

ANTITHROMBINUM III HUMANUM DENSATUM

RZ¹:0878

Antitrombin III lidský koncentrát

DEFINICE

Je to sterilní lyofilizovaný přípravek frakce plazmatického glykoproteinu, který za přítomnosti přebytku heparinu inaktivuje trombin. Získává se z lidské plazmy, která vyhovuje požadavkům článku *Plasma humanum ad separationem* (0853). Přípravek může obsahovat pomocné látky, jako jsou stabilizátory.

Přípravek rekonstituovaný v objemu rozpouštědla uvedeném v označení na obalu má účinnost nejméně 25 m. j. antitrombinu III v mililitru.

VÝROBA

Metoda přípravy je navržena k udržení funkční integrity antitrombinu III, zahrnuje postup nebo postupy, které prokazatelně odstraňují nebo inaktivují známá infekční agens. Pokud se při výrobě použijí látky k inaktivaci virů, následný purifikační postup se musí validovat, aby se prokázalo, že koncentrace těchto látek je snížena na vhodnou úroveň a že jejich zbytky neohroží bezpečnost přípravku pro nemocné.

Specifická účinnost antitrombinu III je nejméně 3 m. j. v miligramu celkových bílkovin bez albuminu. Antitrombin III se purifikuje a koncentruje, nepřidává se protimikrobní látka ani antibiotika. Koncentrát antitrombinu III se zfiltruje přes filtr zadržující bakterie, asepticky se rozplní do konečných sterilních obalů a ihned se zmrazí. Pak se lyofilizuje a obaly se uzavřou ve vakuu nebo v atmosféře inertního plynu.

Má se prokázat, že výrobním postupem vzniká přípravek s konzistentní frakcí antitrombinu III schopnou vázat heparin. To se posuzuje vhodnými analytickými postupy, které byly určeny během vývoje, jako je následující zkouška:

Frakce vázající heparin. Proveďte se elektroforéza v agarosovém gelu (2.2.31). Připraví se roztok *agarosy pro elektroforézu R* (10 g/l) v *tlumivém roztoku barbitalovém o pH 8,4*, obsahující 15 m. j. *heparinu R* v mililitru. 5 ml tohoto roztoku se nalije na čtvercovou skleněnou desku o straně 5 cm a chladí se 30 min při 4 °C. Vyříznou se dvě jamky o průměru 2 mm, vzdálené 1 cm a 4 cm od hrany desky a 1 cm od katody. Do jedné jamky se nanese 5 µl zkoušeného přípravku zředěného na účinnost asi 1 m. j. antitrombinu III v mililitru. Do druhé jamky se nanese 5 µl roztoku značkovacího barviva, např. *modři bromfenolové R*. Nechá se probíhat elektroforéza při 4 °C a konstantním elektrickém poli 7 V/cm, dokud barvivo nedosáhne anody.

V agarosovém gelu se udělá řez ve vzdálenosti 1,5 cm podél hrany desky, kam byl nanesen zkoušený přípravek, a větší část gelu se odstraní. Zbývající pás je 1,5 cm široký a obsahuje zkoušený materiál. Na volné místo se nalije 3,5 ml roztoku *agarosy pro elektroforézu R* (10 g/l) v *tlumivém roztoku barbitalovém o pH 8,4* obsahujícím králíčí antisérum proti lidskému antitrombinu III ve vhodné, předem stanovené koncentraci, aby vznikl odpovídající pík o výšce nejméně 1,5 cm. Deska se umístí původním gelem směrem ke katodě, takže druhá elektroforetická migrace se odehrává v pravém úhlu k první. Druhá elektroforéza se nechá probíhat 16 h při konstantním elektrickém poli 2 V/cm. Desky se překryjí filtračním papírem a několika vrstvami buničiny nasáklé roztokem *chloridu sodného R* (9 g/l) a na 2 h se zatíží. Solný roztok se několikrát vymění. Desky se opláchnou *vodou R*, usuší se a obarví *modří kyselou 92 RS*.

Vypočítá se frakce antitrombinu III vázaná na heparin, což je pík nejbližší k anodě, vzhledem k celkovému množství antitrombinu III, změřením ploch dvou precipitačních píků.

Frakce antitrombinu III, která je schopná vazby na heparin, je nejméně 60 %.

VLASTNOSTI

Vzhled. Bílá nebo téměř bílá drobná pevná hmota nebo prášek. Je hygroskopický.

Zkoušený přípravek se rekonstruuje způsobem uvedeným v označení na obalu těsně před provedením Zkoušek totožnosti, Zkoušek na čistotu (kromě zkoušek Rozpustnost, Celkové bílkoviny a Voda) a Stanovení účinnosti.

ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Rozmezí stanovení účinnosti antitrombinu III je zároveň zkouškou totožnosti.

¹ Text byl zezávacněn Výborem veřejného zdraví Rady Evropy v souladu s Úmluvou pro vypracování Evropského lékopisu rozhodnutím AP-CPH (14) 5, s platností od 1. 1. 2015.

ZKOUŠKY NA ČISTOTU

Rozpustnost. Do obalu přípravku se při doporučené teplotě přidá objem tekutiny uvedené v označení na obalu; přípravek se za mírného míchání zcela rozpustí do 10 min za vzniku čirého nebo slabě zakaleného bezbarvého nebo téměř bezbarvého roztoku.

Hodnota pH (2.2.3). 6,0 až 7,5.

Osmolalita (2.2.35). Nejméně 240 mosmol/kg.

Celkové bílkoviny. Je-li třeba, zředí se přesně odměřený objem zkoušeného přípravku na roztok obsahující ve 2 ml asi 15 mg bílkovin. Ke 2,0 ml tohoto roztoku se v odstředivkové zkumavce s kulatým dnem přidají 2 ml roztoku *molybdenanu sodného R* (75 g/l) a 2 ml směsi objemových dílů *kyseliny sírové prosté dusíku R* a *vody R* (1 + 30). Protřepe se, 5 min se odstředí, supernatantní tekutina se slijí a převrácená zkumavka se nechá odkapat na filtrační papír. Ve zbytku se stanoví dusík mineralizací s kyselinou sírovou (2.5.9) a obsah bílkovin se vypočítá vynásobením výsledku faktorem 6,25.

Heparin. Nejvýše 0,1 m. j. účinnosti heparinu na mezinárodní jednotku antitrombinu III.

Antikoagulační účinnost heparinu se stanoví *in vitro* porovnáním jeho schopnosti zpomalovat za daných podmínek srážení rekalcifikované citrátové ovčí plazmy se stejnou schopností referenčního přípravku heparinu kalibrovaného v mezinárodních jednotkách.

Mezinárodní jednotka je aktivita obsažená v deklarovaném množství mezinárodního standardu, kterým je lyofilizovaný heparin sodná sůl připravený z vepřové stěvní mukózy. Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhláší Světová zdravotnická organizace.

Heparin sodná sůl BRP se kalibruje v mezinárodních jednotkách porovnáním s mezinárodním standardem pomocí dále uvedené metody stanovení.

Provede se stanovení účinnosti jednou z dále uvedených metod pro určení počátku srážení za použití zkumavek a dalšího zařízení vhodného pro zvolenou metodu:

- a) přímá vizuální kontrola, nejlépe při nepřímém osvětlení proti matnému černému pozadí;
- b) spektrofotometrický záznam změny optické hustoty při vlnové délce asi 600 nm;
- c) vizuální detekce změny tekutosti při ručním naklánění zkumavek;
- d) mechanický záznam změny tekutosti při míchání; dbá se, aby se při počáteční fázi srážení způsobilo minimální narušení roztoku.

Je nezbytné validovat metodu stanovení heparinu pro každý zkoušený přípravek s ohledem na interferenci s antitrombinem III.

POSTUP STANOVENÍ ÚČINNOSTI

Objemy uvedené v dalším textu slouží jako příklady a mohou se přizpůsobit zvolenému zařízení za předpokladu, že jejich poměry zůstanou zachovány.

Heparin sodná sůl BRP se rozpustí v roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l) tak, aby výsledný roztok obsahoval přesně známý počet mezinárodních jednotek v mililitru. Obdobně se připraví roztok zkoušeného přípravku, u kterého se předpokládá stejná účinnost. Pomocí roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l) se z obou roztoků připraví geometrické série ředění tak, aby čas srážení zaznamenaný pro nejnižší koncentraci byl nejméně 1,5násobek rekalcifikačního času při slepé zkoušce a aby se při nejvyšší koncentraci dosáhlo vyhovujícího průběhu logaritmické závislosti odpovědi na dávce podle stanovení v předběžné zkoušce.

Do ledové vodní lázně se vloží dvanáct zkumavek po dvojicích označených T_1 , T_2 a T_3 pro ředění zkoušeného přípravku a S_1 , S_2 a S_3 pro ředění referenčního přípravku. Do každé zkumavky se odměří 1,0 ml rozmrazené plazmy substrátu *R1* a 1,0 ml vhodně zředěného zkoušeného přípravku, nebo 1,0 ml vhodně zředěného referenčního přípravku. Po každém přidavku se obsah zkumavky promíchá tak, aby se netvořily bubliny. Zkumavky se v pořadí S_1 , S_2 , S_3 , T_1 , T_2 a T_3 přenesou do vodní lázně o teplotě 37 °C na dobu asi 15 min. Po dosažení rovnováhy se do každé zkumavky odměří 1 ml vhodného zkoumadla pro aktivovaný parciální tromboplastinový čas (APTT), obsahujícího fosfolipid a kontaktní aktivátor a zředěného tak, aby rekalcifikační čas ve slepé zkoušce nepřesáhl 60 s. Přesně za 2 min se do každé zkumavky přidá 1 ml roztoku *chloridu vápenatého R* (3,7 g/l) předem zahřátého na 37 °C a zvolenou metodou se zaznamená čas srážení v sekundách mezi tímto posledním přidavkem a začátkem srážení. Rekalcifikační čas ve slepé zkoušce se stanoví na začátku a na konci postupu podobným způsobem za použití 1 ml roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l) místo roztoku heparinu. Hodnoty stanovené pro dvojici slepých zkoušek se nemají významně lišit. Střední hodnoty časů srážení zaznamenaných pro dvojici zkumavek se převedou do logaritmického tvaru. Postup se zopakuje za použití čerstvých roztoků při dodržení pořadí pro inkubaci T_1 , T_2 , T_3 , S_1 , S_2 a S_3 . Výsledky se vypočítají za použití obvyklých statistických metod (5.3).

Provedou se vždy nejméně tři nezávislá stanovení. Pro každé stanovení se připraví čerstvé roztoky referenčního přípravku a zkoušeného přípravku a použije se jiný, čerstvě rozmrazený díl plazmy substrátu.

Účinnost zkoušeného přípravku se určí z výsledků těchto stanovení za použití obvyklých statistických metod (5.3). Jestliže rozptyl mezi jednotlivými stanoveními je významný na $P = 0,01$, může se výsledná účinnost stanovit výpočtem neváženého průměru jednotlivých stanovení účinnosti.

Voda. Stanoví se vhodnou metodou, jako je Semimikrostanovení vody (2.5.12), Ztráta sušením (2.2.32) nebo Spektrofotometrie v blízké infračervené oblasti (2.2.40); obsah vody je v rozmezí schváleném oprávněnou autoritou.

Sterilita (2.6.1). Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Pyrogenní látky (2.6.8) nebo **Bakteriální endotoxiny** (2.6.14). Vyhovuje zkoušce na pyrogenní látky nebo přednostně, kde je to zdůvodněno a schváleno, validované *in vitro* zkoušce, jako je zkouška na bakteriální endotoxiny.

Pro zkoušku na pyrogenní látky se na 1 kg hmotnosti králíka podá objem zkoušeného přípravku odpovídající 50 m. j. antitrombinu III.

Kde se použije zkouška na bakteriální endotoxiny, obsahuje zkoušený přípravek méně než 0,1 m. j. endotoxinu v 1 m. j. antitrombinu III.

STANOVENÍ ÚČINNOSTI

Lidský antitrombin III (2.7.17). Stanovená účinnost je nejméně 80 % a nejvýše 120 % účinnosti uvedené v označení na obalu. Interval spolehlivosti ($P = 0,95$) stanovené účinnosti je v rozmezí 90 % až 110 %.

SKLADOVÁNÍ

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.

OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- počet mezinárodních jednotek antitrombinu III v obalu;
- název a objem rozpouštědla, které se má použít k rekonstituci přípravku;
- kde je to vhodné, množství albuminu přidaného jako stabilizátor.