


## VÉRKÉSZÍTMÉNYEK, PLAZMADERIVÁTUMOK

Dr. Pécs Miklós



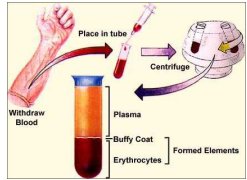
Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem,  
Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

## A VÉR BIOKÉMIÁJA

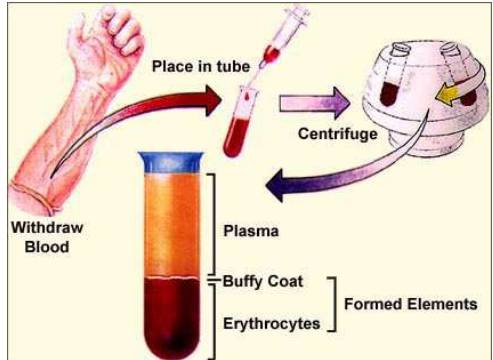
Áramló folyadék, amely anyagokat és hőt szállít a szervezetben belül, és beállítja az állandó belső környezetet a sejtek számára. A sejtközötti folyadékban diffúziós transzport működik, a vér viszont áramlik = konvekciós transzport. Kétirányú: a sejtekhez viszi a tápanyagokat és az oxigént, elszállítja az anyagcseretermékeket, a szén-dioxidot és a hőt.

Lazarostos kötőszövet.  
Mennyisége kb. 5 liter.  
Vér = vérplazma + sejttes elemek  
Vér = szérum + vérlepeny



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

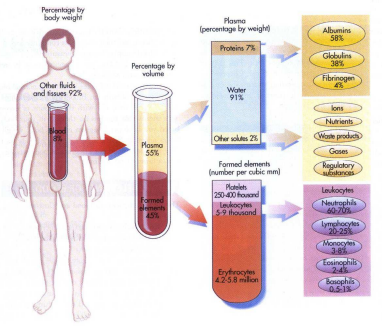
## A VÉR BIOKÉMIÁJA



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

## A VÉR ÖSSZETÉTELE

Összes szárazanyag: 17 %, de térfogatra az alakos elemek 45-50 %-ot tesznek ki.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

## VÉRKÉSZÍTMÉNYEK

```

    Friss teljes vér → Friss vér, buffy coat eltávolítva
    |
    | → Folyékony plazma → FFP → Ipari földolgozás
    |
    | → Buffy coat → Trombocita konc → Fehérvérsejt mentes
    |                                     |
    |                                     | → Fagyasztva tárolt
    |                                     |
    | → Vörösvérsejt koncentrátum → Fehérvérsejt koncentrátum
    |                                     |
    |                                     | → Mosott VVT
    |                                     | → Szűrt, mosott VVT
    |                                     | → Fagyasztva tárolt VVT
    
```

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

## VÉRKÉSZÍTMÉNYEK

Vérkészítmény	Biológiai hatást kifejtő komponens	Tárolás	Lejárat
CPD-s (alvadástgátolt) teljes vér	VVT, plazmafahérjék	+4°C	28 nap
CPD-A(denine)-s teljes vér	VVT, plazmafahérjék	+4°C	28 nap
<b>Vörösvérsejt készítmények</b>			
VVT plazmában vagy adenin tartalmú oldatban szuszpendálva	VVT	+4°C	28-35
Mosott VVT	VVT	+4°C	24 óra
Szűrt, mosott VVT	VVT	+4°C	24 óra
Fagyasztva tárolt, glicerín mentesre mosott VVT	VVT	+4°C	24 óra

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

## VÉRKÉSZÍTMÉNYEK

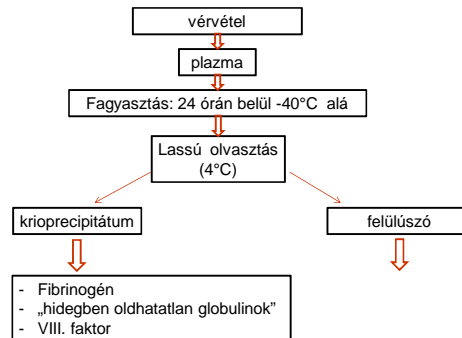
Vérkészítmény	Biológiai hatást kifejtő komponens	Tárolás	Lejárat
<b>Trombocita készítmények</b>			
Trombocita koncentrátum	trombociták	20 - 24°C	5 nap
Fehérvérsejt mentesre szűrt tromb. koncentrátum	trombociták	20 - 24°C	1-5 nap
Fagyasztott, felolvasztott, mosott trombocita konc.	trombociták	Az elkészítés után azonnal	
Fehérvérsejt konc.	granulociták	20 - 24°C	24 óra
<b>Plazmakészítmények</b>			
Friss fagyasztott plazma	Plazmafehérjék és labilis alvadási faktorok	-25°C alatt	1 év
Friss fagyasztott plazma	Plazmafehérjék	-25°C alatt	1 év
Krioprecipitátum	vW faktor, faktor VIII, XIII fibrinogén, fibronectin	-25°C alatt	1 év



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

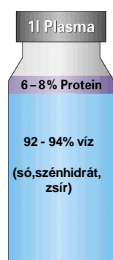
7

## A krioprecipitátum előállítása



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

## PLAZMAFEHÉRJÉK



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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

9

## VÉRFEHÉRJÉK

Több frakció:

**Albumin:** pufferol, beállítja az ozmózisnyomást, N tartalék, apoláros hordozó.

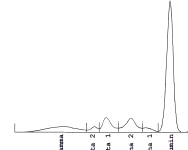
**Globulinok** (α<sub>1</sub> α<sub>2</sub> β<sub>1</sub> β<sub>2</sub>) Gliko- és lipoproteinok, szállító funkció

**γ globulin:** immunfehérjék, antitestek, a fehér vérszettek termelők

**Véralvadási faktorok:** fibrinogén

Szérum fehérje elektroforézis

(on agarose gel, 6. ábracsoport)



Frakciók	%	Normál %	g/l
Albumin	49,1	59,4 - 73,9	
Alpha 1	2,9	1,0 - 3,1	
Alpha 2	11,0	7,0 - 12,2	
Beta 1	9,4	4,9 - 9,4	
Beta 2	2,8	1,6 - 5,6	
Gamma	11,8	6,9 - 14,7	

A/G = 1.64

Normális elektroforétikus minta.

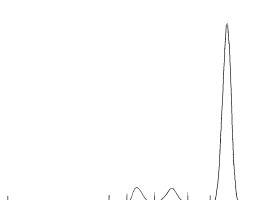


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

10

Szérum fehérje elektroforézis

(on agarose gel, (Hydragel))



Frakciók	%	Normál %	g/l
Albumin	62,1	59,4 - 73,9	
Alpha 1	2,9	1,2 - 3,1	
Alpha 2	11,0	7,0 - 12,2	
Beta 1	9,4	4,9 - 9,4	
Beta 2	2,8	1,6 - 5,6	
Gamma	11,8	6,9 - 14,7	

A/G = 1.64

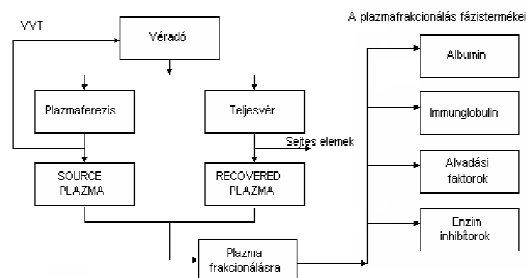
Normális elektroforétikus minta.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

11

## A VÉRPLAZMA FRAKCIONÁLÁSA



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

12

## PLAZMADERIVÁTUMOK

Albumin	Alvadási faktorkok	Immunoglobulinok	Enzim inhibitorok	Egyéb
5% és 20 %-os infúziós oldatok	Faktor VIII, IX, Faktor X, XIII Fibrinogen FI PCC (protrombin komplex koncentrátum) (FII, VII, IX, X, prot S, C) vW faktor Aktivált PCC	16 %-os im. IgG Intravénás IgG Anti-tetanusz Anti-D IgG Anti-CMV IgG Hep B IgG Vesztség ell. Anti varicella IgM gazdag	AntitrombinIII C1 észteráz inhibitor Alfa1-proteináz inhibitor	Fibrin ragasztó



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

13

## 1. ALBUMIN KÉSZÍTMÉNYEK

Termék	Indikáció	Molekul a súly Dalton	Plazma konc. g/l	Kihozatal g/l
ALBUMIN 20%	Ozmózis nyomás emelése	66.000	30-35	22-27
ALBUMIN 5%	Plazma volumen pótlás Nem fehérje pótszer!			
PPS, Plazma Protein Oldat	Plazma volumen pótlás	66.000	33-38	30-32



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

14

## 2. IMMUNGLOBULINOK

Termék	Indikáció	Molsúly D	Plazma konc. g/l	Kihozatal g/l
IgG subcutan	Szubsztitúciós kezelésre primer immunhiányos (PID)szindrómákban: – változó immunhiány – súlyos kombinált immunhiány – IgG alosztály hiány esetén ismétlődő infekciókban	169.000	12	4
IgG iv.	PID, SID, ITP	169.000	12	3-4
Tetanusz IgG	Tetanusz fertőzés megelőzése	169.000		
Anti D IgG	Rh negatív szülő nők	169.000		
Anti CMV IgG	CMV fertőzés megelőzése (transzplantációknál)	169.000		
Hepatítisz B, rubeola, vesztség, kullancs enc.				



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

15

## 3. HEMOSZTATIKUMOK

Termék	Indikáció	Molsúly Dalton	Plazma konc. g/l	Kihozatal %
Faktor VIII	„A” hemofiliások kezelése	300.000	3x10 <sup>-4</sup>	18-22
FVIII + vW fakt.	vWillebrand betegek kezelése	1-4 M		15
Faktor IX	B hemofiliások kezelése	57.000	5x10 <sup>-3</sup>	12-18
F II, VII, IX, X PCC	Orálisan alvadástgátoló betegek kezelése	72.000 50.000 59.000	0,1 5x10 <sup>-3</sup> 10x10 <sup>-3</sup>	15-25
Aktivált PCC	Inhibitoros „A” hemofiliások kezelése			
Fibrinogén FI	Fibrinogén hiány szubsztitúciója	340.000	2,5-4,5	10
Faktor XIII	Sebgyógyulás gyorsítása	320.000	5x10 <sup>-3</sup>	20
Trombin=FIIa	Fibrin aktiváló enzim	72.000	0,1	500 NE/ml

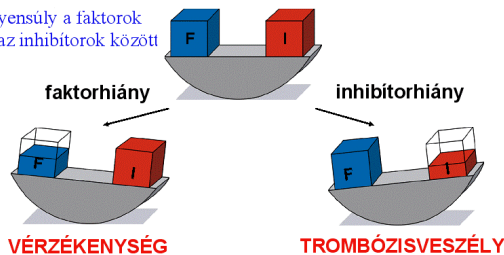


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

16

## MI AZ EGYES FEHÉRJÉK SZEREPE A VÉRALAVADÁSBAN?

Egyensúly a faktorok és az inhibitorok között



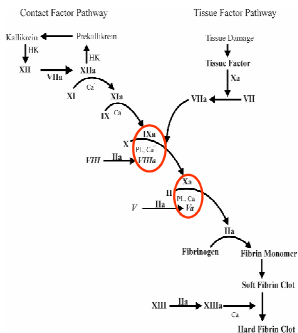
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

17

## ALVADÁSI OLDAL: FAKTOROK

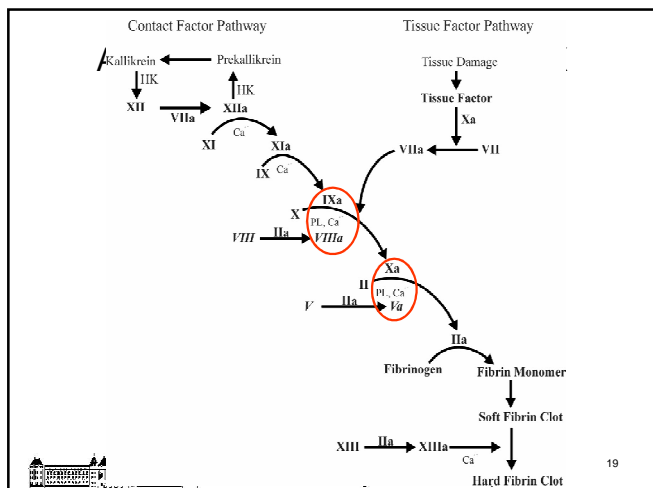
„Kaszád” reakciósor: az egyes lépésekben a faktorok szelektív és részleges proteolízissel aktiválják a következő enzimet.

Két indítási lehetőség:  
Külső (extrinsic) út: a sérülés következtében kívülről a vérbe kerülő anyagok váltják ki  
Belső (intrinsic) út: „szokatlan”, negatív töltésű felület váltja ki, csak a vér belső anyagai vesznek részt.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

18



## VÉRALVADÁS 2.

Biológiai erősítés: parányi kis változsból komoly anyagmennyiség átalakulása lesz:

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

A kétféle alvadási reakciósor a X (Stuart) faktor aktiválásával közösen folytatódik.

Az X<sub>a</sub> faktor a III, IV és V faktorokkal (foszfolipid, kalcium, akcelerín) katalizálja a protrombin → trombin (II → II<sub>a</sub>) átalakulást.

## VÉRALVADÁS 3.

A trombin a fibrinogén → fibrin (I → I<sub>a</sub>) folyamatot katalizálja. A fibrin ezután lineáris kötegekké polimerizálódik, majd a XIII<sub>a</sub> (Laki-Lóránd) faktor térhálósítja.

## TROMBOCITA AGGREGÁCIÓ

Ha az érrendszer valahol megsérül, akkor a sérülés helyén a vérlemezkék a sérült érfalhoz tapadnak, és az odatapadtak közé mindig újabbak rakódnak le. Ha a sérülés kicsi, ez önmagában is elég lehet a lezáráshoz. Ha viszont a sérülés nagyobb, akkor a plazmatikus véralvadás is megindul, és a fibrin tartja össze a lemezkéket.

## 4. INHIBITOR OLDAL

Inhibitor	Gátolt fehérje
Antithrombin III (+heparin)	Thrombin
	F Xa
	F XIIa, F XIa, F VIIa
Protein C és Protein S	F VIIIa
	F Va

A véralvadás gátlása:

- Ca megkötése, oxaláttal vagy citráttal
- heparin (poliszacharid, állati szervekből)
- hirudin (pióca, rec-fehérje)
- kumarin-származékok (rágszállító szer, antidotum: K-vitamin)

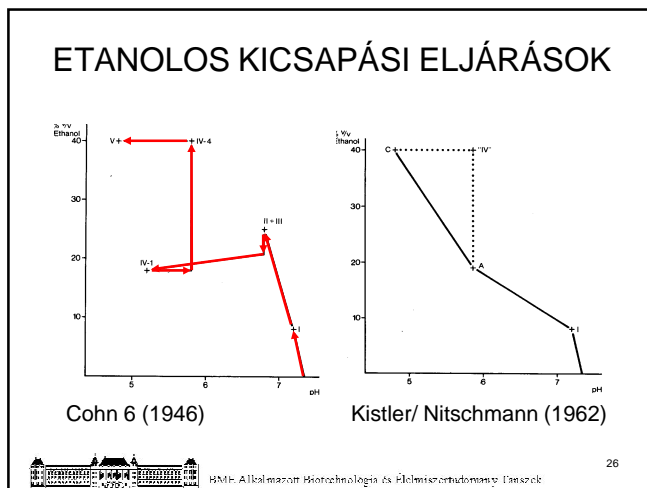
## TECHNOLÓGIÁK

Technológiák kialakulása, fejlődése

- 1940 USA Hadügyminisztérium kutató csoport
- 1941 Pilot Plant laboratórium (Harvard)
- 1946 COHN 6. Method (E.J. Cohn and co-workers J.Am.Chem. Soc. 68. 459-475 1946)
- 1962 KISTLER & NITSMANN Method
- 1960-70 egyéb kicsapószer
- 1970- Kromatográfiai technológia,
- 1970- Alvadási faktorok iv IgG
- 1980- Nagy tisztaságú faktor készítmények
- 1990- Rekombináns készítmények

		Albumin	IVIG	ImIgG	FVIII	F IX	PCC
<b>Plazma pool minősítés</b>							
Plazmaminősítés	Verifikálás	+	+	+	+	+	+
	PCR vizsgálat	+	+	+	+	+	+
<b>Fehérje elválasztás</b>							
Kicsapás	Alkoholos kicsapás	+	+	+	+	+	+
	Kioldás	+	+	+	+	+	+
	Folyadék/szilárd elválasztás	+	+	+	+	+	+
	Szűrés	+	+	+	+	+	+
	adszortív szűrés	+	+	+	+	+	+
Adszorpció kromatográfia	Ionsere	(+)	(+)	(+)	+	+	+
	Immunaффinitás				(+)	(+)	(+)
<b>Vírusinaktiválás/eltávolítás</b>							
Hőkezelés	Pasztörizálás	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	S/D eljárás			(+)	(+)	(+)	(+)
	Nanoszűrés						(+)
<b>Formulálás, készítés</b>							
Adszorpció	adszortív szűrés	+	+	+	+	+	+
Membránszűrés	Dialízis/koncentráció	+	+	+	+	+	+
	Steril szűrés	+	+	+	+	+	+
Stabilizálás	Kémiai adalékok	+	+	+	+	+	+
	Töltés	+	+	+	+	+	+
Szárítás	Aszeptikus töltés	+	+	+	+	+	+
	Liofilizálás		(+)	(+)	+	+	+
<b>Végző inaktiválás</b>							
Hőkezelés	Pasztörizálás	+					(+)
	Szárzshő						(+)
<b>Végtermékminősítés</b>							
Végtermékminősítés		+	+	+	+	+	+

+: alkalmazott művelet, (+): alkalmazható művelet



### COHN 6 PLAZMA FRAKCIÓK

Frakció	Etanol %	pH	Fehérjék
I	8	7,2	Fibrinogén, Faktor VIII, Fibronectin, Komplement komponensek
II-III	25	6.9	IgG, IgA, IgM, Faktor II, VII, IX, X, globulinok
IV-1	18	5,2	$\alpha$ - és $\beta$ -globulinok, AT-III, $\alpha$ 1-antitrypsin, IgM
IV-4	40	5,8	$\alpha$ - és $\beta$ -globulinok, transferrin, ceruloplasmin, haptoglobin
V	40	4,8	Albumin ( $\alpha$ - és $\beta$ -globulinok)

27

### Vírusinaktiválás / eltávolítás

**Fizikai módszerek**

**Inaktiválás hőkezeléssel**

- Pasztörizálás
- Száraz hőkezelés
- Gőzölés

**Eltávolítás**

- Nanoszűrés
- Kromatográfiai módszerek
- Kicsapás

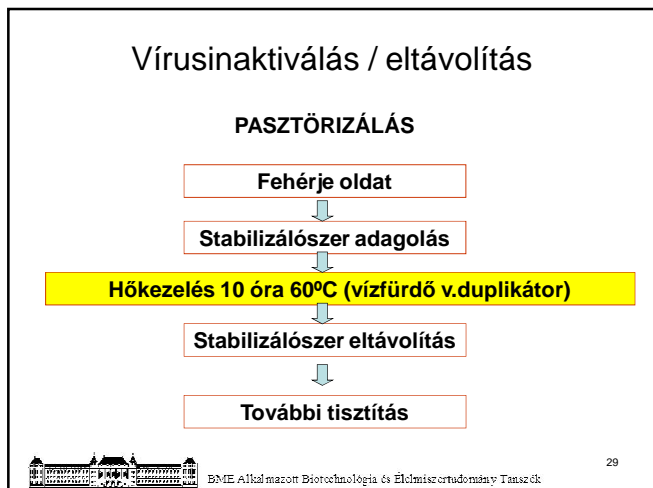
**Kémiai módszerek**

- Solvens – Detergens eljárás
- $\beta$ -Propiolakton
- Jód

**Fotokémiai módszerek**

- Metilénkék
- Psoralen
- Hypericin

28



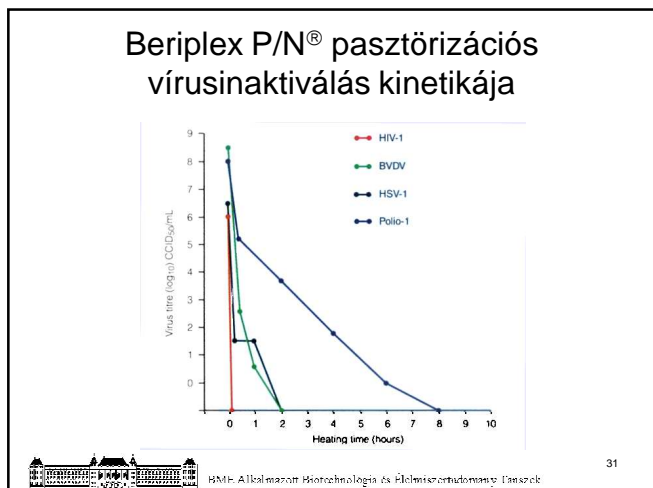
### Vírusinaktiválás / eltávolítás

**SD (SOLVENT-DETERGENT) KEZELÉS**

Solvent: 1 % TNBP tri-n-butyl-foszfát  
 Detergens: 1 % detergens (Triton X-100, Tween)

4 óra 30° C-os hőkezelés  
 Extrakció növényi olajjal (pl. steril szójaolaj)  
 Kromatográfiai tisztítás (C18 tölteten)  
 Ultraszűrés

30



### Beriplex P/N vírusmentesítésének validációs eredménye

Modellvírusok	HIV env.,RNA	HSV env.,DNA	BVDV Mod.f.Hep.C	Polio n.env.,RNA
Pasteurization (log 10)	> 6,6	> 6,0	> 8,5	> 7,9
Nanofiltration (log 10)	> 7,1	> 7,2	4,0	(0,3)
Total reduction (log 10)	> 21,1	19,9	15,5	15,5

**HBV:** Nanofiltration reduction of 4 log  
 Remaining steps > 6,5 log (chimpanzees)  
 Total reduction: > 10 log

HMF Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 32

### Tiszta faktorok gyártása:

**IX-es faktor = antihemofiliás faktor B = Christmas faktor**

Humafactor 9:  
 humán koagulációs IX-es faktor koncentrátum, speciális intravénásan alkalmazható vérzéscsillapító szer hemofília-B kezelésére

HMF Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

### A IX-es faktor a szervezetben

A májban szintetizálódik.  
 Szintéziséhez K-vitaminra van szükség, a vitamin hiányában funkcionálisan inaktív → alvadási zavar  
 Koncentrációja a plazmában 3-5 µg/ml.  
 Az egyik legstabilabb véralvadási faktor.  
 A vérkeringésben félféletideje 18-24 óra.

HMF Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

### A IX-es faktor fehérjeszerkezete

Egyláncú glikoprotein, molekulásúlya 56 000 Dalton.  
 415 aminosavból áll, az aminosavak sorrendje ismert.  
 A fehérje kb. 20% szénhidrátot tartalmaz.

HMF Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

### A IX-es faktor fehérjeszerkezete

Domének:

Gla-domén: az N-terminális szakaszon 12 gamma-karboxi-glutaminsavat (Gla) tartalmaz.  
 EGF (Epidermal Growth Factor) domén: itt egy másik szokatlan aminosav, hidroxi-aszparaginsav található.  
 Ser-proteáz domén: analóg a tripsinnel és a többi alvadási proteázzal.

HMF Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

### A IX-es faktor hiánya

Hiánya vérzéses hajlamot okoz, a betegség neve Hemofília B, vagy Christmas betegség.

A vérzéses tünetek szoros korrelációban vannak a faktorhiány mértékével.

Ha a plazma IX-es faktor tartalma a normálhoz képest:

- < 1% súlyos
- 1-4% közepesen súlyos
- 5-25% enyhe



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

37

### A IX-es faktor genetikája

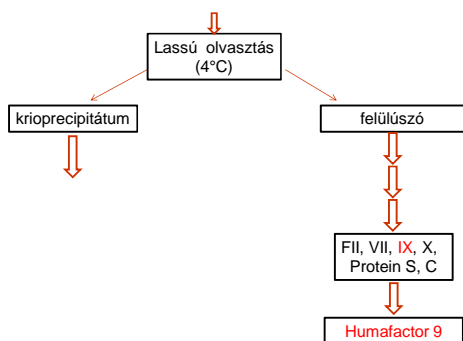
A IX-es faktor gén az X kromoszóma hosszú karján helyezkedik el.

A hemofília recesszív jelleggel öröklődik, tehát a betegség nem expresszálódik, ha a normális allél is jelen van → nemhez kötött betegség, csak férfiakat betegít meg, a nők tünetmentes hordozók.



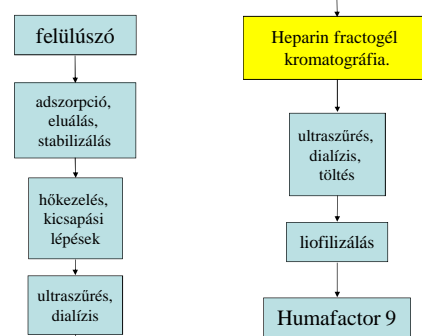
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

### A IX-es faktor izolálása



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

### A IX-es faktor izolálása

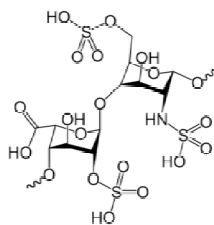


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

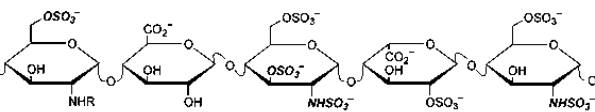
40

### Az izolálás kulcslépése:

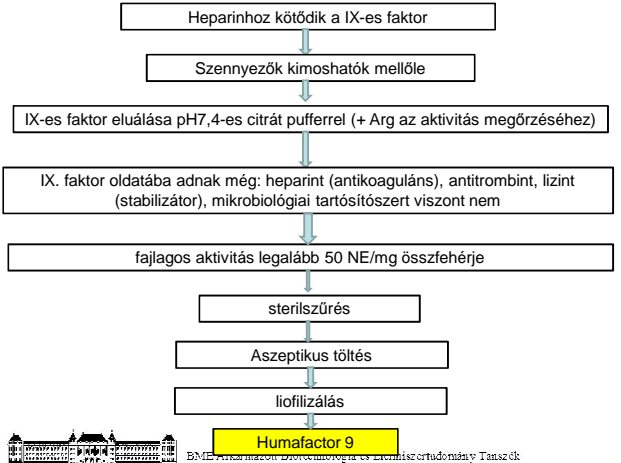
### AFFINKROMATOGRÁFIA



A ligandum a tölteten: heparin



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék



