроматограмме испытуемого образца в разведении 1:20;

20 - коэффициент пересчета, соответствует разведению;

 Приготовление буферного раствора А. В мерный стакан вместимостью I л помещают 6,05 г трис (гидроксиметил) аминометана, 23,4 г натрия хлорида, 0,2 г натрия азида, добавляют 900 мл воды очищенной, доводят 38 % раствором хлористоводородной кислоты до рН = 8,0, доводят общий объем раствора до I л, перемешивают и фильтруют через фильтр 0,45 мкм. Раствор хранят при комнатной температуре в течение 2 недель. Перед использованием раствор дегазируют под вакуумом.

 Приготовление буферного раствора В. В мерный стакан вместимостью 1000 мл помещают 6,05 г трис(гидроксиметил) аминометана, 58,4 г натрия хлорида, 0,2 г азида натрия, добавляют 900 мл воды очищенной, доводят 38 % раствором хлористоводородной кислоты до рН = 8,0, доводят общий объем раствора до I л, перемешивают и фильтруют через фильтр 0,45 мкм. Раствор хранят при комнатной температуре в течение 2 недель. Перед использованием раствор дегазируют под вакуумом.

 Приготовление раствора стандартного образца. В лиофилизованный стандартный образец КАМБИОГЕНПЛАЗМИД, содержащий 100 мкг лиофилизованной сверхскрученной ДНК вносят 0,1 мл воды очищенной, перемешивают на лабораторном смесителе типа «Vortex», выдерживают 30 мин при комнатной температуре, а затем повторно перемешивают на лабораторном смесителе. Раствор хранят при температуре от 2 до 8 ºС в течение 3 сут.

 Приготовление разведений раствора стандарта. В полипропиленовую пробирку типа Эппендорф вносят 50 мкл раствора стандартного образца, добавляют 450 мкл воды очищенной и перемешивают на лабораторном смесителе типа «Vortex» (разведение стандарта в полученном растворе 1:10). В две полипропиленовые пробирки типа Эппеидорф вносят по 100 мкл воды очищенной. Переносят в первую пробирку 100 мкл разведенного раствора стандарта, перемешивают пипетированием (разведение раствора 1:20). Переносят 100 мкл из разведенного раствора 1:20 во вторую пробирку и перемешивают пипетированием (разведение полученного раствора 1:40). Растворы используют в день приготовления.

 Приготовление раствора для испытания пригодности хроматографической системы. 50 мкл раствора стандартного образца переносят в полипропиленовую пробирку тина Эппендорф, добавляют 5 мкл I М раствора хлористоводородной кислоты, перемешивают, выдерживают 1 ч при комнатной температуре, добавляют 5 мкл 1 М раствора натрия гидроксида и перемешивают. Содержание релаксированной формы плазмиды в полученном растворе должно составлять не менее 5 %.

**Геномная ДНК штамма-продуцента**

Доля геномной ДНК не должна превышать 1 %. Определение проводят методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР – РВ) в соответствии с ОФС « Полимеразная цепная реакция».

Проводят приготовление стандартных растворов геномной ДНК Е.coli ТОР10, содержащих по 1 мкг лиофилизованной ДНК, вносят 100 мкл воды для инъекций, перемешивают на лабараторном смесителе, выдерживают 10 мин при температуре от 15 до 25 ºС и вновь перемешивают в течение 5 сек на скорости не менее 5000 об/мин (пробирка № 1). В следующие 4 пробирки вместимостью 0,5 мл вносят по 90 мкл воды для инъекций и готовят десятикратные разведения стандарта геномной ДНК по следующей схеме:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Номер пробирки | Объем перенесенного раствора из предыдущей пробирки, мкл | Концентрация геномной ДНК |
|  | - | 10 нг/мкл |
|  | 10 | 1 нг/мкл |
|  | 10 | 100 пг/мкл |
|  | 10 | 10 пг/мкл |
|  | 10 | 1 пг/мкл |

Для приготовления раствора для проверки ингибирования ПЦР, в полипропиленовую пробирку типа Эппеидорф вместимостью 500 мкл вносят 9 мкл испытуемого образца и 1 мкл исходного раствора стандарта геномной ДНК (пробирка № 1, концентрация 10 нг/мкл) и перемешивают, как указано выше. Раствор должен храниться на льду и использоваться в течение 3-х час с момента приготовления.

Для приготовления раствора для проведения ПЦР-РВ в полипропиленовую пробирку типа Эппеидорф вместимостью 1,5 мл вносят 20 ЕД нативной Taq - полимеразы, 100 мкл ⨳буферного раствора для проведения ПЦР, входящего в состав набора Taq-полимеразы, 30 мкл раствора праймерных олигонуклеотидов («Евроген» Россия, растворы с концентрацией 10 мкМ каждого или аналогичных, последовательности олигонуклеотидов указаны в примечании), 1 мкл раствора подходящего флюоресцентного красителя и доводят общий объем стерильной водой для проведения ПЦР до 1 мл.

⨳Самостоятельное приготовление буферного раствора или использование буферного раствора не из состава набора Taq-полимеразы НЕ ДОПУСКАЕТСЯ.

 Допускается проведение ПЦР-РВ со специфическим олигонуклеотидом-зондом вместо флюоресцентного красителя, концентрация олигонуклеотида-зонда в реакционной смеси 100 нМ, последовательность олигонуклеотида-зонда указана в примечании.

 Раствор перемешивают, как указано выше и переносят по 49 мкл в 16 полипропиленовых пробирок типа Эппеидорф вместимостью 0.5 мл с оптически прозрачными крышками. Пробирки немедленно закрывают.

 Готовят пробы для анализа, для этого в подготовленные пробирки с готовой смесью для проведения ПЦР вносят по 1 мкл соответствующих разведений стандарта геномной ДНК, 1 мкл раствора испытуемого образца, 1 мкл раствора для проверки ингибирования ПЦР и 1 мкл стерильной воды для проведения ПЦР. Пробы готовят в двух повторностях, перемешивают, как указано выше и помещают в гнезда ДНК-амплификатора для ПЦР-РВ. Проводят амплификацию согласно следующей программе:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  Шаг программы | Температура, ºС | Время инкубации, сек | Количество повторений (циклов) |
| 1 | 95 | 600 | 1 |
| 2 | 95 | 15 | 36 |
| 3 | 60 | 60 | 36 |

 При выполнении амплификации проводят детекцию интенсивности флюоресценции в реальном масштабе времени при помощи программного обеспечения ДНК -амплификатора.

 **Результата анализа**: Проводят расчет порогового цикла для всех проб при помощи программного обеспечения ДНК- амплификатора. Строят калибровочный график зависимости порогового цикла от концентрации геномной ДНК в пробах калибратора при помощи программного обеспечения ДНК-амплификатора. Проводят проверку пригодности системы, для этого рассчитывают коэффициент корреляции для линейной функции калибровочного графика при помощи программного обеспечения ДНК-амилификатора.

 Система считается пригодной, если коэффициент корреляции не менее 0,9 .

 Проводят проверку ингибирования реакции ПЦР, для этого вычисляют среднее значение концентрации геномной ДНК в пробах испытуемого образца и пробах контроля ингибирования ПЦР по калибровочному графику при помощи программного обеспечения ДНК-амплификатора. Разница в концентрации геномной ДНК в пробах должна составлять 1.0±0,2 пг/мкл. При обнаружении ингибирования ПЦР материалом испытуемого образна повторяют анализ для разведения испытуемого образца 1:10.

Вычисляют концентрацию геномной ДНК (Сg) в испытуемом образце в мкг/мкл по калибровочному графику при помощи программного обеспечения ДНК-амплификатора и далее вычисляют долю геномной ДНК E.coli (Х) в испытуемом образце в процентах по формуле:

 X = 100 % $∙ $Сg / Со,

 где: Сg - концентрация геномной ДНК, мкг/мл;

 Со – концентрация основного вещества, г/л.

 \*Для пипетирования жидкостей без примесей ДНК (олигонуклеотиды, растворитель, вода) необходимо иметь отдельный комплект микродозаторов, не используемых при подготовке или работах с ДНК-содержащими препаратами. При подготовке смесей для проведения ПЦР каждую пробирку открывают только перед отбором или внесением проб, а по окончании работы сразу же закрывают.

 Запрещается открывать одновременно несколько микропробирок с

пробами и оставлять их открытыми на длительное время.

 Праймериые олигонуклеотиды для ПЦР-РВ, комплементарные участку гена 23S рРНК: RT23SF - 5'-GAAAGGCGCGCGATACAG-3’ и RT23SR - 5'- GTCCCGCCCTАCТСATCGА А-3'

 Олигонуклеотид-зонд, комплементарный амплифицируемому участку гена 23S рРНК - RT23SP -

6FAM-5'-CCCCGTACACAAAAATGCACATGCTG-3' -6BHQ-l.

**Рибонуклеиновая кислота.** Доля РНК должна быть не более 1 %.

Определение проводится методом флюоресцентного анализа.

Исчерпывающий гидролиз РНК. В восемь полипропиленовых пробирок типа Эппендорф вместимостью 0,5 мл вносят по 43 мкл раствора испытуемого образца. В 4 пробирки добавляют по 5 мкл раствора стандарта РНК (стандартный образец вещества-свидетеля, код TRN-01. замороженный раствор (100мкг/мл), в две из них вносят по 2 мкл раствора ⨳рибонуклеазы А, (концентрация I мг/мл). В две оставшиеся пробирки - по 2 мкл воды для инъекций. В две из оставшихся пробирок вносят по 2 мкл рибонуклсазы А и по 5 мкл воды для инъекций, в последние 2 пробирки - по 7 мкл воды для инъекций. Содержимое пробирок перемешивают па лабораторном смесителе типа «Vortex», и центрифугируют в микроцентрифуге в течение 5 со скоростью не менее 5000 об/мин. Пробирки инкубируют 30-60 мин при температуре 37 ±1 º С.

\*Самостоятельное приготовление раствора фермента и инактивация остаточной ДНКазы НЕ ДОПУСКАЕТСЯ).

Схема заполнения пробирок:

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Номер пробирки | Раствор испытуемого образца, мкл | Раствор стандарта РНК, мкл | Раствор рибониуклеазы, мкл | Вода для инъекций, мкл |
| 1 | 43 | 5 | 2 | 0 |
| 2 | 43 | 5 | 2 | 0 |
| 3 | 43 | 5 | 0 | 2 |
| 4 | 43 | 5 | 0 | 2 |
| 5 | 43 | 0 | 2 | 5 |
| 6 | 43 | 0 | 2 | 5 |
| 7 | 43 | 0 | 0 | 7 |
| 8 | 43 | 0 | 0 | 7 |

 Готовят раствор для флюоресцентной детекции РНК из компонентов готового набора. Для этого в полипропиленовую пробирку тина Эппеидорф вносят 10 мкл раствора флюоресцентного красителя Quant-i'l™ RNA Reagent из состава набора, 1990 мкл раствора Quant-i'l'™ RNA buffer из состава набора, перемешивают на лабораторном смеси теле типа «Vortex».

 Вносят в 10 оптически прозрачных полипропиленовых пробирок типа Эппеидорф вместимостью 0.5 мл по 190 мкл раствора для флюоресцентной детекции, добавляют по 10 мкл из полученных проб для анализа, в две оставшиеся пробирки вносят по 10 мкл стандартов РНК из состава готового набора. Пробирки перемешивают, как указано выше, выдерживают 5-10 мин при комнатной температуре, проводят измерение интенсивности флюоресценции при помощи компактного флюориметра и проводится расчет кажущейся концентрации РНК в пробах при помощи встроенного программного обеспечения прибора.

 Вычисляют долю РНК в испытуемой пробе (X) в процентах по формуле:

 Х= (С7+С8-С5-С6) · 0,05814 / Со;

где: С7, С8, С5, С6 - измеренная кажущаяся концентрация РНК в пробах 7, 8, 5, 6 соответственно, выраженная в мкг/мл;

0,05814 - коэффициент пересчета, мг в мкг, соответствует разведению испытуемого образца при приготовлении проб для анализа;

Со - концентрация основного вещества (Количественное определение), г/л.

 **Белок.** Массовая доля белка не должна превышать 0,1 %. Определение проводят спектрофотометрическим методом с помощью бицинхолиновой кислоты.

Приготовление растворов. Готовят 10,2 мл реактива для измерения концентрации белка из компонентов готового набора. Для этого в полипропиленовой пробирке с винтовой крышкой вместимостью 15 мл смешивают 5 мл реагента QA, 5 мл реагента QB и 0.2 мл реагента QC из состава набора, перемешивают пробирку на лабораторном смесителе типа «Vortex».

 Готовят разведение стандартного раствора белка, «входящего в состав набора СО вещества-свидетеля 1 мг/мл, используют только в составе набора, применение стандартных растворов белка, не входящих в состав набора НЕ ДОПУСКАЕТСЯ. Для этого в полипропиленовую пробирку типа Эппендорф вместимостью 2 мл вносят 4 мкл стандартного раствора белка и 1994 мкл воды для инъекций, перемешивают на лабораторном смесителе. Готовый реактив и разведение стандартного раствора белка (2 мкг/мл) хранят при комнатной температуре и используют в течение 3-х ч после приготовления.

В 10 полипропиленовых пробирках типа Эппеидорф вместимостью 1,5 мл смешивают пробы и реактив последующей схеме:

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Номер пробирки | Раствор испытуемого образца, мкл | Раствор разведенного стандарта белка, мкл | Вода для инъекций, мкл | Реактив для измерения концентрации белка, мкл |
|  | 500 | 0 | 0 | 500 |
|  | 500 | 0 | 0 | 500 |
|  | 0 | 500 | 0 | 500 |
|  | 0 | 500 | 0 | 500 |
|  | 0 | 250 | 250 | 500 |
|  | 0 | 250 | 250 | 500 |
|  | 0 | 125 | 375 | 500 |
|  | 0 | 125 | 375 | 500 |
|  | 0 | 0 | 500 | 500 |
|  | 0 | 0 | 500 | 500 |

 Перемешивают содержимое пробирок на лабораторном смесителе, пробирки инкубируют в течение 1 ч при температуре 60 ° С в термоблоке. Измеряют оптические плотности растворов при длине волны 562 нм в пластиковых кюветах 10 мм.

 Результаты анализа

 Строят калибровочный график, откладывая по оси абсцисс количество белка в пробах стандарта, мкг; по оси ординат - оптическую плотность по данным измерений для пробирок 3-10. По построенному графику находят количество белка в пробирках 1, 2. Вычисляют среднее арифметическое (Мр. мкг) и вычисляют массовую долю белка (Х) в испытуемом образце в процентах по формуле:

Х= 100 % · мр / (Со ·500),

Мр - количество белка и испытуемом образце, мкг;

Со - концентрация основного вещества (см. Количественное определение), мкг/мкл;

500 - объем пробы испытуемого образца, мкл.

Использование самостоятельно изготовленных реагентов, включая 4 % раствор медного купороса, или флаконов компонентов из разных наборов НЕ ДОПУСКАЕТСЯ. Компоненты набора хранят в одной коробке, раздельное хранение НЕ ДОПУСКАЕТСЯ.

**Бактериальные эндотоксины.** Не более 50 ЕЭ/мл для 0,1 % раствора. Определение проводят в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины».

**Аномальная токсичность.** Должна быть нетоксичной. Тест – доза 0,01 мл 0,1 % раствора на одно животное. 0,01 мл испытуемого раствора разводят до 0,5 мл 0,9 % раствором натрия хлорида для инъекций и вводят внутримышечно на одно животное. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность».

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

 **Неорганический фосфор.** Не менее 0,6 г/л и не более 0,8 г/л.

Определение общего фосфора проводят подходящим спектрофотомефическим методом в соответствии с ОФС «Спектрофотометрическое определение фосфора». Для проведения анализа используют 300 мкл испытуемого образца. Содержание неорганического фосфата определяют по фосфору оксид (Р2О5) в испытуемом образце (X) в г/л и вычисляют по формуле:

X = 2,29 ·(Р - 300·С0·0,101) / 300;

где: Р – найденное количество общего фосфора в пробе, мкг;

 Со – концентрация ДНК в испытуемом образце, г/л;

 300 – объем пробы, мкл;

 2,29 –коэффициент пересчета массы фосфора в массу (Р2О5);

 0,101 – содержание фосфора в ДНК, вычисленное по брутто- формуле, мкг.

 **Количественное определение.** Содержание основного вещества должно составлять от 0,9 г/л до 1,1 г/л. Определение проводят методом ионообменной ВЭЖХ в соответствии с ОФС «Высокоэффективная хроматография».

 Описание процедуры анализа по разделу «Родственные примеси». При помощи программного обеспечения хроматографа строят калибровочный график зависимости площади основных пиков для разведений стандарта 1:40, 1:20. 1:10 от концентрации основного вещества в соответствующих разведениях стандарта. По калибровочному графику при помощи программного обеспечения хроматографа находят концентрацию основного вещества в испытуемом образце при разведении 1:20 (С0 г/л).

 Содержание основного вещества (Х) в г/л вычисляют по формуле:

 X = С0 · 20, г/л;

где: Со - найденное содержание основного вещества при разведении испытуемого образца 1:20, г/л;

 20 - разведение испытуемого образца, г/л.

 Хранение. В защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 ºС в соответствии с ОФС «Хранение лекарственных средств».