

VÉRKÉSZÍTMÉNYEK, PLAZMADERIVÁTUMOK

Dr. Pécs Miklós



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem,
Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

1

A VÉR BIOKÉMIÁJA

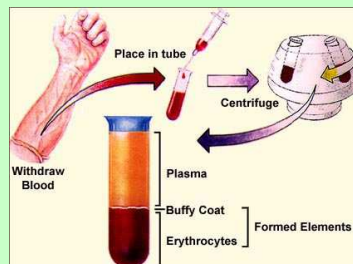
Áramló folyadék, amely anyagokat és hőt szállít a szervezetben belül, és beállítja az állandó belső környezetet a sejtek számára. A sejt közötti folyadékban diffúziós transzport működik, a vér viszont áramlik = konvekciós transzport. Kétirányú: a sejtekhez viszi a tápanyagokat és az oxigént, elszállítja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

Lazarostos kötőszövet.

Mennyisége kb. 5 liter.

Vér = vérplazma + sejt elemek

Vér = szérum + vérlepleny



2



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

A VÉR BIOKÉMIÁJA

The diagram illustrates the process of blood analysis. It starts with 'Withdraw Blood' from a person's arm. The blood is then 'Place in tube' and 'Centrifuge'. The resulting components are shown in a test tube: 'Plasma' (top, orange), 'Buffy Coat' (middle, thin white layer), and 'Erythrocytes' (bottom, dark red), which are collectively labeled as 'Formed Elements'.

3

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

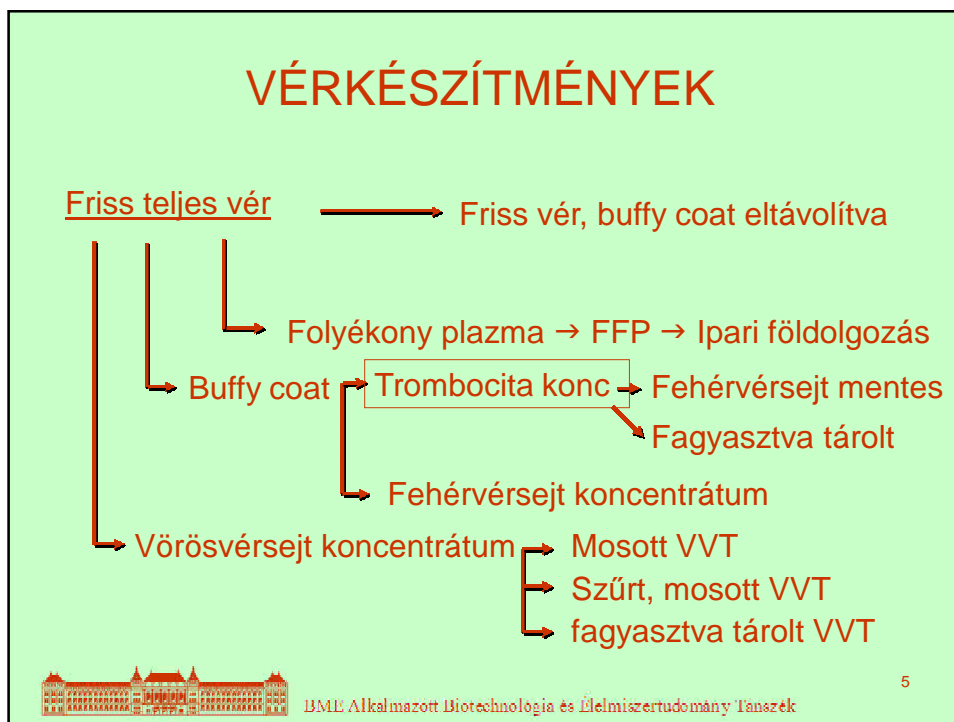
A VÉR ÖSSZETÉTELE

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

The diagram details the composition of blood. It shows a human figure with 'Other fluids and tissues 92%' and 'Blood 8%'. The blood is further divided into 'Plasma 55%' and 'Formed elements 45%'. The plasma is composed of 'Proteins 7%', 'Water 91%', and 'Other solutes 2%'. The formed elements include 'Platelets 250-400 thousand', 'Leukocytes 5-9 thousand', and 'Erythrocytes 4.2-5.8 million'. The leukocytes are further categorized into 'Leukocytes' (Neutrophils 60-70%, Lymphocytes 20-25%, Monocytes 3-6%, Eosinophils 2-4%, Basophils 0.5-1%), 'Albumins 58%', 'Globulins 38%', and 'Fibrinogen 4%'. Other solutes include 'Ions', 'Nutrients', 'Waste products', and 'Gases'.


4

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék



VÉRKÉSZÍTMÉNYEK

Vérkészítmény	Biológiai hatást kifejtő komponens	Tárolás	Lejárat
CPD-s (alvadásgátolt) teljes vér	VVT, plazmafehérjék	+4°C	28 nap
CPD-A(denine)-s teljes vér	VVT, plazmafehérjék	+4°C	28 nap
Vörösvérsejt készítmények			
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, glicerin mentesre mosott VVT	VVT	+4°C	24 óra

 BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 6

VÉRKÉSZÍTMÉNYEK

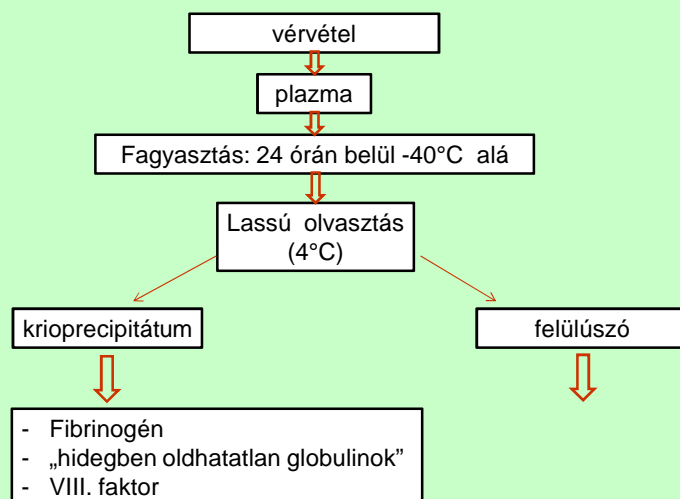
Vérkészítmény	Biológiai hatást kifejtő komponens	Tárolás	Lejártat
Trombocita készítmények			
Trombocita koncentrátum	trombociták	20 - 24°C	5 nap
Fehérvérsejt mentesre szűrt tromb. koncentrátum	trombociták	20 - 24°C	1-5 nap
Fagyasztott, felolvasztott, mosott trombocita konc.	trombociták	Az elkészítés után azonnal	
Fehérvérsejt konc.	granulociták	20 - 24°C	24 óra
Plazmakészítmények			
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

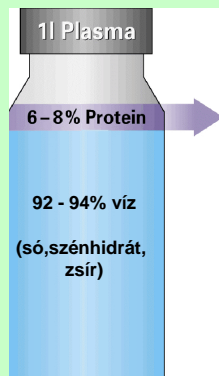
7

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 ₃ , α ₂ -Makroglobulin, α ₁ - Proteinase-Inhibitor, Apoli- poprotein I)
8,5 g/l	kb. 110 különböző plazmafe- hérje (többek között alvadási faktorok és enzim inhibitorok)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

9

VÉRFEHÉRJÉK

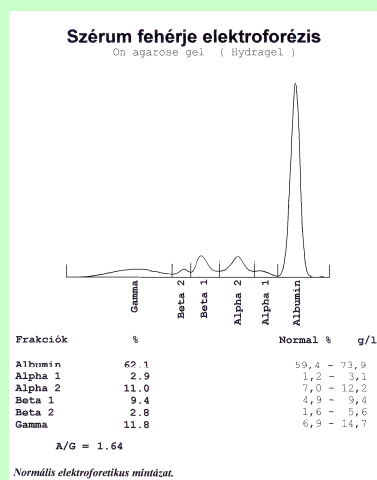
Több frakció:

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

Globulinok (α₁ α₂ β₁ β₂) Gliko- és lipoproteinek, szállító funkció

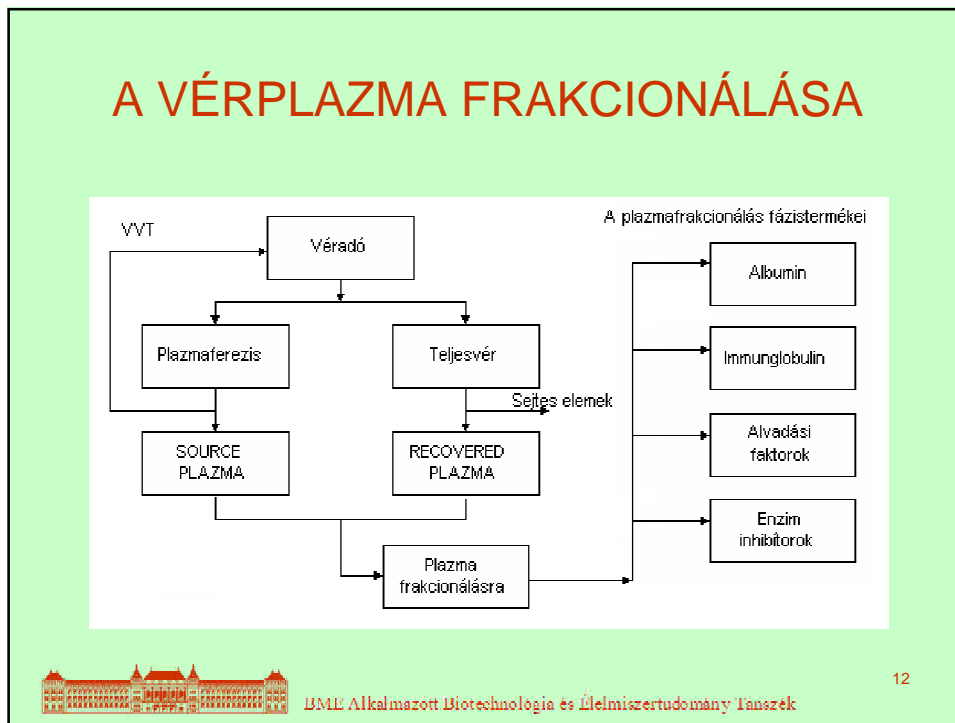
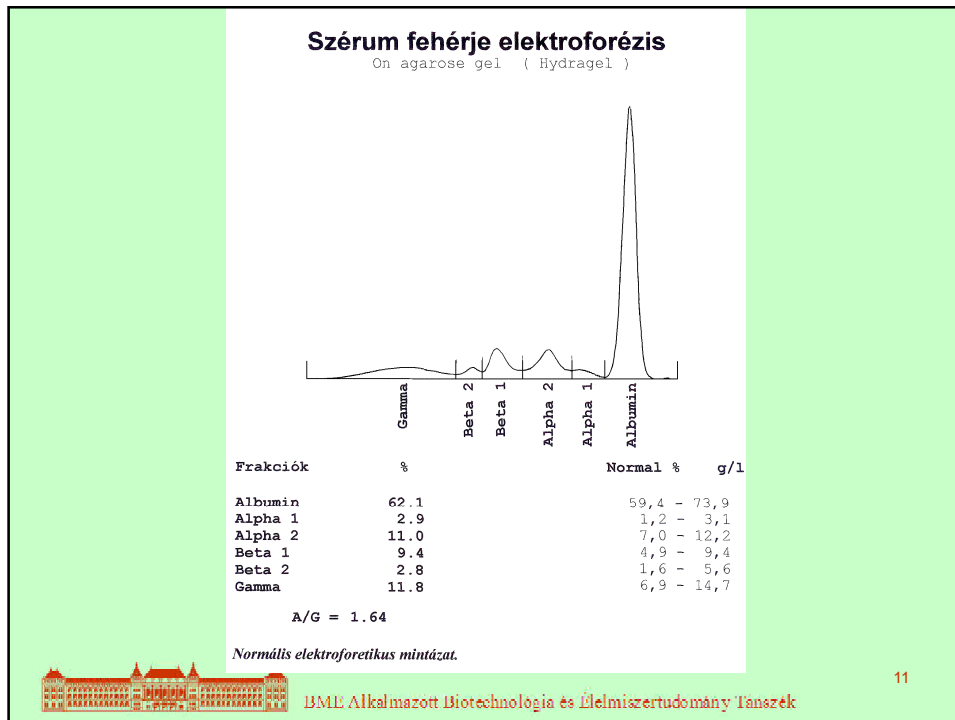
γ globulin: immunfehérjék, antitestek, a fehér vérszettek termelik

Véralvadási faktorok: fibrinogén



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

10



PLAZMADERIVÁTUMOK

Albumin	Alvadási faktorok	Immunglobulinok	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 Veszétség 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	Kihoz atal g/l
ALBUMIN 20%	Ozmózis nyomás emelése			
ALBUMIN 5%	Plazma volumen pótlás Nem fehérje pótszer!	66.000	30-35	22-27
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	Kihozat al 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, veszettség, 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	3×10^{-4}	18-22
FVIII + vW fakt.	vWillebrand betegek kezelése	1-4 M		15
Faktor IX	B hemofiliások kezelése	57.000	5×10^{-3}	12-18
F II, VII, IX, X PCC	Orálisan alvadásgátolt betegek kezelése	72.000 50.000 59.000	0,1 5×10^{-3} 10×10^{-3}	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	5×10^{-3}	20
Trombin=FIIa	Fibrin aktiváló enzim	72.000	0,1	500 NE/ml

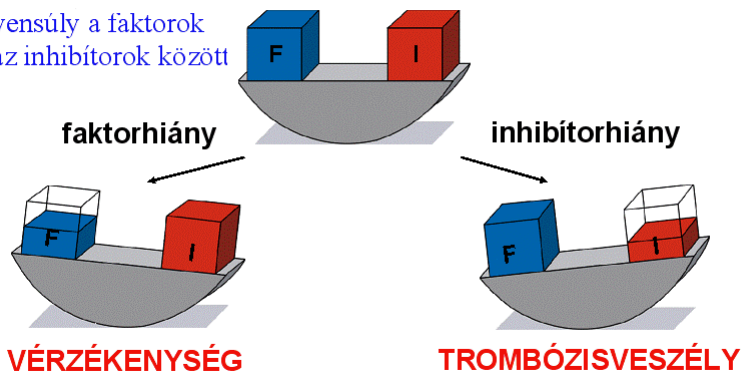


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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

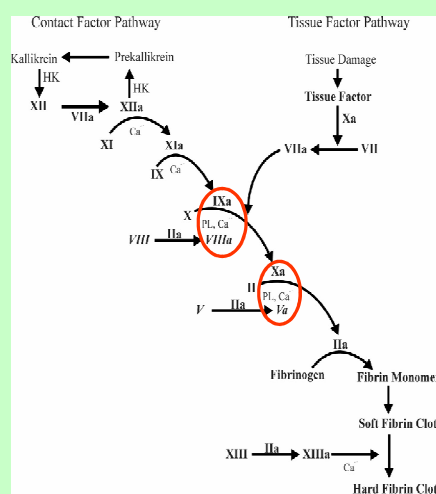
„Kaszád” reakciósor: az egyes lépésekben a faktorok szelektív és részleges proteolízissal aktiválódnak a következő enzimet.

Két indítási lehetőség:

Külső (extrinsic) út: a sérülés következtében kívülről a vérbe kerülő anyagok váltják ki

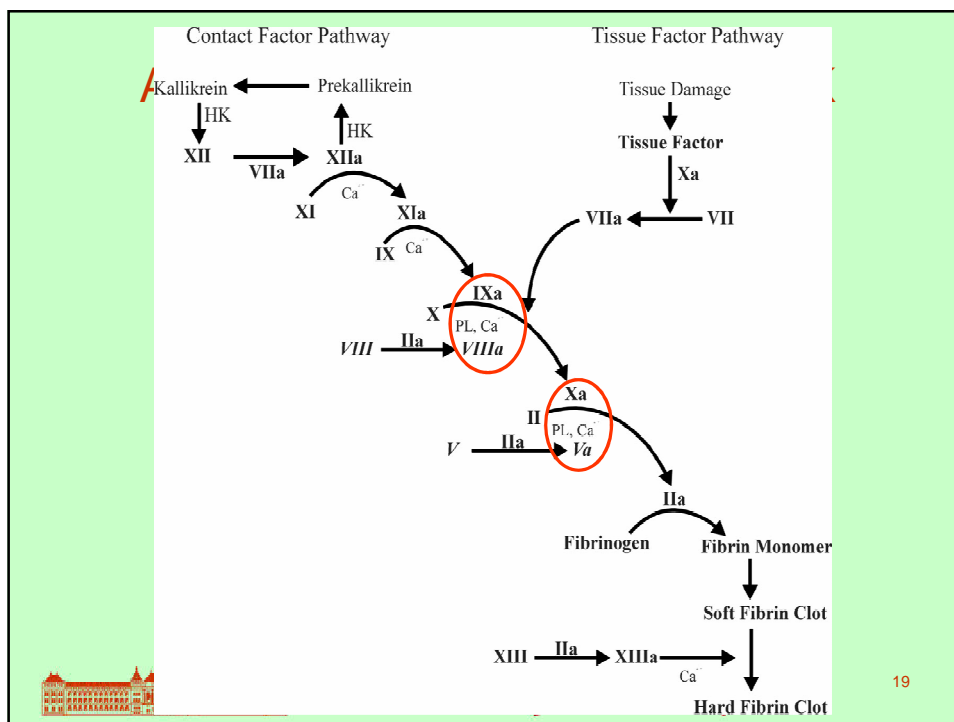
Belső (intrinsic) út:

„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 változából komoly anyagmennyiség átalakulása lesz:

XII faktor – 10 ppb



IX faktor – 3-5000 ppb



Fibrinogén – 4.000.000 ppb

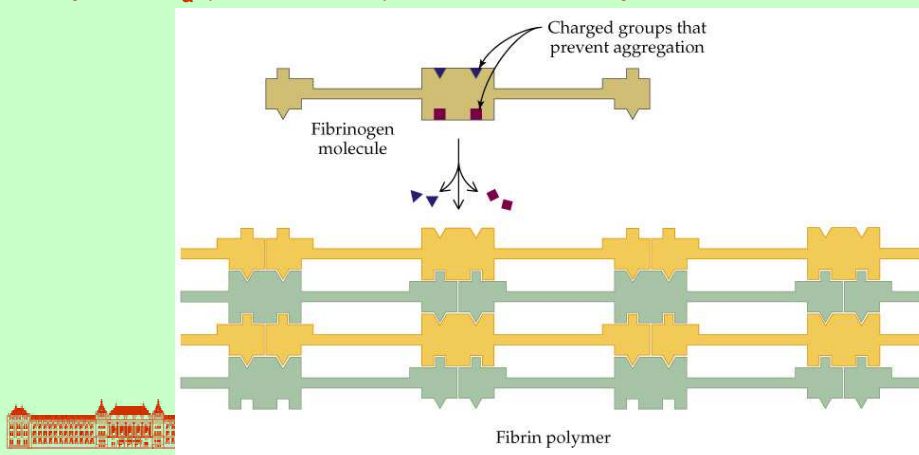
A kétféle alvadási reakciósor a X (Stuart) faktor aktiválásával közösen folytatódik.

Az X_a faktor a III, IV és V faktorokkal (foszfolipid, kalcium, akcelerin) katalizálja a protrombin → trombin (II → II_a) átalakulást.



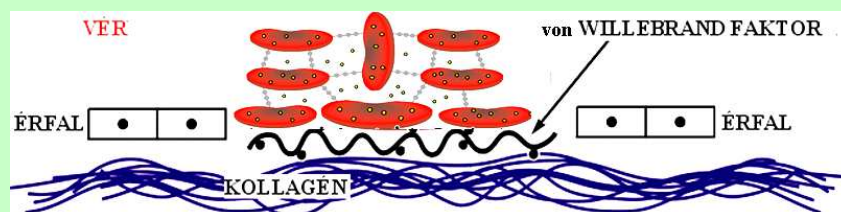
VÉRALVADÁS 3.

A trombin a fibrinogén \rightarrow fibrin ($I \rightarrow I_a$) folyamatot katalizálja. A fibrin ezután lineáris kötegekké polimerizálódik, majd a XIII_a (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 (rágcsálóirtó szer, antidotum: K-vitamin)



TECHNOLÓGIÁK

Technológiák kialakulása, fejlődése

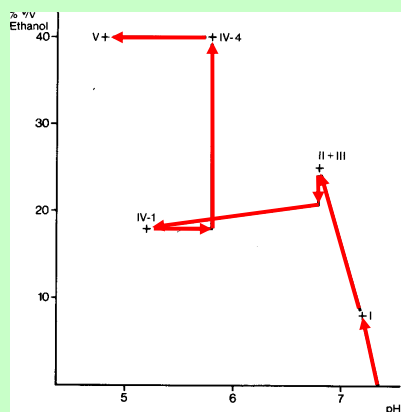
- 1940 USA Hadügyminisztérium kutató csoport
- 1941 Pilot Plant laboratórium (Harvard)
- 1946 COHN 6. Method (E.J. Cohn and co-workers
J.Am.Chem. Soc. 68. 459-475 1946)
- 1962 KISTLER & NITSHMANN Method
- 1960-70 egyéb kicsapószer
- 1970- Kromatográfiás technológia,
- 1970- Alvadási faktorok iv IgG
-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



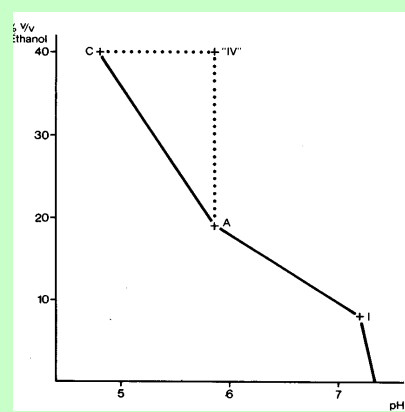
		Albumin	IVIG	ImIgG	FVIII	F IX	PCC
Plazma pool minősítés							
Plazmaminősítés	Verifikálás	+	+	+	+	+	+
	PCR vizsgálat	+	+	+	+	+	+
Fehérje elválasztás							
Kicsapás	Alkoholos kicsapás	+	+	+			
Kioldás	Csapadék oldása	+	+	+	+	+	+
Folyadék/szilárd elválasztás	Centrifugálás	+	+	+	+	+	+
	Szűrés	+	+	+	+	+	+
Adszorpció kromatográfia	adszorptív szűrés	+	+	+			
	Ioncsere	(+)	(+)	(+)	+	+	+
	Immunaffinitás				(+)	(+)	(+)
Vírusinaktiválás/eltávolítás							
Hőkezelés	Pasztörizálás	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Kémiai módszer	S/D eljárás			(+)	(+)	(+)	(+)
Szűrés	Nanoszűrés						(+)
Formulálás, kiszereles							
Adszorpció	adszorptív szűrés	+	+	+			
Membránszűrés	Dialízis/koncentrálás	+	+	+	+	+	+
	Steril szűrés	+	+	+	+	+	+
Stabilizálás	Kémiai adalékok	+	+	+	+	+	+
Töltés	Aszeptikus töltés	+	+	+	+	+	+
Száritás	Liofilizálás		(+)	(+)	+	+	+
Végző inaktiválás							
Hőkezelés	Pasztörizálás	+					
	Szárazhő				(+)	(+)	(+)
Végtermékminősítés							
Végtermékminősítés		+	+	+	+	+	+

+: alkalmazott művelet, (+): alkalmazható művelet

ETANOLOS KICSAPÁSI ELJÁRÁSOK



Cohn 6 (1946)



Kistler/ Nitschmann (1962)



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	α - és β -globulinok, AT-III, α 1-antitrypsin, IgM
IV-4	40	5,8	α - és β -globulinok, transferrin, ceruloplasmin, haptoglobin
V	40	4,8	Albumin (α - és β -globulinok)



Vírusinaktiválás / eltávolítás

Fizikai módszerek

Inaktiválás hőkezeléssel

- Pasztörizálás
- Száraz hőkezelés
- Gőzölés

Eltávolítás

- Nanoszűrés
- Kromatográfiai módszerek
- Kicsapás

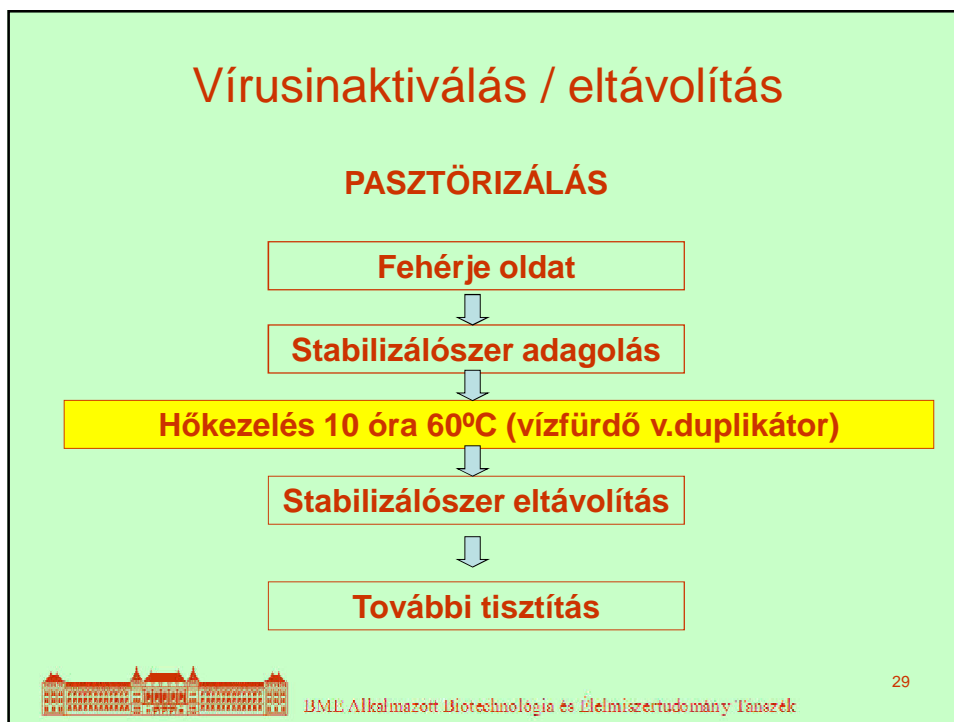
Kémiai módszerek

- Solvens – Detergens eljárás
- β -Propiolakton
- Jód

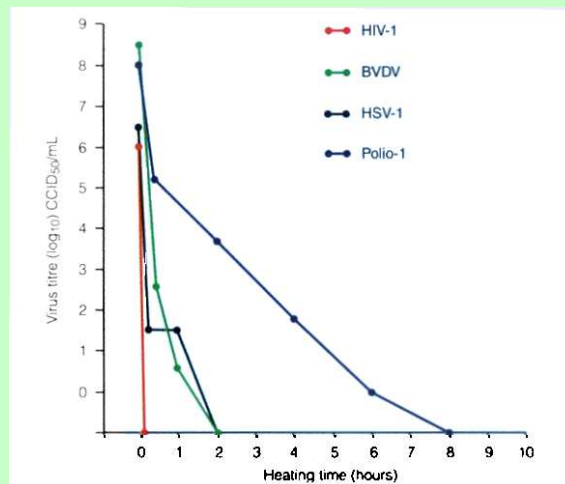
Fotokémiai módszerek

- Metilénkék
- Psoralen
- Hypericin





Beriplex P/N[®] pasztörizációs vírusinaktiválás kinetikája



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

31

Beriplex P/N vírusmentesítésének validációs eredménye

<u>Modellvírusok</u>	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
<u>Nanofiltration (log 10)</u>	<u>>7,1</u>	<u>> 7,2</u>	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



BME 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 vérszécsillapító szer hemofília-B kezelésére



BME 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.

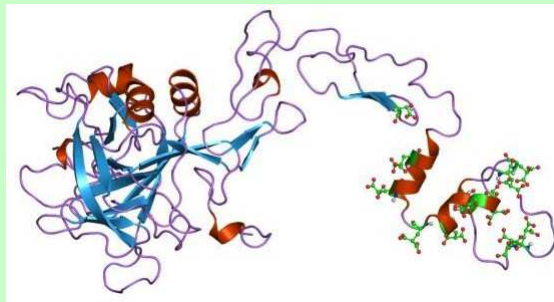
A vérkeringésben féléletideje 18-24 óra.



BME 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.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

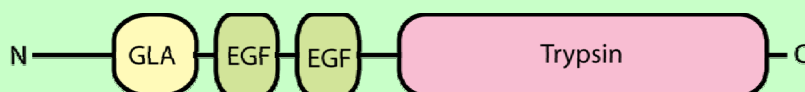
A IX-es faktor fehérjeszerkezete

Domének:

Gla-domén: az N-terminális szakaszon 12 gamma-karboxi-glutaminsavat (Gla) tartalmaz.

EGF (Epidermal Growth Factor) domén: itt egy másik szokatlan aminosav, hidroxiaszparaginsav található.

Ser-proteáz domén: analóg a tripsinnel és a többi alvadási proteázzal.



BME 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

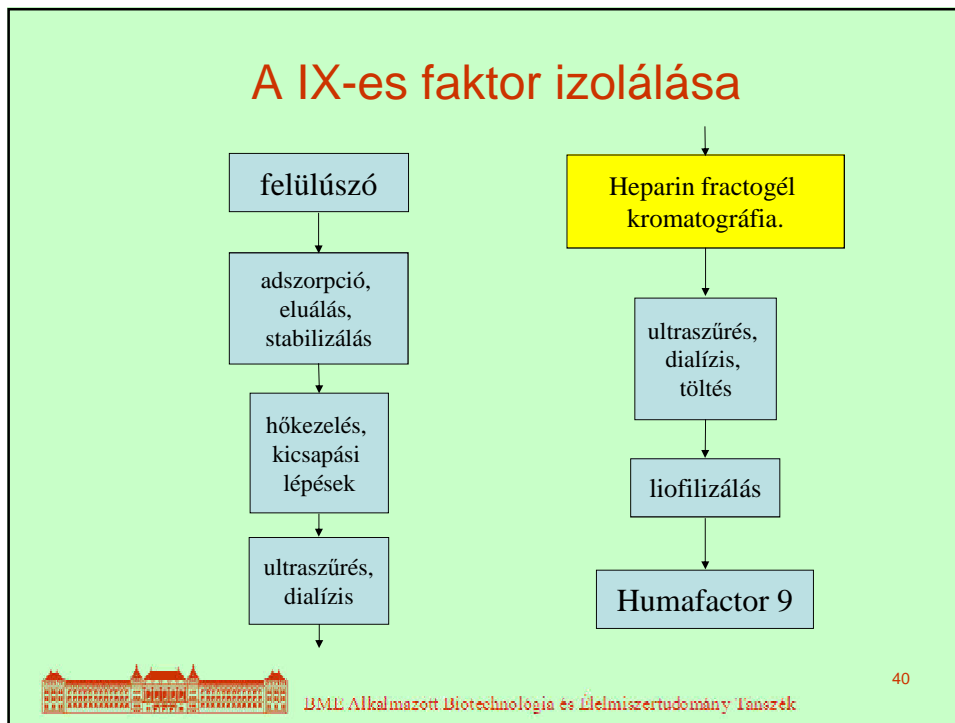
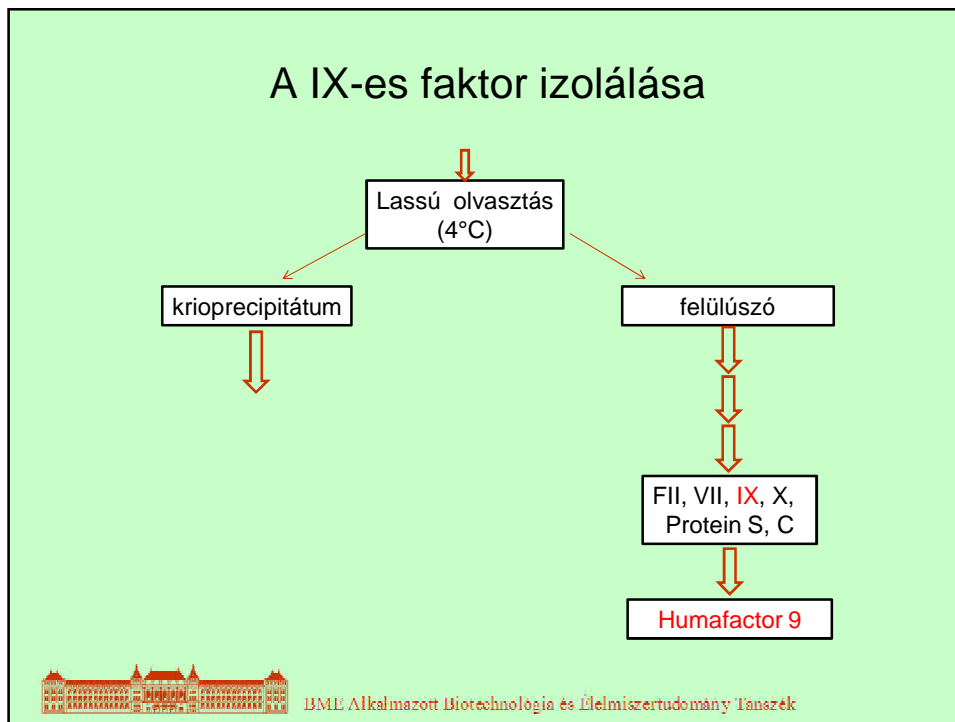


A IX-es faktor genetikája

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.

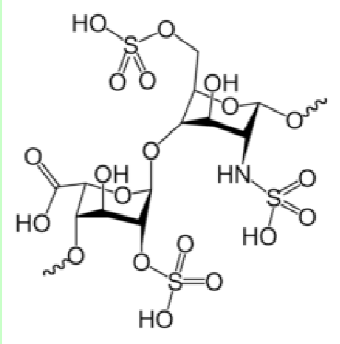
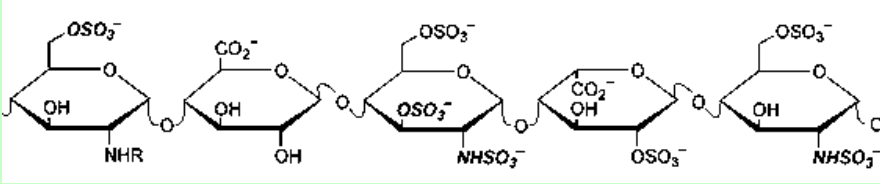





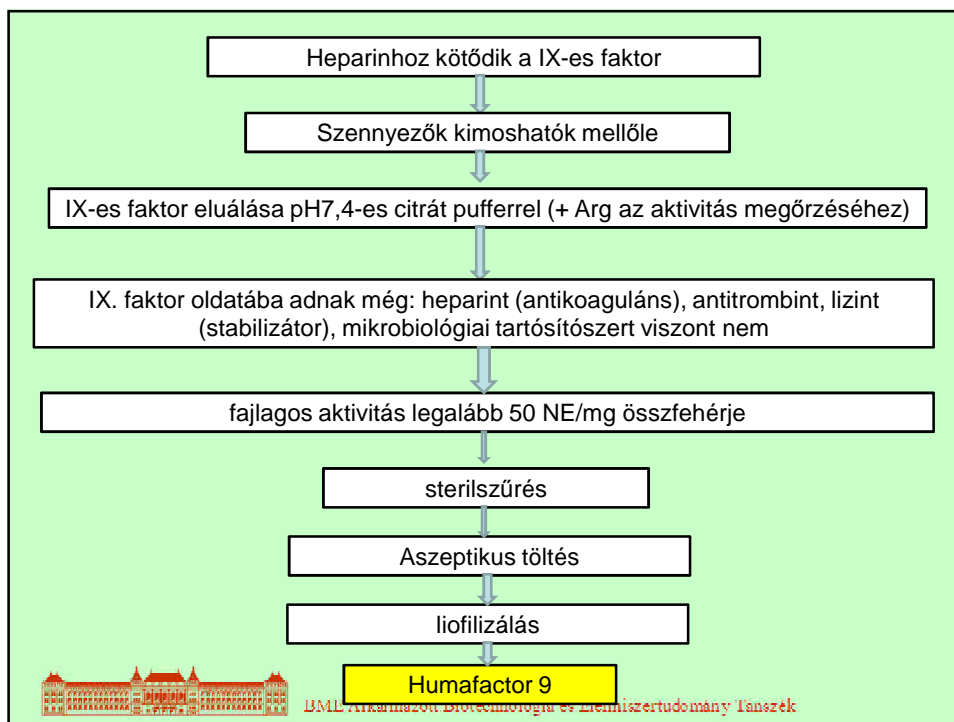
Az izolálás kulcslépése:

AFFINKROMATOGRÁFIA

A ligandum a tölteten: heparin

 BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék



ALVADÁSIFAKTOR-TERMELŐ ÜZEM



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

43