

Vér- és plazmakészítmények

A VÉR

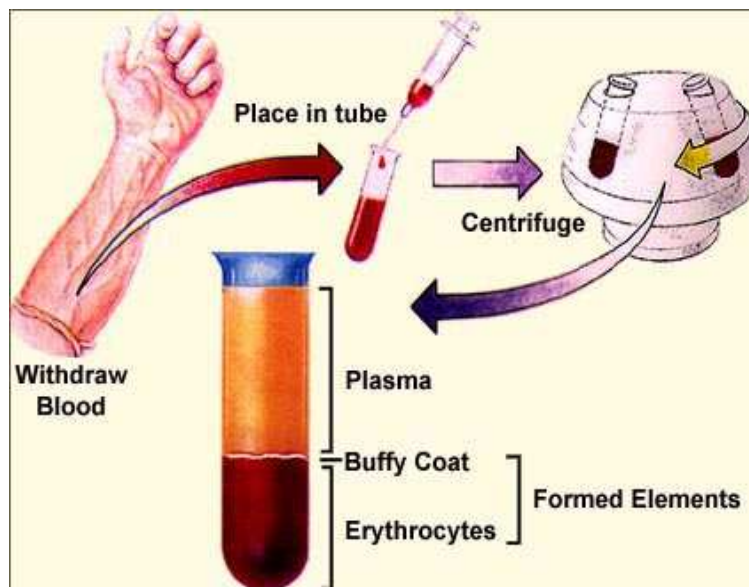
A vérrendszerben keringő testfolyadék, amely oxigénnel és tápanyaggal látja el a sejteket, elszállítja a bomlástermékeket és közreműködik a szervezet védekezésében. Olyan sajátos lazarusos kötőszövetnek tekinthető, ahol a sejtek között nincs kapcsolat, a sejtközi folyadékban lebegnek. Egy felnőtt embernek átlagosan 5-6 liter vére van. A vér térfogatának 42-48%-át (ez a hematokrit érték) teszik ki a sejt elemek (vörösvérsejtek, fehérvérsejtek, vérlemezkék), a többi a vérszérum. Androgén többletnek nevezzük azt a jelenséget, hogy a férfiak vérében 10-20%-kal több vörösvérsejt van, mint nőkében. Ez a szteroid típusú férfi hormonok hatása.

Az emberi vér egy szuszpenzió, melynek alkotórészei a plazma és a benne lebegő alakos elemek:

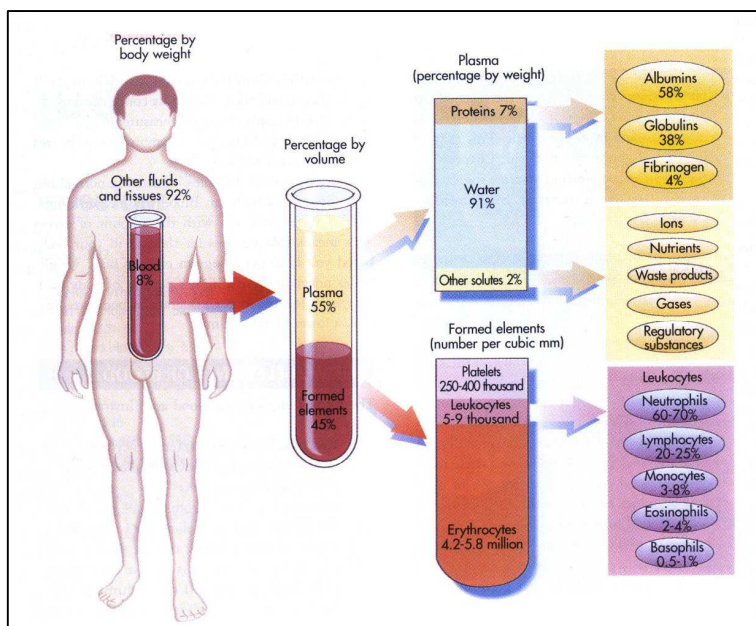
- a (sejtmag nélküli) vörösvérsejtek, vagy vörösvértestek (erythrocyták), amelyek a gáztranszportban és a sav-bázis egyensúly beállításában szerepelnek,
- a maggal rendelkező, keringő fehérvérsejtek (leukocyták), azaz a granulocyták, a lymphocyták és a monocyták, amelyek a szervezet védekező, immunológiai rendszereinek részét képezik.
- a sejtmag nélküli vérlemezkék (trombociták), amelyek funkciója a vérzések elleni védekezés, az érpálya épségének védelme és helyreállítása, azaz a haemostasis.

A levett vért többféle formában vizsgálják/használgják:

- a levett vér állapotában (teljes vér),
- centrifugálás után (alakos elemek + szérum)
- alvadás után (alvadék + plazma)

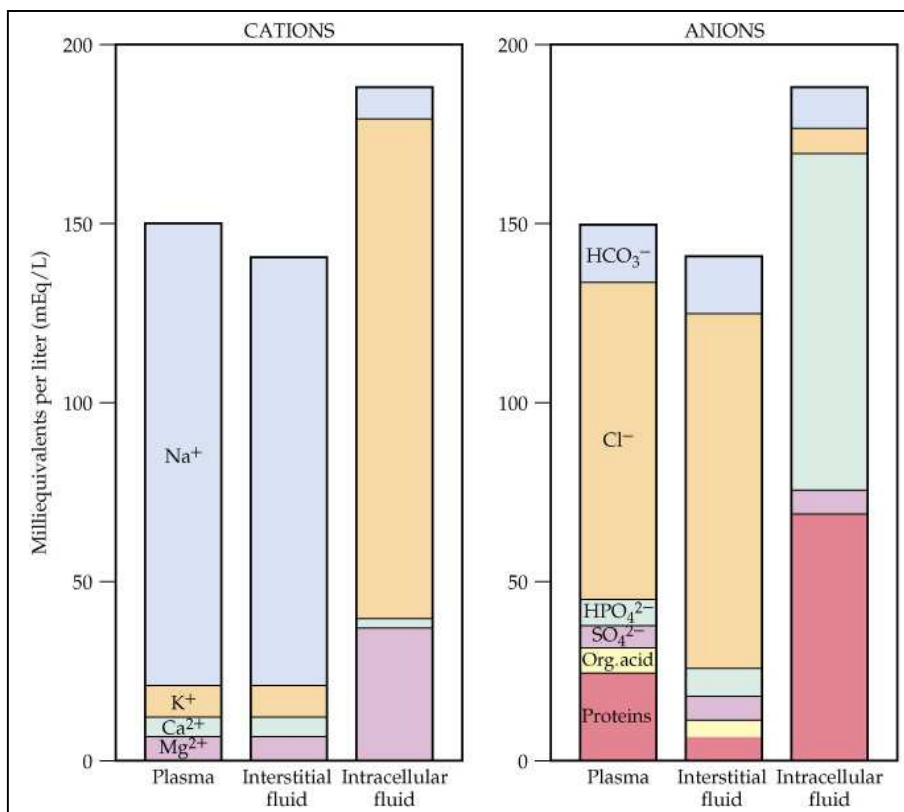


A szérum és a plazma közötti különbség: a plazmában már nincsenek benne az alvadási faktorok, a fibrinogén.



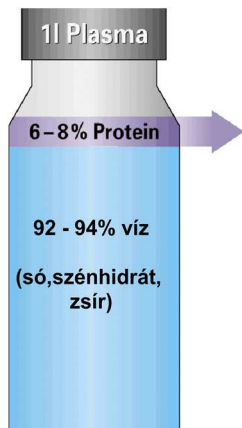
Oldott anyagok a vérben

A vér ásványi anyag (só) tartalma kb. 2%. Ionösszetétele gyakorlatilag megegyezik a sejtközötti folyadék (intersticium) koncentrációival, míg jelentősen eltér a sejtek belsejében mérhetőtől. Ezt a különbséget az aktív transzportok folyamatos energiaráfordítással tartják

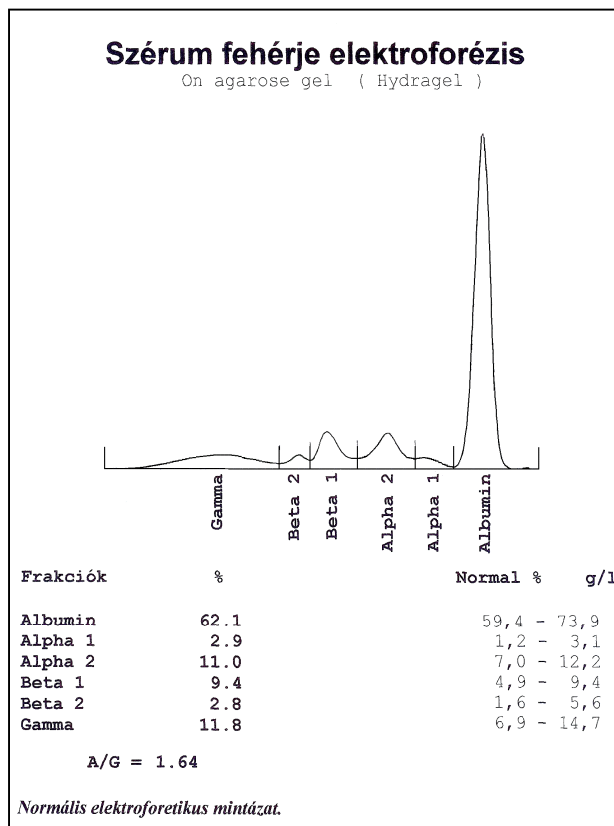


fenn.

A vérben 6-7% oldott fehérje van, ezek funkciójuk szerint sokfélék, az albumin a folyadék fizikai-kémiai tulajdonságait stabilizálja, jelen vannak szállító-, szabályozó- és immunfehérjék, valamint véralvadási faktorok is (ld. az állati sejtek tápoldatánál is).



40 - 50 g/l	Albumin
10 - 25 g/l	Immunoglobulinok
2 - 4 g/l	Fibrinogén
9 - 10 g/l	6 nagy molsúlyú fehérje (Transferrin, Haptoglobin, C ₃ , α ₂ -Makroglobulin, α ₁ -Proteinase-Inhibitor, Apolipoprotein I)
8,5 g/l	kb. 110 különböző plazmafehérje (többek között alvadási faktorok és enzim inhibitorok)



A klasszikus oldhatósági kategóriák szerint: a legtöbb az albumin (az összes fehérje kb. kétharmada) és globulinok (α-1, α-2, β-1, β-2, γ). Elektroforézissel szétválasztva, denzitométerrel kiértékelve ezek mennyiségileg is meghatározhatók.

A VÉR ÉS KOMPONENSEINEK PÓTLÁSA

A vér egészében is, elemeiben is nélkülözhetetlen a szervezet életben maradásához. Ha tehát ebből/ezekből hiány keletkezik, azt pótolni kell.

Ha a teljes vér hiányzik (sérülés, műtét), akkor vérátömlesztésre van szükség. (A fiziológiás sóoldat, vagy dextrans oldat csak részleges, átmeneti megoldás.)

Ha a vérnek csak egyes komponensei hiányoznak (veleszületett vagy szerzett betegség, külső ártalom), akkor a cél annak az összetevőnek a pótlása. Ez származhat donorvérből vagy lehet mesterségesen előállított készítmény (rekombináns fehérje).

Transzfúzióra akkor van szükség, amikor a beteg klinikai állapota azt egyértelműen indokolja. Az indikáció felállításakor mindig mérlegelni kell a kockázatát, illetve az előnyét, mert ugyan egyre biztonságosabb vérkészítmények kerülnek előállításra, a transzfúciónak mégis van rizikója. Napjainkban a transzfúzió nem csak a teljes vér átömlesztését jelenti, hanem célzott hemoterápiát, vagyis csak a hiányzó, vagy funkcióképtelen véralkotórész pótlását.

AZ ALAKOS ELEMÉK PÓTLÁSA

A vörösvérsejtpótlás indikációját a hematokrit (Htk) és hemoglobin (Hb = a hemoglobin koncentráció a vér térfogatára számítva, kb. a Htk egyharmada) értéken túl a szövetek oxigénellátottsága határozza meg. Krónikus anémia esetén a kritikus Hb érték: < 6-8 g/dl, a kritikus Htk érték: <23%, a normál értékek felénél is kevesebb. A szövetek oxigénellátottságának mutatói az oxigénextrakció és a vénás vér oxigénnyomása. Szöveti hypoxia esetén az oxigénextrakció értéke: >50%, a vénás vér pO₂ értéke: 20-22 Hgmm.

VÖRÖSVÉRSEJT-KONCENTRÁTUMOK

A vérellátó szolgálatoktól beszerezhető vörös vérsejt-készítményeket az 1. táblázat foglalja össze. Ezek mindegyike csökkentett fehér vérsejt-tartalmú készítménynek tekinthető, azaz a vörös vérsejt-koncentrátumban az fehér vérsejtek száma kevesebb, mint a kiindulási érték 25%-a (az fehér vérsejtek eltávolításának hatásfoka legalább 75%-os).

Elsődleges vörös vérsejt-készítmény a határréteg szegény, adenintartalmú oldatban reszuszpendált vörös vérsejt-koncentrátum, mely a donortól levett teljes vér szétválasztásával közvetlenül kerül előállításra. Fehérvérsejt-tartalma <1,2x10⁹/E, az fehér vérsejt eltávolítás hatékonysága kb. 75%-os. Az előállítási technológia (a buffy coat leszívása) következtében a komplement tényezők, plazmafehérje, immunglobulin-tartalom a kiindulási érték 1%-ára csökken, sőt a komplement a 4-5 napos készítményben már nem is mutatható ki. AB0-antitesteket csak minimális mennyiségben tartalmaz, ez teszi lehetővé, hogy nem csak vércsoport-azonosan, hanem vércsoport-kompatibilisen is transzfundálható (pl. A-vércsoportú betegnek 0-csoportú vörös vérsejt adható).

Ha a recipiens betegsége nem teszi szükségessé a vérkészítmény tisztítását, hipoxiás állapot, vérző beteg kezelésére ez a vörös vérsejt-készítmény ajánlható. Az elsődleges vörös vérsejt-készítmény a vérellátó egységekből bármikor beszerezhető.

Másodlagos vörös vérsejt-készítmények az elsődleges vörös vérsejt-koncentrátum tisztításával nyerhetők. Az előállításához idő kell, azt előre meg kell rendelni, és nem mindegyik vérellátó egység tudja elkészíteni. A tisztító eljárások 2004. május 1-jétől teljesen zárt rendszerben történnek, ún. SCD (Sterile Connection Device) segítségével. Ezzel a készítménygyártás során esetlegesen bekövetkező készítmény-felülfertőződés teljesen kivédhető.

1. táblázat: Vörösvérsejt-koncentrátumok

Kód	Megnevezés	Lejáratási idő
4760	Vörös vérsejt-koncentrátum, határréteg szegény, adenintartalmú oldatban reszuszpendálva, tárolás: + 4 °C	35 nap
4767	Vörös vérsejt- koncentrátum, határréteg szegény, osztott, adenintartalmú oldatban reszuszpendálva, tárolás: + 4 °C	osztástól számított 15 nap
4850	Vörös vérsejt- koncentrátum, mosott, fiz. sóban reszuszpendálva,	24 óra

	tárolás: + 4 °C	
29160	Vörös vérsejt-koncentrátum, mosott, adenintartalmú oldatban reszuszpendálva, tárolás: + 4 °C	48 óra
29167	Vörös vérsejt-koncentrátum, mosott, osztott, adenintartalmú oldatban reszuszpendálva, tárolás: + 4 °C	48 óra
5360	Vörös vérsejt koncentrátum, szűrt, adenin tartalmú oldatban reszuszpendálva, tárolás: + 4 °C	35 nap
5367	Vörös vérsejt-koncentrátum, szűrt, osztott, adenintartalmú oldatban reszuszpendálva, tárolás: + 4 °C,	osztástól számított 15 nap
27150	Vörös vérsejt- koncentrátum, szűrt, mosott, fiz. sóban reszuszpendálva, tárolás: + 4 °C	24 óra
27160	Vörös vérsejt- koncentrátum, szűrt, mosott, adenintartalmú oldatban reszuszpendálva, tárolás: + 4 °C	48 óra
27167	Vörös vérsejt- koncentrátum, szűrt, mosott, osztott, adenintartalmú oldatban reszuszpendálva, tárolás: + 4 °C	48 óra

Mosott vörös vérsejt-koncentrátum

A vérkészítmények tisztításának egyik módja a vörös vérsejt-koncentrátumban visszamaradó plazmafehérjék, antitestek, komplement tényezők, a fehér vérsejtek által termelt citokinek eltávolítása a vörös vérsejt élettani sóoldattal történő mosásával. A mosás a végtermék fehér vérsejt szennyezettségét lényegesen nem csökkenti (a fehér vérsejt eltávolítás hatékonysága közel 80%-os). A mosott vörös vérsejt reszuszpendálható élettani sóoldatban (lejárati idő: 24 óra), illetve adenines (SAGM) oldatban (lejárati idő: 48 óra). Előnye, hogy gyakorlatilag „plazmafehérje-mentesített” készítmény (a plazmafehérje mennyisége <0,5 g/E, IgA <0,2 mg/E).

Szűrt vörös vérsejt-koncentrátum

A vörös vérsejt-tisztítás másik módja a készítményt szennyező fehér vérsejtek eltávolítása (leukodepleció). A fehér vérsejt-mentesítést leukodepletáló szűrőkkel végzik, emiatt az így előállított készítményt szűrt vörös vérsejt-koncentrátumnak nevezzük.

TROMBOCITA-KÉSZÍTMÉNYEK

Trombocita-koncentrátum adása akkor indokolt, ha a trombocitopéniás beteg (= alacsony a vérlemezkeszáma) vérzik, vagy csontvelő-elégtelenség áll fenn. Nem vérző, kis trombocitaszámmal rendelkező beteg esetén (<5-10x10⁹/l) nem feltétlenül indokolt trombocita transzfúzió adása.

Manuálisan előállított, poolozott készítmény használatakor a trombocita transzfúzió dózisát általában 10 testsúlykg-onként 1 E teljes vérből származó trombocita-koncentrátumban adják meg (random donor), de a dózis meghatározásához használható az alábbi képlet is:

$$\text{minimális dózis} = \frac{(\text{kívánt trombocitaszám} - \text{jelenlegi trombocitaszám}) \cdot BV}{RF}$$

ahol:

BV (beteg-érvolumen) = testfelület m² x 2,5

RF (lépkorrekciós faktor) = 0,67

A trombocita-transzfúziót ABO csoportazonosan vagy ABO kompatibilisen kell adni (amennyiben nincs csoportazonos készítmény, az csak élettani sóoldatban reszuszpendálva adható be), az Rh vércsoport figyelembe vétele csak szülőképes korú nőknél előírt.

A különböző trombocita-készítményeket a következő táblázat foglalja össze.

2. táblázat. Trombocita-készítmények		Lejárat idő:
Kód:	Megnevezés:	
Kézi technikával teljes vérből, buffy coat módszerrel:		
12000	Trombocita koncentrátum 1 E, saját plazmában, tárolás: + 22 °C	5 nap
12002	Trombocita koncentrátum 1 E, fiz. sóban reszuszpendálva, tárolás: + 22 °C	6 óra
12091 (pool)	Trombocita koncentrátum x E, saját plazmában, tárolás: + 22 °C	6 óra
12092 (pool)	Trombocita koncentrátum x E, fiz. Sóban reszuszpendálva, tárolás: + 22 °C	6 óra
12391 (pool)	Trombocita koncentrátum x E, szűrt, saját plazmában, tárolás: + 22 °C	
	* Imugard III-PL szűrő alkalmazásával, 2-3,5x10 ¹¹ tromb/zsák, 5-6 E/zsák, 5 nap	6 óra
12392 (pool)	Trombocita koncentrátum x E, szűrt, fiz. sóban reszuszpendálva, tárolás: + 22 °C	6 óra
Gépi aferezissel:		
12211	Trombocita koncentrátum gépi aferezisből, x E, szűrt minőségű, saját plazmában, tárolás: + 22 °C	5 nap
12212	Trombocita koncentrátum gépi aferezisből, x E, szűrt minőségű, fiz. Sóban reszuszpendálva, tárolás: + 22 °C	6 óra
12311	Trombocita koncentrátum gépi aferezisből, x E, szűrt, saját plazmában, tárolás: + 22 °C	5 nap
12312	Trombocita koncentrátum gépi aferezisből, x E, szűrt, fiz. sóban reszuszpendálva, tárolás: + 22 °C	6 óra

Elsődleges trombocita-készítmények

Teljes vérből előállított trombocita-készítmények

Trombocita-koncentrátumot előállíthatunk teljes vérből az ún. buffy coat technikával. Ezen elsődleges trombocita-készítmény tárolása rázva, gázáteresztő-zsákban, 5 napig, + 22 °C-on, csakis területi vagy regionális vérellátóban, egyedi formában történik. Transzfúziós igény esetén azonban SCD (Sterile Connection Device) alkalmazásával több donor trombocitáját egy gyűjtőzsákban egyesítik (saját plazmában tárolt poolozott trombocita). A poolozás csak vérellátó egységben történhet. Ez a készítmény csak 6 órát tárolható, a fertőzésveszély miatt azonban célszerű azonnal transzfundálni. Emiatt arra az időpontra kell igényelni, amikor a beteg transzfundálása esedékes.

A trombocita-készítmények tárolása alapesetben saját plazmában (elsődleges készítmények) történik.

Közegcserélt, fiziológiás sóban reszuszpendált trombocitakonzentrátum

Amennyiben a trombocita-koncentrátum eredeti tároló közegét, a plazmát eltávolítjuk, és élettani sóoldattal helyettesítjük, közegcserélt, fiziológiás sóban reszuszpendált trombocita-koncentrátumot kapunk. A plazma eltávolításával, a trombocita-koncentrátum mosásával a fehérvérsejtek és vérlemezkék mellékhatásokat okozó termékei (citokinek, TNF α , IL-1, IL-6, β -tromboglobulin, szerotonin, PF4), a komplement tényezők és a plazmafehérjék távolíthatók el. Fiziológiás sóban kell reszuszpendálni a nem vércsoport-azonos trombocita-készítményt is.

Szűrt trombocita-koncentrátum

A trombocita-koncentrátum szennyeződésként mindig tartalmaz fehér vérsejteket ($<5 \times 10^7$ /E), kivétel a szűrt minőségű (fehér vérsejt szám $<1 \cdot 5 \times 10^6$ /készítmény) aferezises készítmény. A készítményből a fehér vérsejteket leukodepletáló szűrőkkel lehet eltávolítani.

PLAZMAKÉSZÍTMÉNYEK

Az emberi vérplazma száznál is több különböző fehérjét tartalmaz, melyek közül számos gyógyszerként is forgalomba kerül. Ezek közül néhánynak életmentő szerepe van és szinte csak egyedülként alkalmas az adott betegség gyógyítására.

Ezek az izolált, specifikus fehérjét tartalmazó gyógyszerek a plazmaderivátumok.

Technológiák kialakulása, fejlődése

A fehérjék fiziko-kémiai tulajdonságainak megismerése reális lehetőséget teremtett fehérje koncentrátumok vérpótló szerként való felhasználásra. Az állati, elsődlegesen ló és marha plazmából előállított albumin készítmények allergiás reakciót váltottak ki, így a kutatók a humán plazma felé fordultak. A plazmafrakcionálási eljárások kialakulását az USA háborús erőfeszítései segítették, így a Harvard egyetemen telepített laboratórium albumin termékét már felhasználták az 1941. decemberi Pearl Harbor-i támadás sérültjeinek a gyógyítására. 1942 januárjában, az USA-ban döntés született, hogy a nagy gyógyszergyárak plazmafrakcionáló kapacitást építsenek ki, elsődlegesen a hadsereg igényeinek kielégítésére. 1946-ban az addig már szabadalmaztatott eljárásokat (Cohn hideg alkoholos eljárása) teljes részletességgel nyilvánosságra hozták, ami segítette az eljárások telepítését és módosítását, fejlesztését.

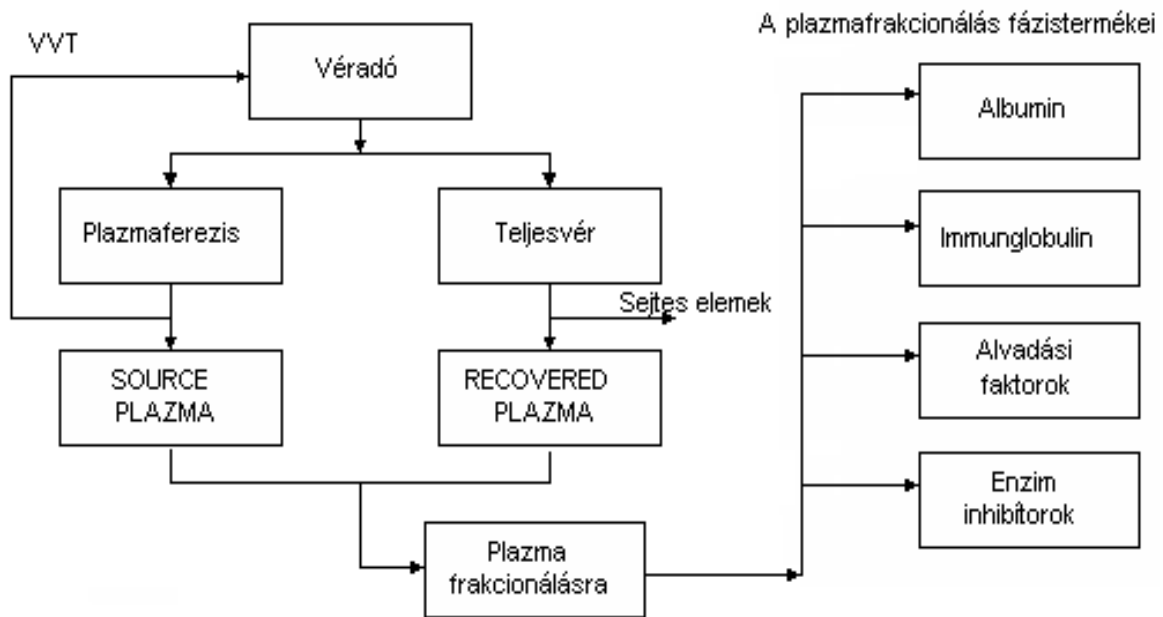
A plazmafrakcionálási technológia a 60-as évek elejétől indult igazi fejlődésnek. A hetvenes években elkezdtek telepíteni a korszerűbb elválasztás technikai műveleteket (ultra-szűrés, kromatográfia) amelyek lehetővé tették az alvadási faktorok előállítását és az intravénásan alkalmazható immunglobulin készítmények is piacra kerültek. A nyolcvanas években a monoklonális technika elterjedésével a monoklonális ellenanyaggal tisztított faktor készítményeket fejlesztettek ki, és ezzel párhuzamosan folyt a rekombináns preparátumok tesztelése is.

Magyarországon az 50-es évek második felében indult meg a plazmafrakcionálás a Humán Intézetben illetve az Országos Hematológiai és Vértranszfúziós Intézetben. Először a gammaglobulint preparálták, majd 1962-től az albumin infúzió is törzskönyvezett készítményként jelent meg. A Humán Intézet gödöllői telephelyén 1966-ban kezdték meg az ipari méretű plazmafrakcionálást. Albumin infúziókat és immunglobulin injekciót gyártottak hazai önkéntes donorok vérplazmájából. 1986-ban jelentős beruházással kapacitás bővítés történt, korszerűbb lett a gyártás. 1994-re a hazai vértranszfúziós állomásokon bekövetkezett minőségi fejlődés lehetővé tette a friss fagyasztott plazma előállítását, amely előfeltétele volt a véralvadási faktorkoncentrátumok gyártásának. Így 1994-95-ben a gyártóüzem átépítése után meg-

kezdődött a nagy tisztaságú, vírusinaktivált faktor VIII és faktor IX koncentrátumok előállítása a magyarországi hemofiliás betegek ellátására. (A Humán Intézet azóta többször tulajdonost és nevet cserélt, volt a TEVA izraeli gyógyszergyár üzeme, Humán Bioplazma Rt, jelenleg a Kedrion Group-hoz tartozik.)

A humán plazma, mint alapanyag

A humán plazma két módon állítható elő (6. ábra). Az egyik esetben teljes vérvétel történik. A donoroktól levett vért centrifugálással komponenseire bontják, alakos elemekre és a plazmára. Az így előállított plazma a „recovered” plazma.



6. ábra: A vérellátás és plazmafrakcionálás kapcsolata

A plazmaferézissel előállított plazma a „source” plazma. Plazmaferézis folyamán a donorok visszakapják a vér egyéb komponenseit (alakos elemek) így kisebb a szervezetük megterhelése és gyakrabban ismételhető a plazma adása.

A plazmaderivátumok alapanyaga egyedi plazmák keveréke. Az egyedi plazmák számtalan paraméterben különböznek egymástól és tartalmazhatnak olyan fertőző ágenseket, melyek a termékkel a recipiens szervezetébe jutva fertőzést és betegséget okozhatnak. Az ilyen átvitelek elkerülése, a plazmaderivátumok biztonsága napjaink legfontosabb kérdése. A humán plazma előállítására és minősítésére a WHO és Ph. Eur. előírásai a meghatározók. A biztonság növelése érdekében a plazmafrakcionálók olyan átfogó biztonsági rendszert (The Integrated Safety System) alakítottak ki, amely lefedi a gyártás teljes folyamatát a plazma előállítástól a végtermék felszabadításáig.

Az Átfogó Biztonsági Rendszer elemei:

- alapanyag biztonsága
- plazma minősítése, verifikálása, pool-ok minősítése

- hatékony vírusinaktiváló/eltávolító lépések
- végtermék ellenőrzése, felszabadítása.

A veszély csökkentése érdekében mind a donorokat, mind a levett vért, illetve plazmát szigorú vizsgálatnak és szelekciónak vetik alá. A véradás előtt a donorok általános orvosi és laboratóriumi vizsgálaton vesznek részt, így a plazma csak egészséges donoroktól származhat. Magyarországon minden egyes levett vért a Vértranszfúziós Intézetek a magyar jogszabályokban is rögzített európai irányelveknek megfelelően ellenőriznek. Az OVSZ-től (Országos Vérellátó Szolgálat) átvett valamennyi plazma megfelel az alábbi követelményeknek:

- HBs-antigén: **negatív** (A vizsgálat a B-típusú májgyulladást (hepatitis-B) okozó vírus felszíni fehérjéjének (HBsAg = hepatitis B surface antigen) jelenlétét mutatja ki.)
- Anti-HIV1-2 (HIV vírusok ellen termelt antitest): **negatív**
- Anti-HCV (hepatitis-C vírus ellen termelt antitest): **negatív**
- Lues (szifilisz, vérbaj: TPHA = *Treponema pallidum* haemagglutination assay): **negatív**

Az emberi vérplazmából előállított készítményekkel történő vírusátvitel kockázatának csökkentésére a hazai és nemzetközi előírások az alábbi feltételek együttes teljesülését írják elő:

- a véradók fentiek szerinti orvosi vizsgálatát és a vírus-antigének/ellenanyagok meghatározását,
- az alapanyag plazma feldolgozás előtti újbóli vírusvizsgálatát, a HCV esetében NAT (=PCR) technikával,
- validált vírusinaktiváló, víruseltávolító lépések alkalmazását a gyártás során.

A vérből előállítható plazmakészítmények az alábbiak:

Friss Fagyasztott Plazma (FFP)

Kód	Megnevezés	Lejáratási idő
18200	FFP, 1 E, (-25 és - 40 °C között)	1 év
18307	FFP, 1 E, sejszegény, osztott, (-25 és -40 °C között)	1 év
18211	FFP, gépi aferezisből, E, (-25 és-40 °C között)	1 év

A friss fagyasztott plazma előállítása teljes vérből centrifugálással (180-290 ml/donáció) vagy nagyobb mennyiségben plazmaferezis eljárással (közel 800 ml/donáció) történik. A plazmát a vérvételt követő 24 órán belül gyorsfagyasztóban – 40 °C alatti hőmérsékletre fagyasztják le. Ezzel az eljárással a plazma valamennyi alkotórésze megőrizhető. Mind a labilis, mind a stabil véralvadási faktorokat tartalmazza. A készítmény megfelelőségének feltétele a 70 %-nál nagyobb FVIII aktivitás. A fagyasztás sebessége nagymértékben befolyásolja a nem stabil alvadási faktorok kinyerését. A minél gyorsabb fagyasztás a kívánatos, ugyanis lassú fagyasztáskor a fehérje molekulák hosszú ideig találkoznak nagy sókoncentrációjú oldattal – a fagyasztás kezdetén a víz kifagy, a sók pedig feldúsulnak – és a nagy ionerősség következtében a fehérje molekulák elveszíthetik aktivitásukat, ami a kitermelést rontja. Tárolása csakis -25 °C-nál alacsonyabb hőmérsékleten, fagyasztó szekrényben lehetséges. Ezért nem célszerű a kórházi osztályos hűtőkben tárolni, mivel azok fagyasztó terében a hőmérséklet általában csak -18 °C körüli.

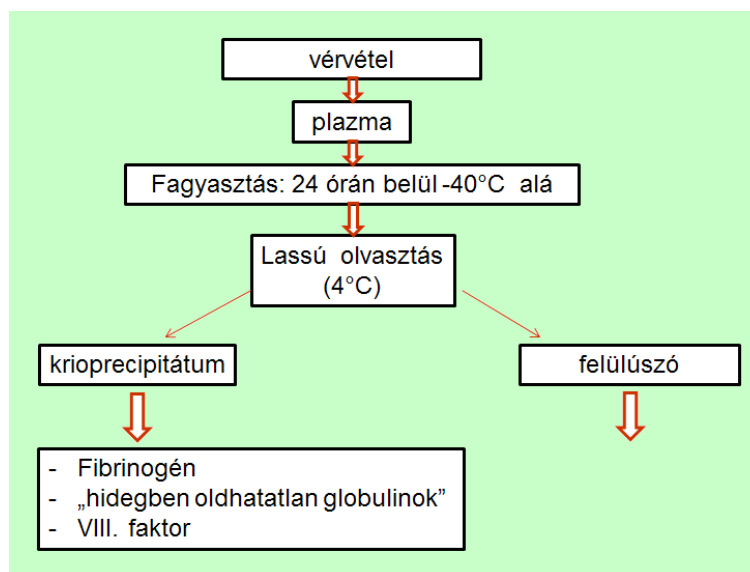
A friss fagyasztott plazma az alapanyaga a különféle gyógyszergyári plazmakészítményeknek: alvadási faktorkoncentrátumoknak, albumin- és immunglobulin készítményeknek. Ezen hatóanyagokon kívül tartalmazza a véralvadási rendszer inhibitorait (fibrinolitikus enzimek, antitrombin-III, protein C, protein S stb.), kininogént, fibronektint, proteáz inhibitorokat, C1-észteráz inhibitorot, illetve a komplement rendszer komponenseit, valamint a vér alvadását megakadályozó citrát tartalmú alvadásgátlót (CPD-t, vagy ACD-A-t). WHO ajánlása alapkövetelménynek a 8 órán belüli lefagyasztást és a -20 °C alatti tárolást tekinti.

Az friss fagyasztott plazmát AB0 vércsoport azonosan (esetleg AB0 kompatibilisen) szabad transzfundálni.

A készítmény az egyik legveszélyesebb vérkészítmény, mert a plazmát nem vírusmentesítik. A beadásra kerülő FFP egy részét az Európai Unió egyes államaiban metilénkék-UV-A vagy psoralen-UV-A kezelésnek vetik alá (az eljárás viszont csökkenti a plazma FI, FV és FVIII aktivitását, növelve így a plazma felhasználást). Az USA-ban a solvens/detergens módszert használják vírusmentesítésre (ez az eljárás viszont a FVII, vWF, PS, antiplazmin aktivitást csökkenti). Mivel a költségek a nem kezelt FFP-hez képest közel kétszeresek, ezen országokban sem minden FFP vírusinaktivált. A kezeletlen FFP-t viszont karanténban tartják, és csak akkor kerül sor terápiás felhasználására, ha a donor újra vért ad és ennek a donációnak a vírus- és lues-szerológiai eredményei is negatívak. Az FFP-vel potenciálisan lehetséges fertőzés átvitel kockázatát csökkenthetjük az önkéntes, térítésmentes véradással, a donorok orvosi vizsgálatával (önkizáró nyilatkozat a rizikócsoportbeli donorok esetén), a levett vérek szűrővizsgálatával (HBV, HCV, HIV, lues), de leginkább az FFP indikációjának pontos behatárolásával.

Krioprecipitátum

Fibrinogént, FVIII-t, Willebrand faktort, FXIII-at és fibronektint tartalmazó plazmakészítmény, melyet a FFP tovább feldolgozásával állítanak elő. A FFP-t hőfokprogram szerint lassan felolvasztják +4 °C-os hőmérsékletig. Ilyen körülmények között a fehérjék egy része csapadék formájában oldhatatlan marad, ez a frakció a krioprecipitátum.

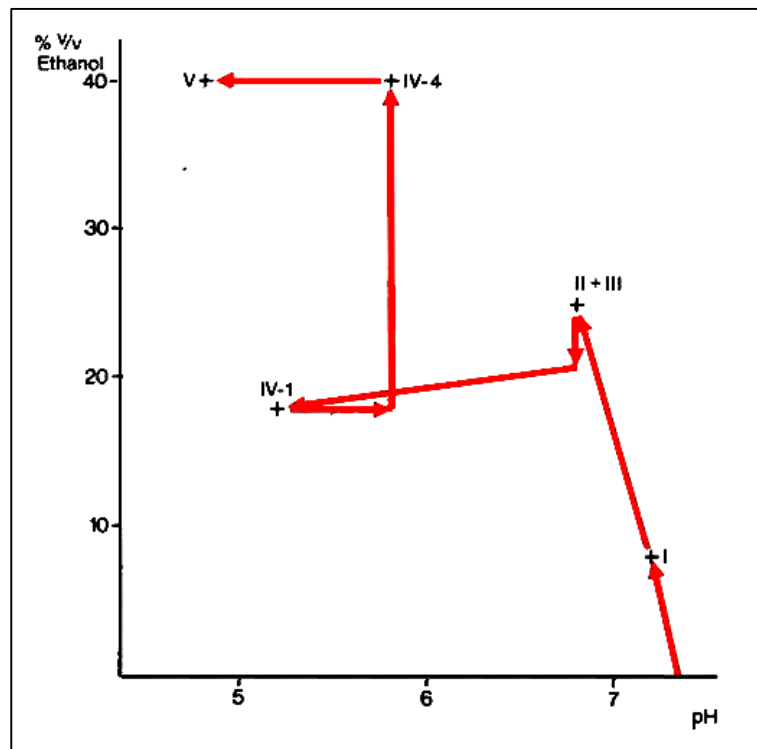


Nem vírusinaktivált készítmény. Alapesetben további feldolgozásra kerül, terápiára csak rendkívüli körülmények között használják, ha nem áll rendelkezésre véralvadási faktorkon-

centrátum. FI, vWF, FVIII, FXIII hiányokban, illetve komplex véralvadási zavarokban is használható. Adása esetén fennáll a fertőzésátvitel (vírus, baktérium), allergiás, nem hemolítikus transzfúziós reakció, FVIII ellenes ellenanyag létrejöttének kockázata.

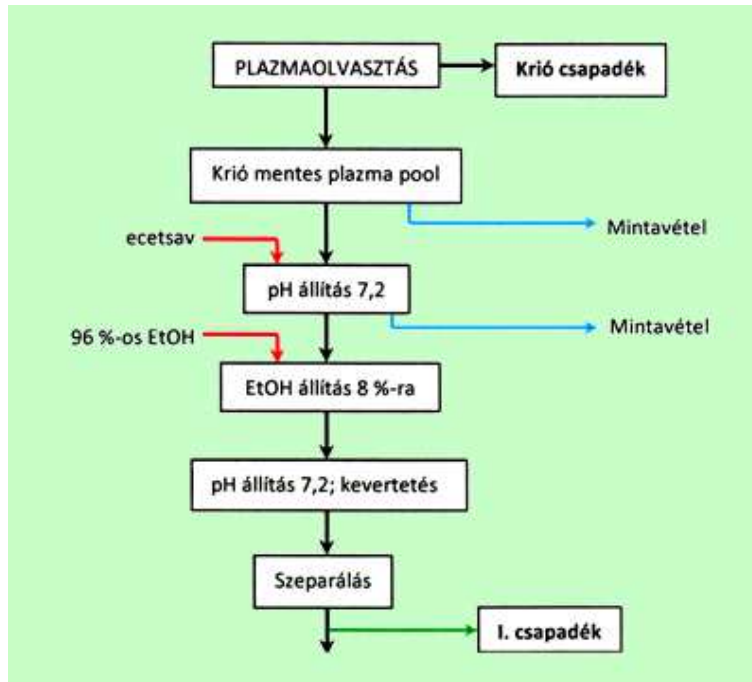
A kriomentes plazma feldolgozása

Edwin Cohn (1892-1953) amerikai biokémikus nevéhez fűződik a vérplazma frakcionálása hideg etanolos eljárással, melynek során a pH és az alkoholtartalom változtatásával lépésről lépésre csapják ki az egyes frakciókat. A csapadékképzéshez le kell csökkenteni a fehérjék oldhatóságát. Az oldhatóság az izoelektromos ponton minimális. Ezen a pH-n a molekulák eredő töltése nulla, így a közöttük ható taszító erők megszűnnek, könnyen összetapadnak. Másrészt az oldhatóság csökkenthető az oldószer polaritásának megváltoztatásával. A Cohn-féle eljárásban etanolt adnak a vizes közeghez, így csökken az oldószer polaritása, ebben a poláris jellegű fehérjék oldhatósága rosszabb, ezért kicsapódnak.



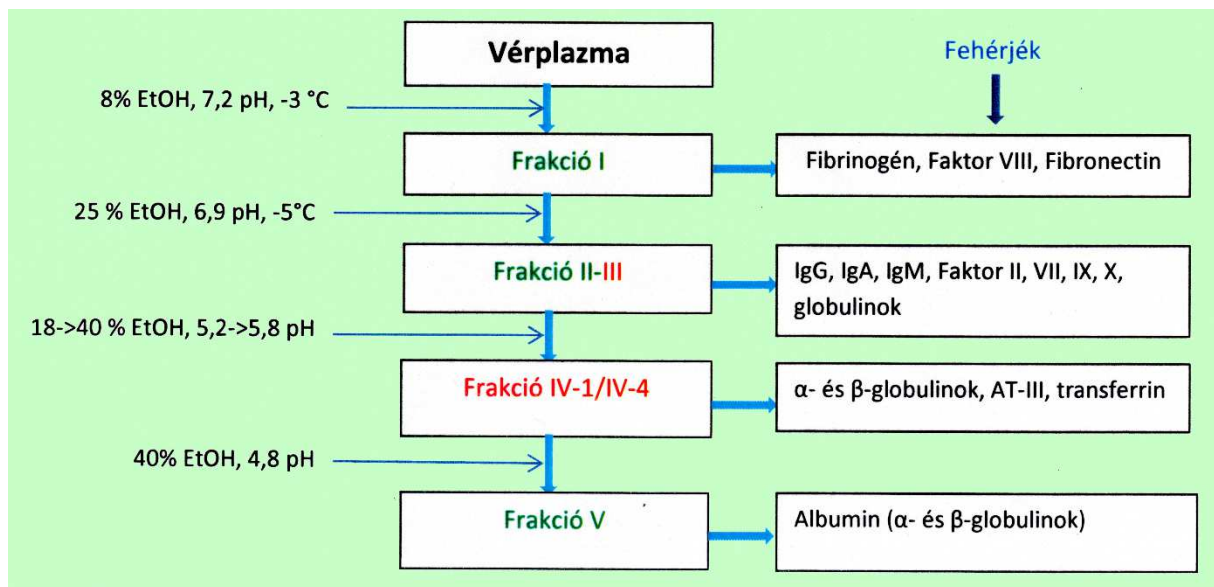
A pH és etanol koncentráció változtatása a Cohn frakcionálás során

A Cohn-féle eljárás 5 fő frakciót eredményez (I, II, III, IV, V). A kezdeti szakaszban a Frakció-I-et csapják ki, ez tartalmazza a F-VIII véralvadási faktort, ami a veleszületett A típusú vérzékenység kezeléséhez szükséges. Ha viszont a technológia a krioprecipitátum leválasztásával indul, akkor a F-VIII a kriocsapadékba kerül, így az első Cohn csapadék ezt már nem tartalmazza.



A Cohn frakcionálás első lépése

A kriocsapadék felülúszójából is végrehajtható a Cohn frakcionálás, a hideg etanolos eljárás:



A Cohn frakcionálás lépései és termékei

A Frakció-I elválasztása után a Frakció II és III egyszerre válik ki. Ezt a csapadékot visszaoldva két lépésben kapják a II és III csapadék frakciókat. A II+III csapadék felülúszójá-

ból három lépésben választják le előbb a IV/1 csapadékot (melléktermék) majd a IV/4 frakciót, végül az V frakció az összes fehérje kb. kétharmadát kitevő albumin.

A frakcionálás eredményeképpen a következő termékcsoportokat állítják elő:

Albumin

A gyógyszergyárakban nagy plazmapoolokból állítják elő. Tisztított, nagy fehérje tartalmú (az összfehérje 95 %-a albumin) készítmény, vírusfertőzés szempontjából biztonságos, mivel kettős, kombinált (fizikai és kémiai) vírusinaktiváláson esik át (a módszereket ld. később).

5 %-os, izoonkotikus és 20 %-os, hiperonkotikus albumin oldat kerül előállításra. (Onkotikus nyomás = a fehérjék kolloid ozmotikus nyomása.) Az albumin vízkötő kapacitása nagy (1 g albumin 18 ml vizet köt) és a tartózkodási ideje a vérben viszonylag hosszú (4 óra). Az elvesztett vértérfogat pótlására alkalmas. A volumennövelő hatás kb. 48 óráig tart. A kolloid ozmózis nyomás 80 %-át visszaállítja.

Akut vérvesztés terápiájának részeként, egyebek mellett 5 %-os humán albumin adható. Égésbetegségben az első négy napban a plazma albumin tartalmának kb. 2-szerese vész el a sebeken keresztül. Ilyen esetekben mielőbb 20 %-os albumin adása szükséges, bevitele infúzió formájában történik.

Immunglobulinok

Az immunglobulin készítmények nagyszámú, több ezer donor plazmájából (plazmapool) előállított, főkomponensként antitesteket (immunglobulinokat) tartalmazó vírusmentesített készítmények. Passzív immunizálással erősítik fel a szervezet védekezését a fertőzések ellen. A készítményben lévő antitestek specifikitása alapján lehetnek polivalens és monovalens immunglobulin készítmények.

a.) A polivalens immunglobulin készítmények az adott népességben előforduló gyakori kórokozók (vírus-, baktérium antigének) ellen tartalmaznak sokféle ellenanyagot. Beadásuk intramuszkulárisan (= izomba), illetve a tisztított készítményeké intravénásan (intravénás immunglobulin, = IVIG terápia) történhet. Hatása nem specifikus, nem önmagában, hanem más kiegészítő kezelésekkel együtt hatásos. IVIG kezelésre alkalmazható magyar polivalens (sokféle baktérium és vírus ellen hatékony), vírusmentesített immunglobulin készítmény, a Humoglobulin (5 %-os immunglobulin készítmény). A fehérjetartalom legalább 95 %-a immunglobulin, melynek legalább 99 %-a IgG. Ezen belül valamennyi IgG alosztályt tartalmazza.

b.) A monovalens (specifikusan egyféle fertőző ágenssel szemben hatékony) immunglobulin készítmények előállítása felépülő betegektől, vagy immunizált donoroktól plazmaferézissel nyert plazmából történik. A tisztított készítmények intravénásan is alkalmazhatók, a kevésbé tisztítottak beadása csak intramuszkulárisan történhet. Például a tetanusz ellenanyagot tartalmazó monovalens immunglobulin készítmény (TETIG) akkor alkalmazható, ha a sérült beteg nem részesült aktív tetanusz immunizációban. A hepatitis B vírus elleni antitestet tartalmazó immunglobulin (Hepatect, gyártó: Biotest) hepatitis B vírussal történő kontaminációt követő 72 órán belül alkalmazható.

Véralvadási faktorkoncentrátumok

Ezek tárgyalásához előbb célszerű áttekinteni az emberi szervezet véralvadási, védelmi mechanizmusát.

A szervezet érpályái sérülékenyek. Mechanikai traumák következtében a megnyílt erek keresztül vérvesztés következik be. Az élőlény ezeket a traumákat csak abban az esetben élheti túl, ha az érsérülést követő vérzést csillapítani képes. Az erek sérülését követően a vérzés megszüntetése három fázisban megy végbe:

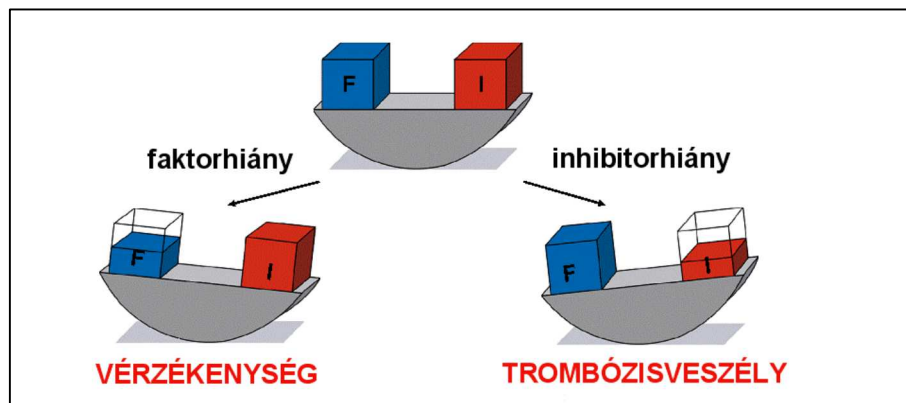
1. Helyi érreakciók: a sérült erek összehúzódással reagálnak az érfal simaizmok közvetlen reakciójaként. Ez a folyamat csak rövid ideig tart.

2. Trombociták működése: a trombociták aktiválódnak, majd aggregálódnak. Ennek hatására alakul ki az érsérülés helyéhez tapadó trombocitadugó, amely elzárja a sérült eret.

3. Véralvadás vagy koaguláció: Ebben a kaszkádfolyamatban a vérplazmában oldott állapotban lévő fibrinogénből egy oldhatatlan, stabil fibrinháló lesz, amely a trombocitákkal együtt dugót képez.

A három fázis időben átfedi egymást. Az alvadás befejeződése, a biztonságos zárás után indul meg lassan az eredeti állapot helyreállítása, az alvadék feloldódása, aminek végeredménye – kedvező esetben – az érlumen helyreállítása, a rekanalizáció.

A vérzéscsillapítás kétélű fegyver, nemcsak hiánya, de túlműködése is veszélyezteti az életet. Ha az eredetileg nagyon pontosan kiegyensúlyozott rendszer egyik tagja hiányzik, akkor – a hiányzó tag működésének megfelelően – vagy kóros vérzékenység, vagy ennek az ellentéte, kóros vérrögképződés, trombózis állapota lép fel.



Egyensúly a véralvadási faktorok és inhibitorok között

A véralvadásban szereplő fehérjék nagy részét a máj – vagy a máj is – szintetizálja. Az elsőként felfedezett faktorok, a fibrinogén/fibrin és a protrombin/trombin elnevezése általánosan elfogadottá vált. A későbbiekben felismert faktorok elnevezését az Egészségügyi Világszervezet egységesítette. A faktorokat római számokkal, az aktivált faktort „a” toldalékkal jelölik.

A fibrinháló megjelenése többlépcsős reakciósorozat végeredménye. Az egyes lépésekben egy-egy proenzim (alvadási faktor) aktív enzimmé alakul át. Az aktív enzimek – a VIIIa és a XIIIa faktor kivételével – szerin proteázok. Valamennyi proteáznak nagyon szűk a szubsztrátspecifitása, csak meghatározott fehérjék (egy vagy több alvadási faktor) meghatározott peptidkötéseit hasítják: az aktivált alvadási enzim egy további proenzim peptidkötésének hasításával alakítja ki a következő aktív enzimet. Minthogy az egymást követő proenzimek koncentrációja a vérben egyre magasabb, az eredetileg lassan induló folyamat egyre jobban felgyorsul. A gyorsuló folyamatot „alvadási kaszkád” (kaszkád = lépcsőzetes vízésés) néven említik.

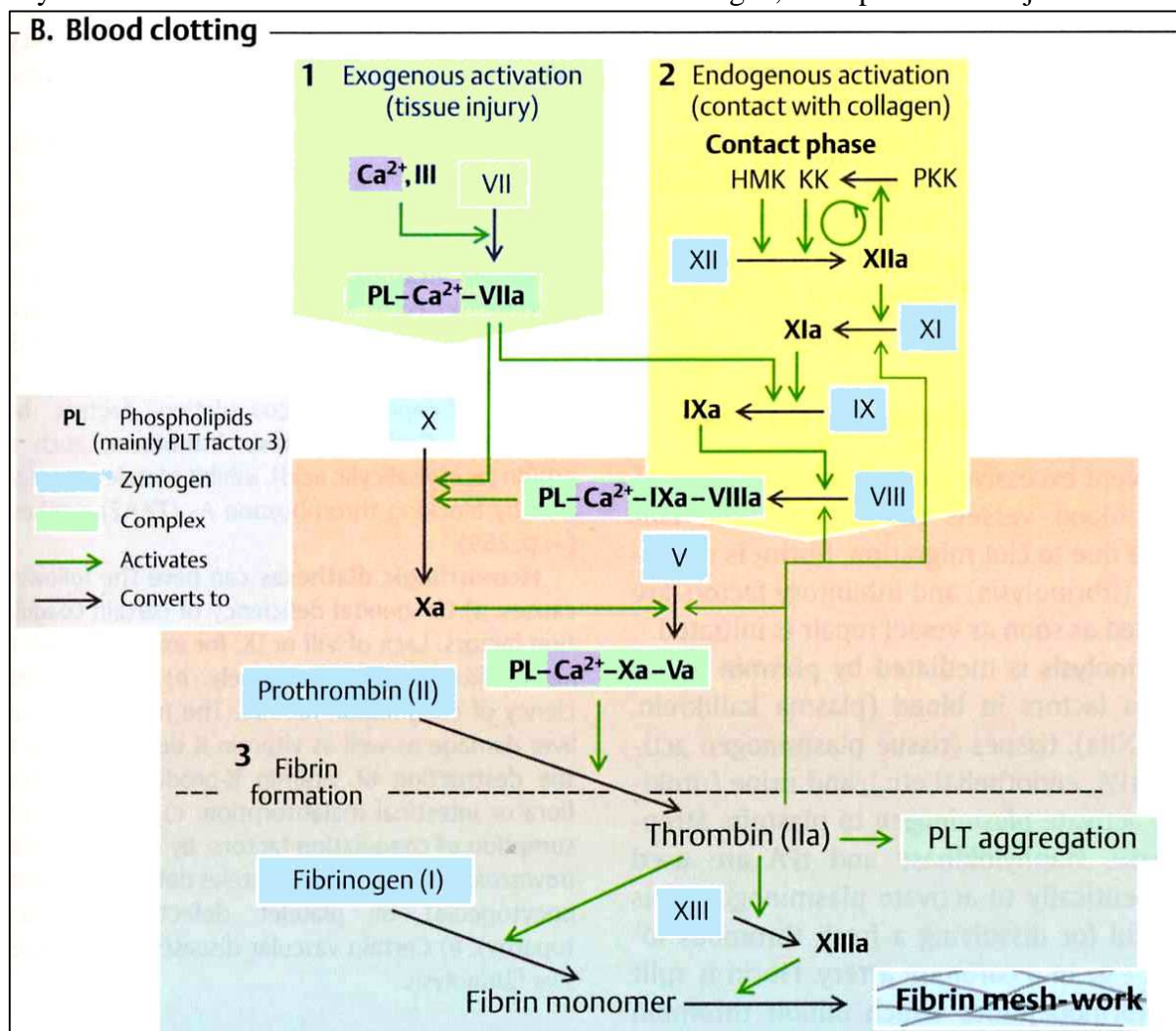
Az alvadási folyamat sajátosságai közé tartozik, hogy néhány proenzim nagyon lassan ugyan, de spontán is aktiválódik. Aktív alvadási faktorok ezért rendszeresen találhatóak a vérplazmában, de nagyon kis mennyiségűk, valamint az azokat semlegesítő mechanizmusok kö-

vetkeztében sérülés nélkül nem indítanak meg alvadáást. A keringésben jelen lévő aktív proteázok viszont sérülés esetén helyben segítik elő a további enzimaktiválást.

A sérülés helyén az alvadási folyamatot a vér és a sérült szövet találkozása indítja meg. Az in situ alvadáshoz vezető lépések az *extrinsic*, külső indítású út elnevezést kapták:

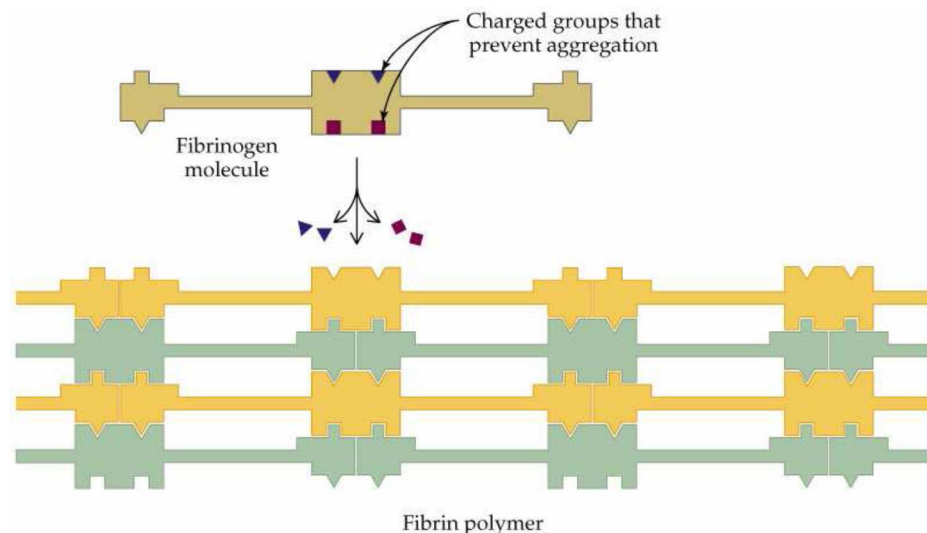
A szöveti sérülések, sebészeti beavatkozások alkalmával a vér közvetlenül érintkezik az endothelium (=az érfal belső rétege) sérülése következtében hozzáférhetővé váló anyagokkal. A véralvadási kaszkád *extrinsic* útját a szöveti sejtekben található egyik membránprotein, a szöveti faktor (III), valamint a vérplazma VIIa faktora egymásra hatása indítja meg. A VIIa faktor az inaktív VII faktorból a vérplazmában nyomnyi mennyiségben jelen lévő (spontán aktiválódott) Xa faktor hatására keletkezik. A VIIa önállóan rendkívül kevésbé hatásos, keletkezésének következménye nincs. A sebzett felületen a VIIa a hozzáférhetővé vált szöveti faktorhoz kötődik. Az így kialakult komplex már aktív; a komplex további VII. faktor molekulákat aktivál VIIa-vá, és ettől kezdve jelentős sebességgel alakul ki a szöveti faktor-VIIa-komplex. A folyamat autokatalitikus, önmagát gyorsítja, katalizátora maga a reakcióban keletkezett termék. A szöveti faktor-VIIa-komplex közvetlenül, egyetlen lépésben is átalakíthatja a X. faktort Xa faktorrá, de az átalakulásnak egy másik útja is van.

Az *intrinsic*, belső indítású a folyamatban csak a vér saját anyagai szerepelnek, külső tényezők - mint az *extrinsic* úton a szöveti faktor - nem. Az érfal sérülésénél a vér alvadását a kötőszöveti kollagénnel való érintkezés indítja meg. A reakciósorozat során ugyanúgy Xa faktor keletkezik, mint az *extrinsic* úton, de több lépésben és más faktorok közreműködésével. A folyamat a kontakt fázissal kezdődik. E fázisban a kollagén, a vérplazma fehérjéi közül két



proenzim (a XII. faktor és egy sokfunkciós proenzim, a prekallikrein), továbbá egy vivőfehérje, a nagy molekulájú kininogén szerepel. A kontakt fázis megindulásakor a plazmatényezők a felületen találkoznak. A XII. faktor az felületen aktiválódik, és ezzel egy autokatalitikus aktiválási folyamat veszi kezdetét. A kialakult XIIa a kininogénnel együtt adszorbeált prekallikreint, a keletkezett kallikrein pedig újabb XII. molekulákat alakít át XIIa-vá. A XIIa-nak másik szubsztrátja az ugyancsak a kininogénhez adszorbeált XI. faktor, amelyet XIa-vá aktivál. A kialakult XIa közvetlenül aktiválja a IX. faktort IXa-vá. Az IXa pedig alternatív módon aktiválja a X. faktort. Ez az alternatív út több tényezőt igényel, mint az előbb leírt. Mind a IXa, mind a X. faktor Ca^{2+} jelenlétében az aktivált tromboцитák foszfolipid (PL) membránfelületéhez kötődik. Egy regulátorfehérje, a VIIIa faktor biztosítja az enzim és szubsztrátja megfelelő térbeli elrendeződését. A kialakuló aktivátor-komplex (tenáz komplex) tehát a IXa, a VIIIa, faktorokból, a tromboцитa foszfolipidból és Ca^{2+} ionokból áll, amihez szubsztrátként kapcsolódik a X faktor. (A kémcsőbe levett vér megalvadása is az *extrinsic* úton megy végbe. A kémcsőbe levett vér alvadását a kollagén helyett az üveg negatív töltésű felülete váltja ki. Ha azonban a kémcső belső felületét néhány mikronos vastagságú szilikon réteggel vonjuk be, az alvadás nem indul meg. Ennek oka, hogy a szilikonok felülete hidrofób, a vér alkotói csak nehezen, vagy egyáltalán nem tudnak megtapadni rajta.)

A kialakult Xa faktor alakítja át protrombint trombinná (II→IIa). Az átalakulás résztvevői szintén aktivátor komplexet képeznek, ez azonban különbözik az előzőekben említett tenáz komplextől. Ebben az összeállításban az aktív enzim a Xa, a szubsztrát a protrombin; a regulátorfehérje, ami az enzim-szubsztrát megfelelő elrendezését biztosítja, az Va faktor. Az aktivátor komplex Ca^{2+} jelenlétében ez esetben is a tromboцитa-membrán foszfolipid felületén alakul ki. A létrehozott trombin a fibrinogénból kisebb ionos peptideket hasít le, ezáltal jönnek létre a reakcióképes fibrin monomerek. Ezek lineáris kötegekbe rendeződve rögzülnek egymáshoz. A második lépés a fibrin szálak térhálósítása keresztkötések kialakításával. Az aktív trombin proteolízissel aktiválja az inaktív XIII (Laki-Lóránd) faktort, és a XIIIa az egyes fibrin szálak között stabil kovalens kötést hoz létre, fibrinhálóvá térhálósítja a lineáris polimereket.



A trombinnak ezen kívül szerepe van a regulátorfehérjék aktiválásában: Mind a VIII., mind az V. csak előzetes aktiválást követően vesz részt a megfelelő aktivátor-komplex kialakításában; mindkettő aktiválásában a trombin szerepel. Az átalakítást kezdetben a vérplazmában nyomnyi mennyiségben jelen lévő trombin végzi, és a továbbiakban az alvadási folyamatban keletkező trombin és a Xa faktor folytatja.

A többlépcsős, konsekutív folyamat biológiai erősítőként működik. Egy parányi kis változásból a folyamat végére komoly anyagmennyiségek átalakulása következik be. Ezt jól szemlélteti a folyamat elején, közepén és végén működő fehérjék normális koncentrációja a vérben:

XII faktor	–	10 ppb
↓		
IX faktor	–	3-5000 ppb
↓		
Fibrinogén	–	4.000.000 ppb

Ez annak köszönhető, hogy a faktorok (nagyreszt) enzimek, és egy enzim molekula sok szubsztrát molekulát képes rövid idő alatt átalakítani.

E rendkívül összetett, hosszú evolúciós folyamatban kialakult rendszerben egyetlen elem hibája vagy hiánya is életveszélyes állapotot idézhet elő (vérzékenység ↔ trombózisveszély). A faktorhiány felismerése révén megnyílik a lehetőség, hogy a hiányzó molekula bevitelével helyreállítsuk a rendszer normális működését és elháríthassuk a veszélyeket. A kérdéses fehérjék előállítására két út adódik:

- Izolálás donorok vérplazmájából
- Előállítás rekombináns fehérjeként fermentációs úton

Ebben a fejezetben az első gyártási módszerrel foglalkozunk.

A plazmából (FFP) vírusinaktivált véralvadási faktorkészítményeket állítanak elő. Ezek intravénásan alkalmazható, speciális vérzéscsillapító, tisztított, liofilizált szerek, melyeknek faktoraktivitása az FFP-vel szemben magas és pontosan ismert. Vírusbiztonságuk egyrészt a donorok szűrésén, másrészt a végtermék vírusinaktiválásán (kettős: fizikai + kémiai módszerek a burkos és nem burkos vírusok ellen) és PCR módszerű végtermék ellenőrzésen alapul. Hemofília esetén a készítmények adagolása a faktorhiány mértékétől, a vérzés helyétől és kiterjedésétől függ.

A faktorok közül legnagyobb piaci súlya a F-VIII-nak és F-IX-nek van. Ezek képződésének veleszületett hiánya (hemofília A és B) állandó, élethosszig tartó rendszeres adagolást tesz szükségessé. Vérzékeny betegek kezelésére alkalmazható véralvadási faktorkoncentrátumok:

F-VIII koncentrátumok:

Humafaktor 8	(Humán Bioplazma, Gödöllő)
Haemoctin SDH	(Biotest)
Hemofil M	(Baxter)
Immunate	(Baxter)
Haemate P	(Behring)

F-IX koncentrátumok:

Humafaktor 9	(Humán Bioplazma, Gödöllő)
Immunine	(Baxter)

Többkomponensű készítmények:

Prothromplex Total/STIM : FII, FVII, FIX, FX	(Immuno)
Prothromplex TIM: FII, FIX, FX	(Immuno)
Beriplex	(Behring)

Egyéb faktorkonzentrátumok:

FI: Haemocomplettan	(Behring)
FXI: Hemoleven	(LFB) (hazánkban nem áll rendelkezésre)
FXIII: Fibrogammin	(Behring)

Vírusmentesítési eljárások

Az eddigiek során többször említésre kerültek vírusmentesítési, vírusinaktiválási technológiák. Ezeknél az alapprobléma minden esetben a szelektivitás, azaz a vírusok anyagait károsító beavatkozások ne inaktiválják a hatóanyagot is. A nukleinsavak sokkal stabilabbak, mint a fehérjék, mégis a virulenciát hordozó nukleinsavakat kell inaktiválni úgy, hogy a jelen lévő fehérje termék ne károsodjon.

A fertőző ágensek számának alacsonyan tartása minden termékénél fontos szempont, de kiemelten kell kezelni a gyógyszeripari termékeknél, ezen belül is azoknál, amelyek gyártása során potenciális vírus-hordozókkal, humán vagy emlős sejtekkel, szövetekkel dolgoznak (állati szövettenyésztés, vérkészítmények). Így ez a rövid áttekintés sok technológiában használatos lépéseket tárgyal, nem csak a szűken vett plazmafehérjékre érvényes. A műveletek az alkalmazott hatások szempontjából csoportosíthatók:



Inaktiválás hőkezeléssel










A hővel végrehajtott sterilizálás nagyon sok iparágban (fermentációs ipar, élelmiszeripar) nagy méretekben is általánosan elterjedt művelet. A vírusok célzott elölésénél viszont erősen behatárolja a gyenge szelektivitás. A fehérjék kímélése érdekében csak pasztörözést (maximum 100 °C-os hőkezelést) alkalmaznak, de sokszor hosszabb ideig. A mikrobiológiai gyakorlathoz hasonlóan megkülönböztetjük a száraz és nedves hőkezelést (gőztérben, illetve forró levegőben). Néhány konkrét példa:

Albumin	nedves hő, 10 óra, 60 °C
F-VIII	száraz hő, 72 óra, 80 °C
F-VIII	száraz hő, 30 perc, 100 °C

Ezekkel a paraméterekkel a különböző vírusok száma 5-7 nagyságrenddel csökkent. A hőkezelés a lipidburok nélküli és lipidburokkal rendelkező vírusok széles csoportjára egyaránt hatékony, ugyanakkor a tok nélküli RNS vírusok ellenállóbbak.

Vírusok eltávolítása

A vírusok szuszpenziót alkotnak, lebegő szilárd részecskék a fehérjeoldatban. Megfelelő pórusméretű szűrőkkel kiszűrhetők a folyadékból. A méretarányokat szemlélteti az alábbi ábra:

HIV	EBV	HCV	HBV	BVDV	Polio	HAV	Parvo	Filter
								
80-110 nm	> 80 nm	> 45 nm	> 42 nm	> 40 nm	28-30 nm	22-30 nm	18-22 nm	20 nm

A kis méret gondot okoz, hiszen a szokásos mikrobiológiai sterilszűrők pórusmérete 0,22 – 0,45 mikron, itt ennél egy nagyságrenddel kisebbre van szükség. Ezek a szűrők már átmenetet jelentenek a mikroszűrők és az ultraszűrők között. A szűrést gyakran megnehezíti a fehérjeoldat nagy viszkozitása.

Vírusok elválasztására alkalmasak még a kromatográfiás műveletek is, így a géلكromatográfia (kizárásos kromatográfia), amely ez előzőekhez hasonlóan méret szerint választ el. A vírusokat megfelelő tölteten végrehajtott adszorpcióval, esetleg kicsapással (PEG) is eltávolíthatjuk.

Kémiai módszerek

Szolvens-detergens eljárás

Valójában nem játszódik le kémiai reakció, a vegyi anyagok leoldják, „leszappanozzák” a vírusok burkát. Szolvensként jellemzően TNBP-ot (tri-n-butil-foszfát, 0,3-1,0%), detergensként Triton X-100-at vagy Tween-t (szintén 1%) alkalmaznak. Adagolás után az elegyet 30° C-on kevertetik 1-4 órán keresztül. (Egyes vírusokra 2-10 perc is elegendő.) A kezelés után a hozzáadott szerves anyagokat el is kell távolítani az elegyből. Ezt extrakcióval oldják meg. Halogénezett, vagy kőolajszármazék oldószerek nem jöhetnek számításba, ezért tisztított, steril növényi olajat (szójaolaj, ricinusolaj) használnak egy vagy két extrakciós lépcsőben. Végül a maradék apoláris molekulákat hidrofób töltetű oszlopon (C18) kötik meg. Sajnos ez a nagy hatékonyság nem érvényesül a burok nélküli vírusoknál.

β -Propiolakton

Feszített gyűrűs szerkezetű erős alkilezőszer, mind a fehérjékkel, mind a nukleinsavakkal reakcióba lép. Ennek dacára széles körben alkalmazzák, mert a fehérjék aktivitáscsökkenése sokkal kisebb mértékű, mint a vírusok inaktiválódása. Előnye, hogy bár közvetlenül veszélyes, rákkeltő hatású, de vizes közegben fél-egy nap alatt elhidrolizál és ártalmatlan hidroxipropionsav lesz belőle.

Fotokémiai módszerek

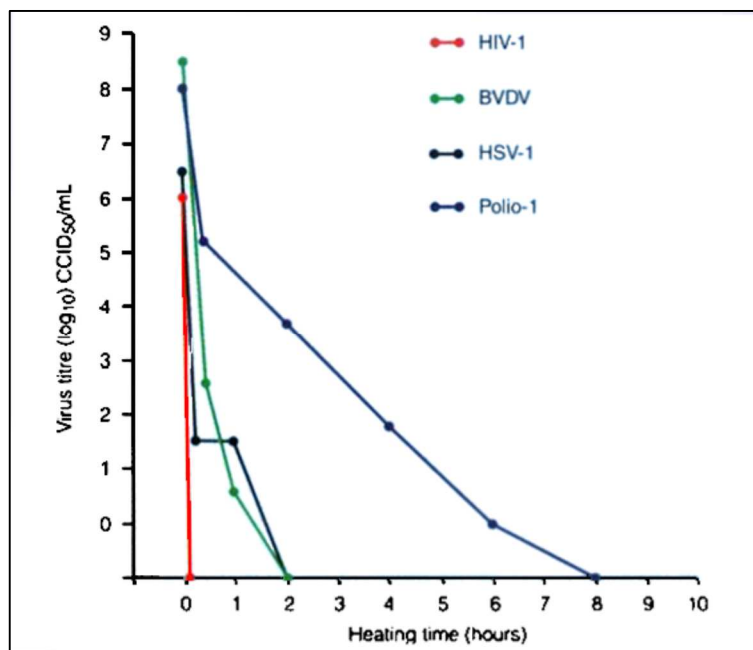
Az ultraibolya fény önmagában is mutagén hatású, a DNS-en a funkcióra káros kémiai változásokat idéz elő. Ez a hatás fokozható, ha olyan gerjeszthető molekulákat viszünk be a rendszerbe, amelyek az elnyelt energia átvitelével károsítják a DNS-t. Ilyen célokra metilénkékét, Psoralent vagy Hypericint alkalmaznak. Ezeknél figyelembe kell venni, hogy a kezelés után szennyező szermaradványok és bomlástermékek maradhatnak a közegben.

Hangsúlyozni kell, hogy a célzott vírusszám csökkentő műveletek mellett a komponensek elválasztásra alkalmazott műveleteknek is van számottevő hatása. Az alkoholos kicsapás, a pH-változtatás és a kromatográfiás lépések mind inaktiválják, vagy eltávolítják a vírusok egy részét.

A vírusmentesítés hatékonyságát log-ban fejezik ki, ez az $N_{végső}/N_{kiindulási}$ érték tízes alapú logaritmus. Egy log az élő víruskoncentráció egy tizedére való csökkenését fejezi ki (ld. a konzervek sterilizálásánál használatos tizedelési idő fogalmát). 5-6 log-nyi csökkenés tehát 5-6 nagyságrendnyi vírusszám redukciót jelent. Az egymást követő technológiai lépések log értékei összeadódnak. A szigorú szabályozás szerint a teljes műveletsor eredő log értékének 10 – 20 között kell lennie.

A köztes és végső minták vírusszámát legérzékenyebben PCR-rel lehet meghatározni, de nehézséget okozhat az életképes és az inaktivált vírus DNS megkülönböztetése.

A gyártási technológia egyes lépéseinek vírusszám csökkentő hatását validációs vizsgálatokkal bizonyítják. Ez azt jelenti, hogy egy mintát szándékosan megfertőznek ismert fajtájú és számú vírussal, majd az adott művelet végrehajtása után visszamérik a megmaradt aktív vírusokat.



Beriplex P/N (F-IX) pasztörizációs vírusinaktiválásának kinetikája

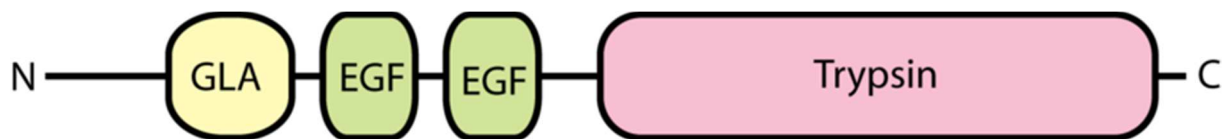
A F-IX ÉS ELŐÁLLÍTÁSA VÉRPLAZMÁBÓL

A véralvadási kaszkád egyik tagja a *faktor IX* fehérje, amelyre a véralvadás folyamatához minden embernek szüksége van. Örökletes hiánya a B típusú hemofília betegség, ami a

IX-es faktor teljes, vagy részleges hiányát jelenti. Kezelésére nagy tisztaságú IX-es véralvadási faktort kell adagolni a páciensnek – ennek gyártását tárgyaljuk esettanulmányként.

A IX-es véralvadási faktor sok vérfehérjéhez hasonlóan a májban szintetizálódik, egy-láncú glikoprotein, molekulásúlya 56 000 D. Normál koncentrációja a plazmában 3-5 µg/ml.

A IX-es faktor 415 aminosavból áll, az aminosavak sorrendje ismert. A fehérje kb. 20% szénhidrátot tartalmaz. A fehérje több jól elkülöníthető szakaszból, doménből áll. Biokémiai aktivitására nézve ez egy tripszin típusú szerin proteáz, funkcionális része a C terminálison található tripszin domén. Az N-terminálison elhelyezkedő Gla-domén egyéb aminosavak mellett 12 γ-karboxi-glutaminsav (Gla) egységet tartalmaz. A Gla gyökök intramolekuláris kalcium-hidakat képeznek, amelyek nélkülözhetetlenek a fehérje konformáció kialakulásához és a membránfelszínhez való kötődéshez. A két EGF (Epidermal Growth Factor) doméneken egy másik szokatlan aminosav, hidroxizsánsav található. A véralvadásban szerepet játszó II-es, VII-es és IX-es véralvadási faktor, valamint a gátló C és S protein homológ szerkezetűek. Felépítésükben közös a 45 aminosavból álló N-terminális Gla-domén.

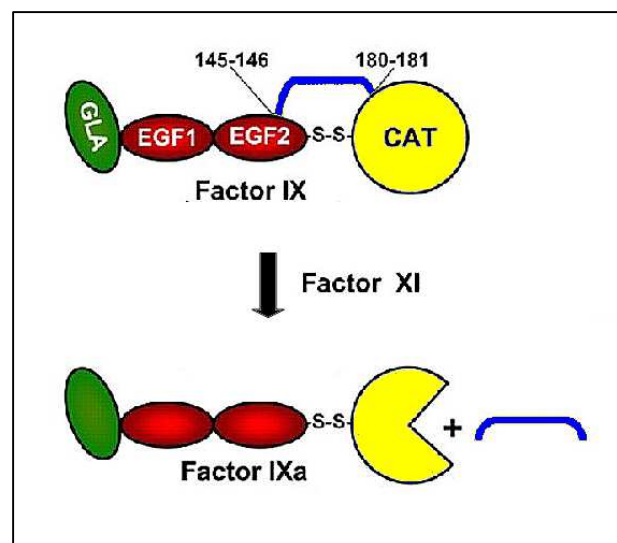


A plazmafehérjék ezen csoportjának teljes szintéziséhez K-vitaminra van szükség, ezért nevezik ezeket K-vitamin függő fehérjéknek. A Gla doménben a glutaminsav gyököket a korai transláció során egy K-vitamin függő speciális enzim gamma-karboxilezi. K-vitamin-hiányban ennek elmaradása miatt alvadási zavar következik be. A K-vitamin zsírban oldódó vitamin, felszívásához epesavas sók jelenlétére van szükség: ha az epetermelés zavart, vagy az epesavas sóknak a bélbe ürülése akadályozott, felszívódási K-vitamin-hiány jön létre.

A IX-es faktor alapállapotban az egyik legstabilabb véralvadási faktor. Féléletideje a vérkeringésben 18-24 óra. In vitro a normál plazma közegében vagy koncentrált terápiás szer formájában szobahőmérsékleten órákig megtartja aktivitását. Ez a fehérje is előanyag (proenzim, zimogén) formában képződik, csak akkor aktiválódik, ha beindul a véralvadás. Aktiválása szelektív proteolízissel történik, a XI faktor kihalásából belőle egy kis peptidet. A fehérje kettéválik egy könnyű és egy nehéz láncra, amelyeket egy diszulfid kötés tart össze. Ez az aktivált forma pH 7 és 9 között viszonylag stabil, de redukáló közegben, például ditioneitol hatására a diszulfid-kötés felbomlik, amitől az enzim elveszti az aktivitását.

A hemofília-B betegség

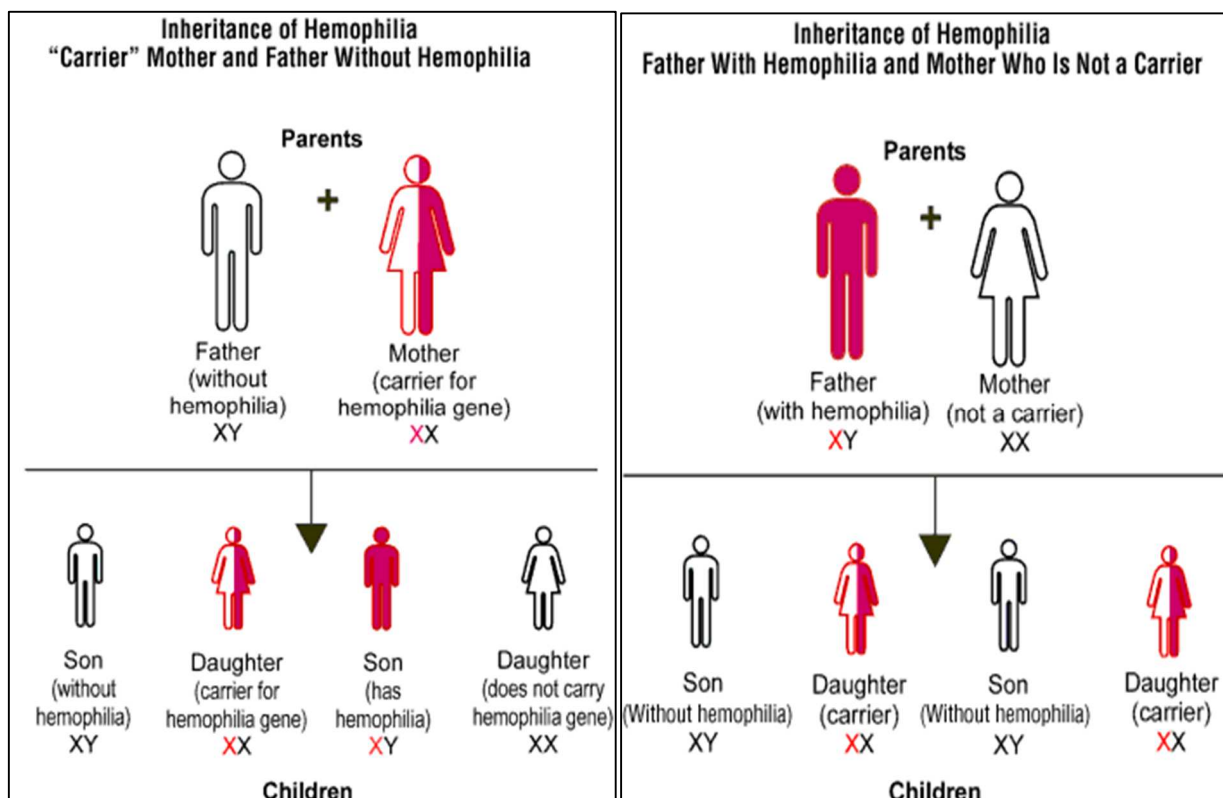
A IX-es faktort nevezik Christmas faktornak, valamint antihemofiliás faktor-B-nek is. Utóbbi elnevezések a faktor részleges vagy teljes hiánya esetén kialakuló betegségekre utalnak. A IX-es faktor a normál plazmában viszonylag állandó mennyiségben van jelen. A normál populáció nagy részében a IX-es faktor szintje az átlagos szint 80-120%-a.



Hiánya vérzékenységi hajlamot okoz, a betegség neve *hemofília B*, vagy Christmas betegség. A B betű a IX faktor hiányára utal. (A *hemofília A* a VIII-as faktor hiányát jelenti.) A klinikai tünetek visszatükrözik a faktor koncentrációját. Súlyos hemofília esetén a plazma véralvadási IX faktor tartalma kevesebb, mint 1%-a a normálisnak, közepesen súlyos esetben 1-4%-a, míg enyhe hemofília esetén 5-25%-a.

A *hemofília B* nemhez kötött öröklődő betegség. A IX-es faktor szintéziséért felelős gén, mely *hemofília B* esetén hibás, az X (női) kromoszómán helyezkedik el. A B típusú hemofília recesszív jellegű, tehát a betegség nem expresszálódik, ha a normális allél is jelen van. Emiatt a *hemofília B* csak férfiakat betegít meg, egy hemofiliás férfinak egy hibás X és egy egészséges Y kromoszómája van. Ha egy hemofiliás férfinak és egy két normál X kromoszómával rendelkező nőnek utódai születnek, minden lányuk hemofília hordozó lesz (ők egy hibás X kromoszómát örökölnek az apától és egy egészséges X kromoszómát az anyától), míg a fiaik egy Y kromoszómát örökölnek az apától és egy egészséges X kromoszómát az anyától így a betegséget nem is örököltik tovább. Tehát egy hemofiliás férfi gyerekei közül a fiúk 100%-os biztonsággal egészségesek, míg a lányok 100%-os biztonsággal hemofília hordozók. A hordozó nőknél általában nincsenek vérzékenységi tünetek, de lehetnek hemofiliás fiúgyermekük. Ha egy hemofília hordozó nőnek - akinek tehát egy beteg és egy egészséges X kromoszómája van - és egy egészséges férfinak gyermekei születnek, a fiaik 50-50%-ban egészségesek vagy hemofiliások, a lányaik pedig ugyanilyen arányban hordozók, vagy nem hordozók.

Ritkán, az úgynevezett sporadikus esetekben, amikor egy új mutáció fellépése okozza a betegséget, a hemofiliának nincs családi története.



A genetikai eredetű vérzékenység öröklődése

A betegség kezelése intravénás plazma, vagy IX-es faktorban gazdag plazmafehérje koncentrátum transzfúziójával történik. Alternatíva a faktor előállítására rekombináns fehérje-

ként is. Ma már a biotechnológiai úton előállított rekombináns faktor IX preparátum számottevő mennyiségben van jelen a piacon.

Izolálás vérplazmából

A Humafactor-9-et egészséges donorok HBsAg-, anti-HCV, anti-HIV-1- és anti-HIV-2-negatív plazmájából nyerik. A gyártásra csak akkor kerülhet sor, ha a poolból vett minta a vírusvizsgálatokkal negatív eredményt ad.

A gyártás egy 1500 literes plazmapoolból indul, egy félig zárt rendszerben zajló, hosszú folyamat, amelynek első lépése a felszabadított (= a vizsgálatok alapján felhasználhatónak minősített) fagyasztott plazma olvasztásával kezdődik. Ha a megfagyasztott vérplazmát lassan melegítik fel +4°C-ra, akkor a plazmafehérje frakció egy része csapadék alakjában marad, ez az ún. „krioprecipitátum”. A csapadékot centrifugálással választják el. A kilences faktor a kriocsapadék felülúszójában található, sok más fehérjével együtt. A feladat tiszta IX-es faktor izolálása, azaz a jelen lévő egyéb fehérjék elválasztása. Ezek biológiailag aktív és akár gyógyszerként is használható értékes anyagok, amelyeket nem lenne helyes szennyezésnek nevezni, viszont ebben a készítményben feleslegesek, sőt károsak is lehetnek.

Az első lépés egy gélkromatográfia, ami a molekulákat méretkülönbségük alapján választja el. Ennek egy frakcióját viszik tovább ioncsere kromatográfiára. A DEAE-Sephadex A50 oszlopról a II-es, VII-es, IX-es, X-es faktorok együtt eluálódnak, és ez a frakció még proteín C-t, proteín S-t is tartalmaz. Ezek együttesét nevezik Protrombin Komplex Koncentrátumnak (PCC). A következőkben a II, VII, X faktorokat és ezek aktivált formáit távolítják el. A megfelelően ellenőrzött tisztításnak azért van nagy jelentősége, mivel a maradék faktorok és azok aktivált formáinak jelenléte nem eléggé körültekintő alkalmazás esetén tromboembóliás szövődmények kialakulásához vezethet. E faktorok szintje a B hemofiliások vérében normális, és ha a IX-es faktor készítménnyel együtt a ezekből további mennyiséget juttatunk be, akkor az a normális fölé emeli az alvadási faktorok koncentrációját, ami fokozza alvadási hajlamosítást és vérrögképződéshez vezethet.

Stabilizáló anyagok hozzáadása után kerül sor a vírusmentesítésre. A célzott vírusszámcsökkentő eljárás (10 órás hőkezelés 60 °C-on) a lipid burok nélküli és lipid burokkal rendelkező vírusok széles csoportjára egyaránt hatékony. A gyártási technológia egyes lépéseinek vírusszám csökkentő hatását validációs vizsgálatokkal bizonyították.

Ezt követően több fehérje kicsapási lépés következik, amelyek célja a szennyező komponensek eltávolítása a IX-es faktor mellől. A csapadékot lecentrifugálják, majd a felülúszót ultraszűrő berendezésen diaszűrjük és koncentrálják. Az oldat már csak két fő komponest, IX-es és X-es faktort tartalmaz. Ezek elválasztása affinkromatográfiával történik. A Na-heparin Fractogel tölteten a IX-es faktor szelektíven és nagy affinitással megkötődik, a X-es faktor viszont nem, így a mosó pufferrel távozik az oszlopról.

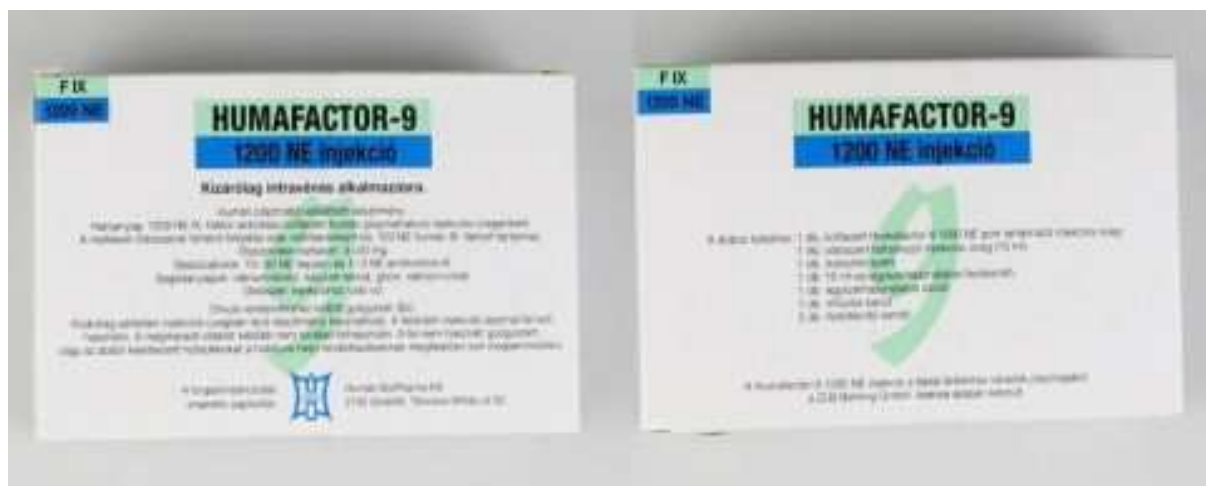
Affinkromatográfia során az aktív célmolekula kötődik a tölteten rögzített ligandumhoz. A IX-es faktor gyártási folyamatában használt gél ligandként heparint tartalmaz. A kötés során a gélen lévő heparin magához köti a IX-es faktort, a célterméket. A heparin egy lineáris és sok szulfátcsoportot tartalmazó glükóz-aminoglikán, melynek antikoaguláns (véralvadásgátló) tulajdonságai vannak. Alapláncában D-glükózamin és D-glükuronsav kapcsolódik egymáshoz 1-4 glikozidos kötésekkel. Sok hidroxil- és amino csoportja szulfonált. Kis mennyiségben egyéb cukrokat (galaktóz, xilóz) és aminosavakat (pl. szerint) is tartalmaz. A kötött heparint széles körben alkalmazzák a biológiai anyagok affinkromatográfiás tisztításához. A folyamatban háromféle puffert használnak, egy kötő, egy mosó és egy eluáló puffert. Az elúciónál a puffer ionerőséget, vagyis sókoncentrációját növelik. Ebben a lépésben citrát puffert (pH=7,4) használnak, amit ki lehet egészíteni argininnel a IX-es faktor aktivitásának megőrzése érdeké-

ben. Stabilizátorként heparint, antitrombint, illetve egyéb segédanyagokat, pl. a másik bázikus aminosavat, lizint is lehet használni.

Az elúciót követően a IX-es faktor hatóanyagot tartalmazó oldatban ultraszűrő berendezésben diaszűréssel lecserélik a puffert, majd bekonzentrálják. A hatóanyag tartalom alapján beállítják a kívánt végső koncentrációt. Mikrobiológiai tartósítószer nem alkalmazható. A fajlagos aktivitás – a stabilizáló fehérje esetleges hozzáadása előtt – legalább 50 NE IX. faktor az összes fehérje 1 mg-jára számítva.

Az oldatot baktériumszűrőn bocsátják át, majd aseptikusan letöltik a végső kiszerelésbe (ampullázzák), majd azonnal lefagyasztják. Ezután fagyasztva szárítják (liofilizálják) és az ampullákat vákuumban vagy inert gáz alatt zárják le. A hatóanyagot nagy tisztaságban tartalmazó termék Humafactor-9 néven kerül forgalomba. A Humafactor-9 faktorkoncentrátum intravénásan alkalmazható vérzéscsillapító szer hemofília-B kezelésére.

A készítmény hatóanyaga:	plazma eredetű humán IX. véralvadási faktor					
Humafactor-9 liofilizátum	300 NE		600 NE		1200 NE	
Összfehérje tartalom	1,25 – 5,00	mg	2,5 – 10,0	mg	5,0 – 20,0	mg
IX-es faktor aktivitás	300	NE	600	NE	1200	NE
Nátrium-heparin	Max 62,5	NE	Max 125	NE	Max 250	NE
Humán Antitrombin III koncentrátum	0,25 – 0,75	NE	0,5 – 1,5	NE	1 - 3	NE
Oldószer:						
Injekcióhoz való víz	2,5	ml	5,0	ml	10,0	ml



A terméket a következő analitikai vizsgálatokkal minősítik:

- a IX. faktor tartalmi meghatározása,
- az aktivált véralvadási faktorok meghatározása,
- a II., VII. és X. faktorok aktivitásának meghatározása; ezek aktivitása bizonyítottan nem lehet több, mint a IX. faktor aktivitásának 5%-a.