**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

**Я**

|  |  |
| --- | --- |
| **Проурокиназа,**  **субстанция**  **Prourokinasi**  **substantia** | **ФС**  **Вводится впервые** |

Настоящая фармакопейная статья распространяется на субстанцию Проурокиназа 10 000 000 ME, в состав которой в качестве активного вещества входит проурокиназа рекомбинантная (модифицированный человеческий активатор плазминогена урокиназного типа).

Проурокиназа рекомбинантная катализирует превращение плазминогена в плазмин, который способен лизировать фибриновые сгустки (тромбы). Специфичность действия рекомбинантной проурокиназы основано на том, что она преимущественно активирует связанный с фибрином плазминоген, имеющий иную конформацию по сравнению с плазминогеном, циркулирующим в кровотоке, и в области фибринового сгустка нечувствительна к специфическим ингибиторам, присутствующим в плазме крови. Одноцепочечная молекула рекомбинантной проурокиназы под воздействием плазмина превращается в двухцепочечную молекулу урокиназы, которая в отличие от одноцепочной формы проурокиназы значительно более активна в отношении связанного с фибрином плазминогена. Возникает цепная реакция взаимодействия рекомбинантной проурокиназы с фибринсвязанным плазминогеном, в результате которой фибриновый сгусток разрушается.

Субстанция предназначена для производства стерильных лекарственных форм и должна соответствовать требованиям ОФС «Лекарственные средства для парентерального применения» и нижеприведённым требованиям.

Содержаие проурокиназы в препарате должно быть не менее 70 % и активность 10 000 000 ME ± 10 % во флаконе от заявленной активности.

В состав субстанции входят вспомогательные вещества.

ПРОИЗВОДСТВО

Субстанцию, в состав которой в качестве активного вещества входит проурокиназа рекомбинантная, получают в результате непрерывного производственного цикла биосинтезом с помощью технологии рекомбинантных ДНК с применением генетически стабильных бактериальных штаммов в клетках Escherichiacoli (штамм TCG2613), штаммов дрожжей Pichia pastorisили других генно - инженерных штаммов аналогичного назначения.Штаммы-продуценты должны быть депонированы в официальных коллекциях.

Субстанция должна производиться в соответствии с требованиями [правил надлежащей производственной практики](http://docs.cntd.ru/document/499029882) и контроля качества лекарственных препаратов и должна отвечать требованиям ОФС «Лекарственные средства, полученные методами рекомбинантных ДНК» и ОФС «Биотехнологические лекарственные препараты»

**Описание.** Бесцветная прозрачная жидкость.

Подлинность

*Лизис фибрина*

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

*Электрофорез в полиакриламидном геле*

Наличие двух окрашенных полос белка, соответствующих полосам стандартного образца проурокиназы рекомбинантной, допустимо присутствие минорных полос. После обработки тромбином присутствует полоса, соответствующая урокиназе и легкие полосы, соответствующие N-концевому фрагменту проурокиназы, с подвижностью менее 20 кДа («Содержание проурокиназы»). Определение проводят в соответствии с ОФС «Электрофорез в полиакриламидном геле».

*Качественные реакции*

*Натрий.* Должна давать положительную реакцию на ион натрия. Определение проводят в соответствии с ОФС «Общие реакции на подлинность» метод А.

*Декстраны.*Субстанция, приготовленная для испытаний по разделу «Декстран», под действием тимола должна окрашиваться в темно-голубой цвет.

**Прозрачность.** Должна быть прозрачной Определение проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

**Цветность.** Должна быть бесцветной. Определение проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

pH. От 5,0 до 7,0. Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Натрия хлорид. От 850 до 1040 мг/флакон. Определение проводят в соответствии с ОФС«Количественное определение хлоридов методом обратного осадительного титрования в биологических лекарственных препаратах**»** титрование по методу Фольгарда или другим подходящим валидированным методом.

**Декстран.** От 450 до 550 мг/флакон. Определение декстрана в субстанции проводят спектрофотометрическим методом, используя методику определения сахаров с резорцином или тимоловым синим.

*Испытуемый раствор.* К 250 мкл субстанции прибавляют 350 мкл трихлоруксусой кислоты раствора (ТХУ) 10 %. Полученный раствор переносят в полипропиленовую пробирку типа эппендорф вместимостью 1,5 мл. Центрифугируют в течение 5 - 6 мин при 12000 об/мин. 450 мкл супернатанта помещают в коническую пробирку вместимостью 1,5 мл. Супернатант помещают в конические полипропиленовые пробирки вместимостью 1,5 мл с завинчивающимися крышками в количествах, указанных в (табл 1), и прибавляют соответствующие объемы 10 % раствора ТХУ.

Таблица 1. Распределение супернатантаираствора ТХУ в пробирках.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| № пробы, k | Объем супернатанта, мкл | Объем 10% раствора ТХУ, мкл |
| 1 | 40 | 80 |
| 2 | 50 | 70 |
| 3 | 60 | 60 |
| 4 | 40 | 80 |
| 5 | 50 | 70 |
| 6 | 60 | 60 |

Пробирки охлаждают в ледяной бане в течение 15 мин и осторожно в каждую пробирку по стенке приливают 1 мл резорцина раствора свежеприготовленного 5 % в серной кислоте 85 % или 1 мл тимола раствора 0,25 % в серной кислоте концентрированной, предварительно охлажденной во льду. Содержимое пробирок тщательно перемешивают, не вынимая из ледяной бани. Все пробирки одновременно помещают в кипящую водяную баню на 10 - 15 мин, затем охлаждают до температуры (20 ± 5) °С.

Оптическую плотность определяют на спектрофотометре при длине волны 502 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм (при использовании резорцина) или при длине волны 509 нм (при использовании тимола).

*Контрольный раствор.* Используют раствор, состоящий из 120 мкл ТХУ раствора 10 %, 1 мл резорцина в серной кислоте растворе 85 % или 1 мл тимола раствора 25 % в серной кислоте концентрированной.

Концентрация декстрана в растворе субстанции (dк) в мкг/мкл определяют по калибровочному графику и по формуле

dk = ,

где:- значение оптической плотности гидролизата субстанции;

а - (величина безразмерная) и b - (1/мкг) - коэффициенты калибровки;

k - номер пробы.

Пересчет на содержание декстрана (Dk) в мг во флаконе вычисляют по формуле:

Dk =

где: V - объем раствора субстанции Проурокиназы во флаконе, мл;

dk - концентрация декстрана в растворе субстанции;

250 - объем субстанции мкл, взятый для анализа;

500 – объем субстанции во флаконе, мл.

Проводят не менее четырех параллельных определений.

*Калибровочный график*. Для построения калибровочного графика используют декстрана раствор 0,1 % в трихлоруксусной кислоте (ТХУ) растворе 10 %. Готовят серию разведений декстрана раствора 0,1 % для построения калибровочного графика в соответствии с количествами, указанными в (табл 2):

Таблица 2. Серия разведений декстрана раствора 0,1 % в ТХУ.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| №№ проб | Кол-во декстрана раствора 0,1 %, мкл | Кол-во  декстрана, мкг | Кол-во ТХУ раствора 10 % |
| 1 | 0 | 0 | 120 |
| 2 | 0 | 0 | 120 |
| 3 | 10 | 10 | 110 |
| 4 | 10 | 10 | 110 |
| 5 | 20 | 20 | 100 |
| 6 | 20 | 20 | 100 |
| 7 | 40 | 40 | 80 |
| 8 | 40 | 40 | 80 |
| 9 | 60 | 60 | 60 |
| 10 | 60 | 60 | 60 |
| 11 | 80 | 80 | 40 |
| 12 | 80 | 80 | 40 |
| 13 | 100 | 100 | 20 |
| 14 | 100 | 100 | 20 |

Далее поступают аналогично определению декстрана в субстанции: пробирки охлаждают в ледяной бане, прибавляют резорцина раствор 5 % в серной кислоте 85 % или тимола раствор 0,25 % в серной кислоте концентрированной и помещают пробирки в кипящую водяную баню на 10 - 15 мин, затем охлаждают в ледяной бане. Измеряют оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 502 нм при использовании резорцина или 509 нм при использовании тимола в кюветах с толщиной слоя 10 мм.

Строят калибровочный график, откладывая по оси абсцисс количество декстрана в мкг, по оси ординат оптическую плотность.

*Трихлоруксусной кислоты раствор 10 %.* 50 г трихлоруксусной кислоты растворяют в 500 мл воды очищенной. Хранят в темном месте, в плотно закрытой емкости в течение 6 мес.

*Декстрана раствор 0,1 %.* 0,1000 г (точную навеску) декстрана 40 растворяют в мерной колбе вместимостью 100 мл в 70 мл воды очищенной, доводят объем водой до метки, перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

*Серной кислоты раствор 85 %.* 46,5 мл (96 - 98 %) серной кислоты концентрированной охлаждают на ледяной бане и постепенно, при помешивании прибавляют к 15 мл охлажденной во льду воды очищенной, перемешивают. Раствор хранят 12 мес.

Р*езорцина раствор 5 %.* 1 г резорцина растворяют в 20 мл серной кислоты охлажденной 85 %. Раствор используют свежеприготовленным.

*Тимола раствор 0,25 %.* 0,125 г тимола растворяют в 50 мл серной кислоты концентрированной охлажденной. Раствор используют свежеприготовленным.

Содержание проурокиназы. Не менее 70 %.

Определение проводят в соответствии с ОФС «Электрофорез в полиакриламидном геле».

Электрофорез в полиакриламидном геле в невосстанавливающих условиях.

*Толщина геля:* 0,75 мм,

стекла: короткое (10,1 х 7,3 см) и длинное (10,1 х 8,3 см)

*Разделяющий гель:* 15 % полиакриламид.

*Формирующий гель:* 4 % полиакриламид.

*Буфер для образца.* Концентрированный буферный раствор для проведения электрофореза в системе натрия лаурилсульфат-полиакриламидный гель - SDS-PAGE.

*Детектирование:* окрашивание Кумасси мбриллиантовым.

Пригодность хроматографической системы:

Белковые полосы четко выражены.

Основная полоса при сравнении с СО и маркерами белков должна находиться в области 45 кДа.

*Испытуемые растворы проурокиназы: Образец А, Образец Б, Образец В*

*Образец А.* 50 мкл субстанции «Проурокиназа» с концентрацией белка примерно 0,2 мг/мл переносят в коническую пробирку с крышкой из полипропилена для микро проб однократного применения вместимостью 1,5 мл и прибавляют 50 мкл воды очищенной и 100 мкл раствора для нанесения образцов на гель, перемешивают. Получают раствор, готовый для нанесения на гель, с концентрацией белка примерно 0,05 мг/мл. Отбирают 20 мкл в отдельную коническую пробирку для последующего нанесения на гель.

*Образец Б. 2*5 мкл субстанции «Проурокиназа» с концентрацией белка примерно 0,2 мг/мл переносят в коническую пробирку вместимостью 1,5 мл, прибавляют 75 мкл воды очищенной и 100 мкл раствора для нанесения образцов на гель, перемешивают. Получают раствор, готовый для нанесения на гель, с концентрацией белка примерно 0,025 мг/мл. Отбирают 20 мкл в отдельную коническую пробирку для последующего нанесения на гель.

*Образец В.* 20 мкл субстанции «Проурокиназа» с концентрацией белка примерно 0,2 мг/мл переносят в коническую пробирку вместимостью 1,5 мл, прибавляют 5 мкл Трис-гидрохлорида буферного раствора 1М pH 7,6, перемешивают. Прибавляют 25 мкл тромбина раствора с концентрацией 50 мкг/мл, перемешивают и инкубируют 2 ч в суховоздушном термостате при температуре (37 ± 0,5) °С. По окончании реакции прибавляют 50 мкл раствора для нанесения образцов на гель и перемешивают. Получают раствор, готовый для нанесения на гель, с концентрацией белка (обработанного тромбином) примерно 0,05 мг/мл. Отбирают 20 мкл в отдельную коническую пробирку для последующего нанесения на гель.

*Эталонный раствор СО проурокиназы.* 1 ампулу СО проурокиназы, содержащую 20000 МЕ, растворяют в 200 мкл воды очищенной. Концентрация проурокиназы рекомбинантной в полученном растворе около 1 мг/мл. Активность полученного раствора 100000 МЕ/ мл. Раствор хранят при температуре от минус 65 до минус 75 °С в течение 12 мес.

*Раствор СО проурокиназы.*

*Образец Г:* 20 мкл раствора СО проурокиназы рекомбинантной с концентрацией белка примерно 1 мг/мл переносят в коническую пробирку вместимостью 1,5 мл и прибавляют 160 мкл воды очищенной и 200 мкл раствора для нанесения образцов на гель, перемешивают. Получают раствор, готовый для нанесения на гель, с концентрацией белка примерно 0,05 мг/мл. Отбирают 20 мкл в отдельную коническую пробирку для последующего нанесения на гель.

*Раствор СО проурокиназы с тромбином.*

*Образец Д:* 5 мкл раствора СО проурокиназы рекомбинантной с концентрацией белка примерно 1 мг/мл переносят в коническую пробирку вместимостью 1,5 мл, прибавляют 15 мкл воды очищенной и 5 мкл Трис-гидрохлорида буферного раствора 1 М pH 7,6, перемешивают. Прибавляют 25 мкл раствора тромбина с концентрацией 50 мкг/мл, перемешивают и инкубируют 2 часа в суховоздушном термостате при температуре (37 ± 0,5) °С. По окончании реакции прибавляют 50 мкл раствора для нанесения образцов на гель и тщательно перемешивают. Получают раствор, готовый для нанесения на гель, с концентрацией белка (обработанного тромбином) примерно 0,05 мг/мл. Отбирают 20 мкл в отдельную коническую пробирку для последующего нанесения на гель.

*Образец Е - раствор калибрантов (маркеров.)*

Раствор, состоящий из маркеров с известной молекулярной массой для низкомолекулярных белков, пригодный для калибровки полиакриламидных гелей в присутствии натрия лаурилсульфата в диапазоне 14400 – 97400.

# Маркеры с известной молекулярной массой для низкомолекулярных белков, состоящий из:

|  |  |
| --- | --- |
| Маркеры | молекулярная масса |
| - Фосфорилаза b | 97400 |
| - Альбумин бычьей сыворотки | 66200 |
| - Альбумин яичный | 45000 |
| - Ангидраза | 31000 |
| - Ингибитор трипсина | 21500 |
| - Лизоцим | 14400 |

10 мкл раствора маркеров переносят в коническую пробирку вместимостью 1,5 мл, прибавляют 390 мкл воды очищенной и 400 мкл раствора для нанесения образцов на гель. Тщательно перемешивают. Отбирают 20 мкл для последующего нанесения на гель.

*Раствор для приготовления разделяющего геля* готовят непосредственно перед заливкой в стеклянном стакане емкостью 30 - 50 мл: смешивают 2,5 мл смеси 60 % раствора акриламида: N,N’-метиленбисакриламида (37,5 : 1), 2,5 мл буферного раствора для разделяющего геля (Трис-НС1 1,5 М; pH 8,8, 0,1 мл натрия лаурилсульфата раствора 10 %, 4,9 мл воды, аккуратно перемешивают. Далее прибавляют 50 мкл аммония персульфата раствора 10 % и 5 мкл N,N,N’,N’-тетраметилэтилендиамина (ТЕМЭД) быстро перемешивают и осторожно 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 0,4 мл воды для формирования ровной верхней границы разделяющего геля. Оставляют гель на 1 ч до полной полимеризации при комнатной температуре. После окончания полимеризации воду сливают.

*Раствор для формирующего геля* готовят непосредственно перед заливкой в стеклянном стакане емкостью 30 - 50 мл: смешивают 0,67 мл смеси раствора акриламида 60 %: N, N’- метиленбисакриламида (37,5 : 1), 2,5 мл буферного раствора для формирующего геля (Трис-НС1 0,5 М; pH 6,8), 0,1 мл натрия лаурилсульфата раствора 10 %, 6,73 мл воды, раствор тща­тельно, аккуратно перемешивают. Затем прибавляют 75 мкл аммония персульфата раствора 10 % и 15 мкл ТЕМЭД, перемешивают и заливают сверху на разделяющий гель так, чтобы верхняя граница раствора форми­рующего геля находилась вровень с верхним краем более короткого стекла.

Вставляют в раствор формирующего геля тефлоновую гребенку на 10 зубцов толщиной 0,75 мм. Оставляют гель на 1 ч до полной полимеризации при комнатной температуре.

После окончания полимеризации гребенку аккуратно извлекают из формирующего геля. Не снимая зажимы со стекол, гель устанавливают в электрофорезную камеру. После этого в камеру заливают рабочий буферный раствор для проведения электрофореза.

Конические пробирки, в которых находятся по 20 мкл каждого из образцов А, Б, В, Г, Д, Е, выдерживают в течение 5 мин в сухом контактном термостате при температуре (95 ± 5) °С (можно использовать кипящую водяную баню). Сразу после нагревания все по 20 мкл образцов наслаивают в лунки формирующего геля. Электрод нижней камеры (анод) соединяют с клеммой «+», а электрод верхней камеры (катод) соединяют с клеммой «-» источника постоянного электрического тока.

Электрофорез проводят в режиме стабилизации по току при Iconst =15 mA.

Электрофорез прекращают, когда краситель бромфеноловый синий достигнет нижнего края разделяющего геля. Ослабляют зажимы, скрепляющие стекла, разбирают стекла, гель осторожно извлекают и помещают в 200 мл уксусной кислоты раствора 10 %, предварительно налитого в металлическую емкость, помещенную на электрическую плитку с регулируемым нагревом, доводят до кипения и кипятят 5 мин. Затем гель переносят в металлическую ёмкость, содержащую 500 мл Кумасси раствора 0,1 %. Доводят до кипения и продолжают инкубировать в слабо - кипящем Кумасси растворе при температуре (100 ± 1) °С в течение 30 мин. Затем гель переносят в металлическую ёмкость, содержащую 400 мл уксусной кислоты раствора 10 %, доводят до кипения. Переносят гель в свежую порцию 400 мл этого же раствора. Процедуру повторяют несколько раз, до тех пор, пока гель станет бесцветным (прозрачным), а белковые полосы останутся ярко синими.

Основная полоса при сравнении с СО и белками-маркерами должна находиться в области 45 кДа.

После этого гель переносят в ёмкость с 200 мл воды очищенной и инкубируют 10 мин. Далее гель переносят на кусок полиэтиленовой пленки и помещают в светонепроницаемый ящик для цифровой камеры с высоким разрешением Кодак или аналогичный для считывания изображения с геля и проводят фотографирование и сканирование геля. При этом в автоматическом режиме осуществляется измерение величины поглощения проходящего света каждой из окрашенных белковых полос в треке. Результат сканирования выводится на монитор и печатающее устройство в виде кривой, число пиков на которой соответствует числу белковых полос в данном треке геля, а площадь этих пиков пропорциональна количеству белка. Кроме того, результаты сканирования любого трека представляются в виде таблицы с рядом числовых параметров, характерных для каждого из пиков, важнейшими из которых являются два.

- Площадь пика (отражает количество белка в полосе).

- Доля в процентах, которую площадь данного пика составляет по отношению к сумме площадей всех пиков (отражает долю в процентах количества белка в данной полосе по отношению к суммарному количеству всех белков в этом треке геля). Это значение соответствует содержанию проурокиназы в субстанции.

Содержания проурокиназы (Х) в процентах вычисляют по формуле:

Х= 100 %,

где: - площадь пика, соответствующего при сканировании геля

белковой полосе проурокиназы рекомбинантной,

S2. S3, Sn - площади пиков, соответствующих другим белковым полосам в этом треке геля.

*Смесь 60 % раствора акриламида: N.N’-метиленбис-акриламида (37,5:1).* 58,4 г акриламида и 1,6 г N,N'- метиленбисакриламида помещают в мерный стакан вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл воды очищенной и 20 г ионообменной смолы AG 501 – X8, состоящей из катионообменного (ионная форма Н+) и анионообменного (ионная форма ОН-) компонентов, смешанных в эквивалентных количествах. Мерный стакан ставят на магнитную мешалку и перемешивают до полного растворения акриламида и N,N'- метиленбисакриламида при комнатной температуре. Получают прозрачный раствор, в котором находятся частицы смолы. Фильтруют через 2 слоя фильтровальной бумаги, чтобы освободить раствор от ионообменной смолы, и переливают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора до метки водой очищенной и перемешивают. Ионообменная смола поставляется во влажном виде и готова к использованию. Смола не подлежит регенерации. Хранят 60 % раствора акриламида в темной стеклянной посуде при температуре 15 – 25 °С в течение 1 г.

*Буферный раствор для приготовления разделяющего геля (Трис-гидрохлорид 1,5 М, рН 8,8)* готовят в соответствии с ОФС «Буферные раство­ры». Хранят в стеклянной посуде при температуре от 4 до 8 °С в течение 1 г.

*Буферный раствор для формирующего геля* (Трис - НС1, 0,5 М, pH 6,8). 6,05 г трис (гидроксиметил) аминометана растворяют в 80-90 мл воды в мерном стакане, доводят pH до значения 6,8 с помощью кислоты хлористоводородной разведенной, контролируют значение pH потенцио­метрически, переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объем до метки водой, перемешивают. Хранят раствор в стеклянной посуде при температуре от 4 до 8 °С в течение 1 г.

*Кумасси раствор 0,1 %.* 0,5 г Кумасси бриллиантового голубого R 250 помещают в мерную колбу вместимостью 500 мл, прибавляют около 400 мл воды, и 50 мл уксусной кислоты ледяной, доводят объем до метки водой, тщательно перемешивают. Раствор хранят в стеклянной посуде при комнатной температуре в течение 1 г.

Р*аствор для нанесения образцов*. 5 мг бромфенолового синего помещают в полипропиленовую пробирку вместимостью 50 мл, прибавляют 1,75 мл воды, 1,25 мл 0,5 М трис-гидрохлорида буферного раствора pH 6,8; 4,0 мл натрия лаурилсульфата раствора 10 %, 1 мл (З-меркаптоэтанола и 2 мл глицерина ч.д.а. и перемешивают до полного растворения. Хранят при температуре от минус 18 до минус 25 °С в течение 1 мес.

Т*рис-гидрохлорида буферный раствор 1 М pH 7,6.* 12,1 г трис(гидроксиметил) амино - метана растворяют в 80 - 90 мл воды в мерной колбе вместимостью 100 мл, доводят pH до значения 7,6 с помощью хлористоводородной кислоты разведенной, измеряют pH потенциометрически, доводят объем раствора до метки водой, перемешивают. Хранят в стеклянной посуде при температуре от 4 до 8 °С в течение 1 г.

*Раствор тромбина*. Содержимое флакона тромбина растворяют в 2,5 мл воды и получают раствор с концентрацией тромбина 50 мкг/мл.

Раствор тромбина готовят непосредственно перед употреблением или хранят при температуре от минус 65 до минус 75 °С не более 3 месяцев.

**Бактериальные эндотоксины**. Норма 0,058 ЕЭ/1000 МЕ проурокиназы рекомбинантной. Определение проводят в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины»

**Аномальная токсичность**. Должна быть нетоксична. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Тест-доза 20000 ME в 0,5 мл воды для инъекций намышь, внутривенно.

**Стерильность.** Должна быть стерильной. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность», метод мембранной фильтрации.

Специфическая активность Общая ферментативная активность от 9 000 000 до 11 000 000 МЕ (10 000 000 ± 10 %)/флакон. Определяют по лизису фибрина.

За международную единицу фибринолитической активности (ME, ЕАП) принимают количество фермента, гидролизующего 5 10-4 мкмолей субстрата N-ацетил-L-лизин метилового эфира (ALME) или субстрата L- пироглутамил-глицил- L-аргинин-4-нитроанилид при температуре 37 °С за 1 мин.

Определение специфической активности субстанции проводят сравнением с раствором СО проурокиназы рекомбинантной.

*Определение по лизису фибрина.*

*Испытуемые растворы*. Субстанцию с концентрацией проурокиназы рекомбинантной 20000 МЕ/мл разводят альбумином бычьим сывороточным раствором 0,1 %(БСА) в фосфатном буферном растворе pH 7,4 в 120 раз:

- в первую лунку микротитровального планшета вносят 180 мкл БСА раствора 0,1 %;

- во вторую лунку вносят 110 мкл БСА раствора 0,1 %;

- в первую лунку вносят 20 мкл раствора субстанции, тщательно перемешивают, пятикратно забирая пипеткой раствор и выпуская его в лунку;

- 10 мкл раствора из первой лунки переносят во вторую и также тщательно перемешивают.

Получают раствор во второй лунке с концентрацией проурокиназы около 167 МЕ/мл. Субстанцию с концентрацией проурокиназы рекомбинантной 20000 МЕ/мл разводят БСА раствором 0,1 % в фосфатном буферном растворе pH 7,4 в 200 раз:

- в первую лунку микротитровального планшета вносят 180 мкл БСА раствора 0,1 %;

- во вторую лунку вносят 190 мкл БСА раствора 0,1 %;

- в первую лунку вносят 20 мкл раствора субстанции, тщательно перемешивают, пятикратно забирая пипеткой раствор и выпуская его в лунку;

- 10 мкл раствора из первой лунки переносят во вторую и также тщательно перемешивают.

Получают раствор во второй лунке с концентрацией проурокиназы около 100 МЕ/мл.

*Раствор СО проурокиназы рекомбинантной*. Для приготовления раствора СО берут 10 ампул СО проурокиназы рекомбинантной. Содержимое каждой ампулы растворяют в 1,0 мл БСА раствора 0,1 % в фосфатном буферном растворе pH 7,4. Полученные растворы объединяют и разводят в 20 раз, для этого к 1 мл раствора СО с активностью 20000 МЕ/мл прибавляют 19 мл БСА раствора 0,1 % в фосфатном буферном растворе. Активность полученного раствора 1000 МЕ/мл. Хранят при температуре от минус 65 до минус 75 °С в течение 1 г.

*Растворы СО проурокиназы* *для построения калибровочного графика*

В первую лунку первого и второго рядов микро титровального планшета вносят по 200 мкл БСА раствора 0,1 %.

Во вторую, четвертую и пятую лунки первого и второго рядов вносят по 50 мкл БСА раствора 0,1 %.

В третью лунку первого и второго рядов вносят 75 мкл БСА раствора 0,1 %.

В первую лунку первого и второго рядов вносят по 50 мкл раствора СО, тщательно перемешивают, пятикратно забирая пипеткой раствор и выпуская его в лунку.

Берут пипеткой из первой лунки первого ряда 150 мкл раствора СО, переносят во вторую лунку, перемешивают, пятикратно забирая пипеткой раствор и выпуская его в лунку.

Берут 150 мкл раствора из второй лунки первого ряда и переносят в третью, перемешивают.

150 мкл из третьей лунки переносят в четвертую и также перемешивают.

100 мкл из четвертой лунки переносят в пятую лунку первого ряда, перемешивают.

Аналогично поступают с раствором в лунках второго ряда.

Получают образцы растворов СО проурокиназы рекомбинантной со следующими концентрациями:

В 1 лунке - 200 МЕ/мл;

Во 2 лунке - 150 МЕ/мл;

В 3 лунке - 100 МЕ/мл;

В 4 лунке - 75 МЕ/мл;

В 5 лунке - 50 МЕ/мл;

*Подготовка геля*

Смешивают 28,5 мл фибриногена раствора 2 % в фосфатном буферном растворе pH 7,4 и 1,5 мл тромбина раствора с концентрацией 10 ед. NIH/мл в фосфатном буферном растворе pH 7,4.

Одна единица NIH – это количество тромбина, 0,1 мл раствора которого вызывает коагуляцию 0,2 мл плазмы, разведенной 1:1, в течение 15 – 25 с. Раствор аккуратно перемешивают и быстро выливают на крышку от микро титровального планшета, установленную на горизонтальную плоскость стола. Оставляют на 1 ч при комнатной температуре для полимеризации.

*Нанесение образцов на гель*

На полученный фибриновый гель аккуратно, не касаясь поверхности геля, наносят по 10 мкл раствора СО проурокиназы рекомбинантной и растворов субстанции, начиная с более низкой концентрации. Образцы наносят на расстоянии не менее 3 см друг от друга. Гель с образцами оставляют при комнатной температуре до тех пор, пока капли образца не диффундируют в гель, затем накрывают крышкой и помещают в суховоздушный термостат на 16 - 18 час при температуре от 27 до 30 °С.

*Оценка результатов*

Измеряют два взаимно перпендикулярных диаметра (максимальный и минимальный) каждой из зон лизиса с точностью до 0,5 мм (две повторности). Произведения этих двух диаметров характеризуют площади зон лизиса, т.е. фибринолитическую активность проурокиназы в соответствующем разведении.

Площадь (S) лизиса в мм2 вычисляют по формуле:

S=

где: - диаметры зон лизиса, мм.

На основании усредненных результатов измерения диаметров строят калибровочный график и/или таблицу зависимости величины площади зон лизиса (мм ) от концентрации СО (МЕ/мл). Результаты интерполируют линейной функцией площади зон лизиса от концентрации стандарта СО в соответствии со следующим уравнением:

S= b·Cpu + a,

где: Cpu - концентрация проурокиназы в образцах СО, МЕ/мл.

а и b – коэффициенты.

Определяют активность исследуемого образца субстанции (A1) в МЕ/мл по калибровочному графику.

Общую ферментативную активность субстанции (Аобщ.) в ME во флаконе определяют по формуле:

Аобщ.= Аi ˑ n ˑ 500,

где: A1 - ферментативная активность разведенного образца, определенная

по калибровочному графику, МЕ/мл;

п - кратность разведения исследуемого образца;

500 - объем раствора субстанции во флаконе, мл.

Общая ферментативная активность во флаконе должна быть от 9 000 000 до

10 000 000 ME.

Ф*осфатный буферный раствор (pH 7,4).* 390 мг натрия дигидрофосфата дигидрата и 2,2 г натрия хлорида помещают в стеклянный стакан вместимостью 250 мл, добавляют 200 мл воды очищенной, растворяют и доводят pH до 7,2 - 7,6, с помощью натрия гидрооксида раствора 40 %. Переносят раствор в мерную колбу вместимостью 250 мл и доводят объем раствора до метки водой, перемешивают.

Хранят раствор при температуре от 4 до 8 °С не более 3-х суток.

*Фибриногена раствор 2 %.* 1,0 г фибриногена помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 30 мл фосфатного буферного раствора pH 7,4, растворяют, доводят объем раствора до метки фосфатным буферным раствором, перемешивают. Раствор фибриногена готовят непосредственно перед употреблением.

Р*аствор тромбина с концентрацией 10 ед. NIH/мл (*ед. NIH — единицы активности тромбина). 100 ед. NIH тромбина помещают во флакон вместимостью 15 мл, прибавляют 10 мл фосфатного буферного раствора pH 7,4, перемешивают до полного растворения. Раствор тромбина готовят непосредственно перед употреблением.

А*льбумина бычьего сывороточного раствор 0,1 % (БСА).* 100 мг альбумина бычьего сывороточного лиофилизированного помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 80 мл фосфатного буферного раствора pH 7,4, растворяют и доводят объем раствора до метки тем же буферным раствором и перемешивают.

Хранят при температуре от минус 18 до минус 25 °С в течение 1 г.

*Натрия гидроксида раствор 40 %.* 40 г натрия гидроксида растворяют в воде и после охлаждения доводят объем раствора водой до 100 мл. Раствору дают отстояться и прозрачную жидкость сливают с осадка. Хранят раствор в стеклянных сосудах с притертыми пробками при комнатной температуре в течение 3 мес.

Белок. Содержание белка во флаконе должно быть от 75 до 122 мг. Определение проводят спектрофотометрическим методом в соответствии ОФС «Определение белка» метод 1.

*Испытуемый раствор.* 1 мл субстанции «Проурокиназа»

*Раствор сравнения.* Вода очищенная

Измеряют оптическую плотность при длине волны 280 нм и 310 нм в кварцевой кювете с толщиной слоя 10 мм.

Содержание белка (X) во флаконе в миллиграммах рассчитывают по формуле:

X= ,

где: D280 - оптическая плотность исследуемого образца при 280 нм;

D310 - оптическая плотность исследуемого образца при 310 нм;

1. - коэффициент поглощения (соответствует оптической плотности раствора с концентрацией белка 1 мг в 1 мл при толщине слоя равной 10 мм при длине волны 280 нм, мл/(мг см);

В- толщина слоя кюветы, 10 мм;

500- объем субстанции во флаконе, мл.

**Удельная ферментативная активность.** (расчетная величина). От 90000 до 120000 МЕ/мг белка

# Удельную активность (Ауд.) в МЕ/мг препарата вычисляют по формуле:

Ауд.= ,

где: X - содержание белка во флаконе, мг;

Аобщ. - общая ферментативная активность субстанции, ME во флаконе (см. раздел «Специфическая активность).

**Белок и родственные примеси.** Могут присутствовать только минорные белки - продукты расщепления урокиназы.

Идентификация минорных белковых компонентов в субстанции «Проурокиназа» осуществляют методом иммуноблоттинга. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение подлинности и чистоты биологических лекарственных препаратов методом вестерн-блот». Иммуноблоттинг основан на сочетании электрофореза в полиакриламидном геле и иммуноферментного метода анализа (ИФА). Минорные белки разделяют с помощью электрофореза в ПААГ, затем переносят их из геля на нитроцеллюлозную мембрану и проявляют с помощью ферментативной цветной реакции.

Подготовка образцов и растворов для разделяющего и формирующего геля, а также условия проведения электрофореза изложены в разделе «Содержание проурокиназы».

*Инкубирование геля после электрофореза*

После разделения белков в полиакриламидном геле (см. раздел «Содержание проурокиназы») гель осторожно извлекают и аккуратно отрезают формирующий гель. Оставшийся разделяющий гель помещают в полипропиленовый контейнер с квадратным дном 12 х 12 см и высотой 1,5-5 см, содержащий 50 мл буфера для переноса (Раствор №1). Контейнер закрывают крышкой, ставят на шейкер качалку и инкубируют при постоянном перемешивании (100 - 120 об/мин) в течение 20 мин при комнатной температуре.

*Подготовка нитроцеллюлозного фильтра для переноса белков*

Готовят прибор для переноса белков в буфере с геля на фильтр. Из листа фильтровальной бумаги для блоттинга вырезают 2 прямоугольника размером 20 см х 15 см и 6 прямоугольников размером 12 см х 10 см. Вырезают прямоугольный кусок нитроцеллюлозного фильтра с диаметром пор 0,2 мкм размером 10 х 8 см. Все операции с нитроцеллюлозным фильтром проводят при помощи пинцета с плоскими концами, избегая контактов фильтра с кожей рук. Подписывают на отрезанном нитроцеллюлозном фильтре дату и номер эксперимента. Опускают все листы фильтровальной бумаги и нитроцеллюлозный фильтр в буфер для переноса белков с геля на фильтр (Раствор №1), налитый в плоский поднос из полипропилена и дают им намокнуть.

*Укладка фильтра на гель и прокатка*

Кладут фильтр в плоский полипропиленовый поднос, в который налит слой буфера для переноса белков с геля на фильтр (Раствор №1), пористую подложку, прилагаемую к прибору фирмой производителем. На нее кладут смоченный буфером для переноса (Раствор №1) фильтровальную бумагу размером 20 х 15 см. Слой буфера в подносе должен быть таким, чтобы фильтровальная бумага была погружена в него на глубину 1 мм и удаляют пузырьки воздуха любым подходящим способом. В центр этой фильтровальной бумаги один за другим стопкой укладывают 3 смоченных буфером листа фильтровальной бумаги размером 12 х 10 см, при этом из каждого уложенного слоя фильтровальной бумаги удаляют пузырьки воздуха прежде чем на него будет положен следующий лист.

Далее на эту стопку фильтровальной бумаги кладут гель, с поверхности которого также удаляют пузырьки воздуха из пространства между фильтровальной бумагой и гелем. На гель кладут смоченный раствором №1 нитроцеллюлозный фильтр подписанной (или «лицевой») стороной к гелю и уплотняют его путем прокатывания. На нитроцеллюлозный фильтр один за другим стопкой укладывают 3 смоченных раствором №1 листа фильтровальной бумаги 12 х 10 см, при этом каждый уложенный лист уплотняют аналогично, как указано выше. Сверху на эту стопку кладут смоченный раствором №1 лист фильтровальной бумаги размером 20 х 15 см и удаляют пузырьки воздуха.

В последнюю очередь кладут еще одну пористую подложку, прилагаемую к прибору фирмой производителем. Таким образом, вся стопка, состоящая из двух слоев фильтровальной бумаги размером 20 х 15 см, шести слоев фильтровальной бумаги размером 12 х 10 см, геля и нитроцеллюлозного фильтра, оказывается между двумя пористыми подложками размером 20 х 15 см.

*Перенос белков с геля на фильтр*

Зажимают эту стопку пластиковыми зажимами и помещают в прибор для переноса, содержащий 3,5 литра раствора №1 таким образом, чтобы вся стопка была полностью погружена в раствор №1 и располагалась между двумя платиновыми электродами, причем плоскость геля, нитроцеллюлозного фильтра и кусков фильтровальной бумаги была бы перпендикулярна силовым линиям электростатического поля. Необходимо следить, чтобы при размещении стопки в приборе гель оказался ближе к катоду, а нитроцеллюлозный фильтр ближе к аноду, так как перенос белков в электрическом поле будет происходить в направлении от катода к аноду (т.е. из геля на фильтр). Электрод, расположенный со стороны геля (катод) соединяют с клеммой «-», а электрод, расположенный со стороны нитроцеллюлозного фильтра (анод) соединяют с клеммой «+» источника постоянного электрического тока.

Перенос проводят в режиме стабилизации по току при Iconst = 180 mA в течение 12 - 16 ч при комнатной температуре.

*Снятие бумаги и высушивание фильтра*

Для контроля эффективности переноса белковых полос из полиакриламидного геля на нитроцеллюлозный фильтр их окрашивают при помощи амидо - черного 10 В красителя. Для этого извлекают стопку из прибора, ослабляют зажимы и выкладывают стопку на поверхность полипропиленового подноса. Снимают лист фильтровальной бумаги размером 20 х 15 см и три слоя фильтровальной бумаги размером 12 х 10 см. Затем аккуратно берут пинцетом нитроцеллюлозный фильтр и помещают его на кусок сухой и чистой фильтровальной бумаги для высушивания: оставляют фильтр на 1 ч при комнатной температуре на поверхности фильтровальной бумаги.

*Окраска и промывка Фильтра*

Помещают фильтр в полипропиленовый контейнер с квадратным дном размером 12 х 12 см и высотой 1,5-5 см, содержащий 50 мл уксусной кислоты раствора 10 % (Раствор №2). Контейнер закрывают крышкой, ставят на шейкер качалку или аналогичную и инкубируют при постоянном перемешивании со скоростью вращения (100 - 120 об/мин) в течение 20 мин при комнатной температуре. Уксусную кислоту раствор 10 % (Раствор №2) удаляют и наливают в контейнер 50 мл амидо - черного 10 В раствора 0,005 % (Раствор №4), контейнер закрывают крышкой, ставят на шейкер качалку и инкубируют при постоянном перемешивании (150 - 200 об/мин) в течение 20 - 30 мин при комнатной температуре. Окрашивание прекращают, когда хорошо становятся видны полосы белков, но сам фильтр остается белым. Сливают раствор красителя и наливают в контейнер 50 мл воды очищенной. Инкубируют при перемешивании на качалке 5 мин. Воду сливают, прибавляют в контейнер еще 50 мл воды очищенной.

*Фотографирование фильтра после окраски*

Фильтр извлекают из контейнера и во влажном виде кладут на кусок полиэтиленовой пленки, помещают в светонепроницаемый ящик для цифровой камеры с высоким разрешением для считывания изображения. Проводят фотографирование фильтра. После этого отмечают местоположение полос белков маркеров на фильтре и быстро помещают фильтр обратно в контейнер с водой, не давая ему подсохнуть на воздухе.

*Отмывка Фильтра от красителя*

Отмывают с фильтра амидо - черный 10В краситель, чтобы он не препятствовал в дальнейшем взаимодействию антител с белками. Для этого сливают воду из контейнера и наливают 50 мл натрия лаурилсульфата раствора 0,1% (Раствор №6). Контейнер закрывают крышкой, ставят на шейкер качалку и инкубируют при постоянном перемешивании со скоростью вращения (100 - 120 об/мин) в течение 15 мин при комнатной температуре, при этом раствор №6 в контейнере становится голубого цвета, а белковые полосы на фильтре становятся менее контрастными, т.е. происходит отмывание красителя. Раствор №6 из контейнера сливают и прибавляют в контейнер свежую порцию 50 мл раствора №6, повторяя отмывание фильтра подобным образом 5 раз. При последней отмывке раствор №6 должен быть прозрачным и не окрашенным.

После этого аналогичным образом отмывают фильтр в шестой раз, но время инкубации фильтра с раствором №6 увеличивают до 30 мин. Сливают из контейнера раствор №6 и прибавляют туда 50 мл воды очищенной. Инкубируют при постоянном перемешивании (100 - 120 об/мин) на качалке в течение 15 мин при комнатной температуре. Для тщательного отмывания фильтра от натрия лаурилсульфата необходимо отмыть фильтр подобным образом 3 раза.

Далее нитроцеллюлозный фильтр помещают пинцетом на кусок сухой и чистой фильтровальной бумаги и оставляют на 1 ч при комнатной температуре для высушивания. Затем, чтобы предотвратить попадание на фильтр случайных капель или посторонних предметов, сверху на него кладут еще один лист сухой и чистой фильтровальной бумаги и оставляют в таком положении на ночь.

*Инкубация фильтра и обработка антителами*

Помещают нитроцеллюлозный фильтр в полипропиленовый контейнер с квадратным дном размером 12 х 12 см и высотой 1,5-5 см, содержащий 50 мл раствора №10. Контейнер закрывают крышкой, ставят на качалку и инкубируют при постоянном перемешивании с частотой вращения 100 - 120 об/мин в течение 15 мин при комнатной температуре. Извлекают фильтр из контейнера и помещают на прямоугольный лист полиэтиленовой пленки размером 12 х 10 см. Сверху кладут такой же кусок полиэтиленовой пленки и запаивают фильтр между двумя этими слоями полиэтилена так, чтобы фильтр оказался в плоском прямоугольном мешке. Для этого заплавляют две длинные стороны полиэтиленовых слоев и одну короткую так, чтобы расстояние от любого из трех краев фильтра до получившегося края мешка составляло 0,5 см. С четвертой стороны мешок не запаивают - она (как горловина) служит для того, чтобы налить к фильтру раствор №11.

Наливают в мешок 6 мл раствора №11 и после этого запаивают мешок с четвертой стороны на расстоянии 1 см от края фильтра так, чтобы в нем не оказалось пузырьков воздуха. Помещают мешок горизонтально на качалку и инкубируют при постоянном перемешивании с частотой вращения (400 - 600 об/мин) в течение 1 ч при комнатной температуре. Отрезают ножницами короткую сторону (горловину) и сливают через нее из мешка раствор №11 и наливают 6 мл раствора первых антител к урокиназе (Раствор №12).

Во избежание высокого фона все операции с фильтром во время обработки первыми и вторыми антителами и отмываниями проводят оперативно, не позволяя фильтру подсыхать на воздухе и снова запаивают горловину. Помещают мешок горизонтально на качалку и инкубируют при постоянном перемешивании (400 - 600 об/мин) в течение 1 ч при комнатной температуре. Отрезают ножницами короткую сторону. Сливают через нее из мешка раствор №12.

*Отмывание фильтра от несвязавшихся антител*

Обрезают мешок по периметру, раскрывают его, при помощи пинцета извлекают фильтр и помещают в полипропиленовый контейнер с квадратным дном размером 12 х 12 см и высотой 1,5 - 5 см, содержащий 50 мл раствора №10, не допуская подсыхания фильтра на воздухе. Отмывают с фильтра оставшиеся несвязанными первые антитела. Для этого контейнер закрывают крышкой, ставят на шейкер качалку и инкубируют при постоянном перемешивании с частотой вращения (150 - 200 об/мин) в течение 5 мин при комнатной температуре. Сливают из контейнера раствор, немедленно наливают свежую порцию 50 мл раствора №10 и повторно отмывают фильтр в этих условиях. Затем еще 3 раза отмывают фильтр подобным образом, увеличив время инкубации на качалке до 15 мин. Снова запаивают фильтр в плоский полиэтиленовый мешок аналогичным образом, наливают в него 6 мл раствора вторых антител, конъюгированных с хрена пероксидазой (Раствор №13). Запаивают мешок с четвертой стороны, помещают горизонтально на качалку и инкубируют при постоянном перемешивании (400 - 600 об/мин) в течение 1 ч при комнатной температуре.

Отмывают фильтр от оставшихся несвязанными вторых антител так же, как в предыдущем случае: проводят 2 отмывки на качалке в течение 5 мин каждая и 3 отмывки на качалке в течение 15 мин каждая. Во избежание высокого фона все операции с фильтром во время обработки первыми и вторыми антителами и последующих отмываний проводят оперативно, не позволяют фильтру подсыхать на воздухе.

*Окрашивание полос белка на фильтре*

После того как фильтр отмыли в последний раз, раствор №10 сливают и немедленно наливают в контейнер 50 мл раствора №14 и инкубируют на качалке при постоянном перемешивании с частотой вращения (100 - 120 об/мин) в течение 15 мин при комнатной температуре. Сливают из контейнера раствор №14 и наливают в него 50 мл раствора №16 и инкубируют на качалке при постоянном перемешивании (100 -120 об/мин) в течение 15 мин при комнатной температуре. Сливают из контейнера раствор №16 и наливают в него 50 мл раствора №18 и инкубируют на качалке при постоянном перемешивании (100-120 об/мин) в течение 15-30 минут при комнатной температуре. Во время этой инкубации становятся видны и приобретают окраску белковая полоса проурокиназы и полосы более коротких белков - продуктов ее расщепления. Процесс окрашивания прекращают, когда полосы приобретают выраженную коричневую окраску, а фильтр еще остается белым. Фильтр помещают в воду очищенную.

*Фотографирование фильтра*

Фильтр извлекают из контейнера и во влажном виде кладут на лист полиэтиленовой пленки и помещают в светонепроницаемый ящик для цифровой камеры с высоким разрешением. Проводят фотографирование фильтра. Высушивают фильтр, для чего оставляют его на 1 ч при комнатной температуре на поверхности фильтровальной бумаги. После этого сухой нитроцеллюлозный фильтр помещают между двумя листами чистой и сухой фильтровальной бумаги и кладут в бумажный конверт на хранение.

Субстанция «Проурокиназа» может содержать в качестве примесей только продукты расщепления урокиназы.

*Раствор №1. Буфер для переноса белков с геля на фильтр.* 57,6 г глицина; 12,5 г трис(гидроксиметил)-аминометана помещают в мерный стакан вместимостью 1000 мл, прибавляют 900 мл воды очищенной, растворяют. Получают буферный раствор с pH 8,5. Полученный буферный раствор переносят в мерную колбу вместимостью 1000 мл, доводят объем до метки водой очищенной и переливают в полипропиленовый (или полиэтиленовый) стакан или канистру объемом 4 л. Прибавляют 800 мл этилового спирта и 2,2 л воды очищенной, перемешивают. После проведения процедуры переноса белков буфер из камеры собирают обратно в канистру для хранения, т.к. он может быть использован в общей сложности для 4 процедур переноса белков. Раствор хранят в канистре при комнатной температуре в течение 1 г.

*Раствор №2. Уксусная кислота раствор 10 %.* Раствор хранят в стеклянной посуде с притертой крышкой под тягой при комнатной температуре в течение 1 г.

*Раствор №3. Амидо - черного 10В раствор с концентрацией 5 мг/мл.* 50 мг амидо - черного 10В вносят в полипропиленовую пробирку вместимостью 50 мл. Прибавляют 10 мл уксусной кислоты раствора 10 % (раствор №2), перемешивают до полного растворения. Расфасовывают по 1 мл в 10 конических пробирок с крышкой из полипропилена для микропроб однократного применения вместимостью 1,5 мл. Раствор хранят при комнатной температуре в течение 1 г.

*Раствор №4. Амидо - черного 10В раствор с концентрацией 0,05 мг/мл*. В мерную колбу вместимостью 50 мл вносят 0,5 мл раствора №3 и доводят до метки раствором №2. Перемешивают. Раствор готовят непосредственно перед окрашиванием фильтра.

*Раствор №5. Натрия лаурилсульфата раствор 10 %.* Раствор хранят в стеклянной посуде при комнатной температуре в течение 1 г.

*Раствор №6. Натрия лаурилсульфата раствор 0,1%.* Раствор готовят непосредственно перед отмыванием фильтра.

*Раствор №7. Трис-гидрохлорид буферный раствор 1 М pH 7,5.* Раствор хранят в стеклянной посуде при температуре от 4 до 8 °С в течение 1 г.

*Раствор №8. Натрия хлорида раствор насыщенный.* К 400 г натрия хлорида (о.с.ч.) прибавляют 100 мл воды очищенной, тщательно перемешивают и оставляют на ночь при комнатной температуре. Получают насыщенный раствор, в котором на дне банки находится заметное количество нерастворившегося натрия хлорида. По мере расходования насыщенного раствора прибавляют небольшие порции воды очищенной, перемешивают и следят, чтобы натрия хлорид не растворялся без остатка и на дне всегда присутствовали его кристаллы. Раствор хранят в стеклянной банке в течение 5 лет.

*Раствор №9. Тритона Х-100 раствор 10 %.* Вносят в мерную колбу вместимостью 100 мл 10 мл Тритона Х-100 раствора 100 % (неионное [поверхностно активное вещество](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9F%D0%BE%D0%B2%D0%B5%D1%80%D1%85%D0%BD%D0%BE%D1%81%D1%82%D0%BD%D0%BE-%D0%B0%D0%BA%D1%82%D0%B8%D0%B2%D0%BD%D1%8B%D0%B5_%D0%B2%D0%B5%D1%89%D0%B5%D1%81%D1%82%D0%B2%D0%B0)) и доводят раствор до метки водой очищенной, перемешивают. Раствор хранят в стеклянной посуде при комнатной температуре в течение 1 г.

*Раствор №10.* В мерную колбу вместимостью 500 мл последовательно вносят 25 мл раствора №7, 14 мл раствора №8, 5 мл раствора №9 и доводят объем раствора до метки водой очищенной, перемешивают. Рствор хранят в стеклянной посуде при комнатной температуре в течение 3 мес.

*Раствор №11.* 200 мг альбумина бычьего сывороточного вносят в полипропиленовую пробирку вместимостью 50 мл и прибавляют 20 мл раствора №10, перемешивают до полного растворения альбумина. Раствор готовят непосредственно перед окраской фильтра антителами.

*Раствор №12. Раствор первых антител.* 6 мл раствора №11 вносят в полипропиленовую пробирку вместимостью 50 мл, прибавляют 6 мкл раствора поликлональных антител кролика к урокиназе человека и перемешивают. Раствор готовят непосредственно перед окраской фильтра антителами.

*Раствор №13. Раствор вторых антител.* 6 мл раствора № 11 вносят в полипропиленовую пробирку вместимостью 50 мл, прибавляют 6 мкл раствора поликлональных антител козла к иммуноглобулинам G кролика, конъюгированных с хрена пероксидазой и перемешивают. Раствор готовят непосредственно перед окраской фильтра антителами.

*Раствор №14. 20 мМ Трис-гидрохлорида буферный раствор с pH 7,5.* В мерную колбу вместимостью 50 мл вносят 1 мл раствора №7 и доводят объем раствора до метки водой очищенной, перемешивают. Раствор готовят непосредственно перед окраской фильтра антителами.

*Раствор №15. Натрия ацетата раствор 3 М с pH 7,0.* 24,6 г натрия ацетата помещают в стакан вместимостью 100 мл и растворяют в 80 мл воды очищенной, доводят pH до 7,0 с помощью уксусной кислоты, контролируя pH потенциометрически. Переливают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объем раствора до метки водой очищенной, перемешивают. Раствор хранят в стеклянной посуде при комнатной температуре в течение 1 г.

*Раствор №16. 20 мМ натрия ацетата раствор (pH 6,0).* В мерную колбу вместимостью 100 мл наливают 7 мл раствора №15 и доводят объем раствора до метки водой очищенной, перемешивают. Раствор готовят непосредственно перед окраской фильтра антителами.

*Раствор №17. 3-амино-9-этилкарбазола раствор 50 мг/мл.* 10 мг 3-амино-9-этилкарбазола помещают в коническую пробирку вместимостью 1,5 мл, прибавляют 0,2 мл ацетона и перемешивают до полного растворения. Раствор готовят непосредственно перед окраской фильтра антителами.

*Раствор №18.* В полипропиленовую пробирку вместимостью 50 мл вносят 50 мл раствора №16, прибавляют 50 мкл водорода пероксида раствора 30% и 0,2 мл раствора №17, перемешивают. Раствор готовят непосредственно перед окраской фильтра антителами.

*Раствор №19. Хлористоводородная кислота разведенная*. Раствор хранят в стеклянных сосудах с хорошо притертыми пробками при комнатной температуре в течение 3 мес.

Определение примеси ДНК. Примеси ДНК продуцента должны отсутствовать. Определение проводят только плазмидной ДНК штамма-продуцента проурокиназы рекомбинантной в соответствии с ОФС «Полимеразная цепная реакция» (ПЦР). Необходимость определения примесей хромосомной ДНК отсутствует, так как количество копий плазмидной ДНК в клетках штамма-продуцента на несколько порядков выше. Следовательно, отсутствие в анализируемой пробе примесей плазмидной ДНК свидетельствует и об отсутствии хромосомной ДНК.

Ключевым является сравнение результатов ПЦР с использованием в качестве матрицы субстанции «Проурокиназы» и субстанции «Проурокиназы» с предварительно внесенным фрагментом контрольной ДНК.

Хранение. В вертикальном положении в защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С.