


VÉRKÉSZÍTMÉNYEK, PLAZMADERIVÁTUMOK

Dr. Pécs Miklós

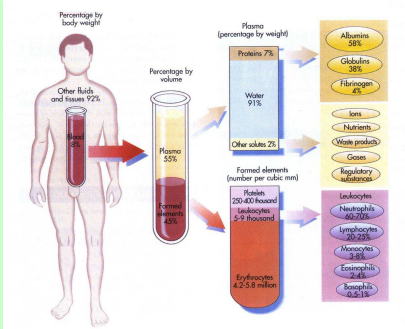


Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem,
Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

HMP Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

A VÉR ÖSSZETÉTELE

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



HMP 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 sejt közötti 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 + sejt elemek
Vér = szérum + vérelempény



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

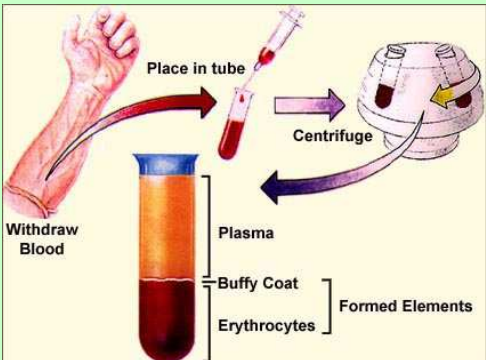
VÉRKÉSZÍTMÉNYEK

```

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

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

A VÉR BIOKÉMIÁJA



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

VÉRKÉSZÍTMÉNYEK

Vérkészítmény	Biológiai hatást kifejtő komponens	Tárolás	Lejárat
CPD-s (alvadésgátolt) 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

VÉRKÉSZÍTMÉNYEK

Vérkészítmény	Biológiai hatást kifejtő komponens	Tárolás	Lejárat
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

7

VÉRFEHÉRJÉK

Több frakció:

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

Globulinok (α_1 α_2 β_1 β_2) Gliko- és lipoproteinek, szállító funkció

γ globulin: immunfehérjék, antitestek, a fehér véresejtek termelik

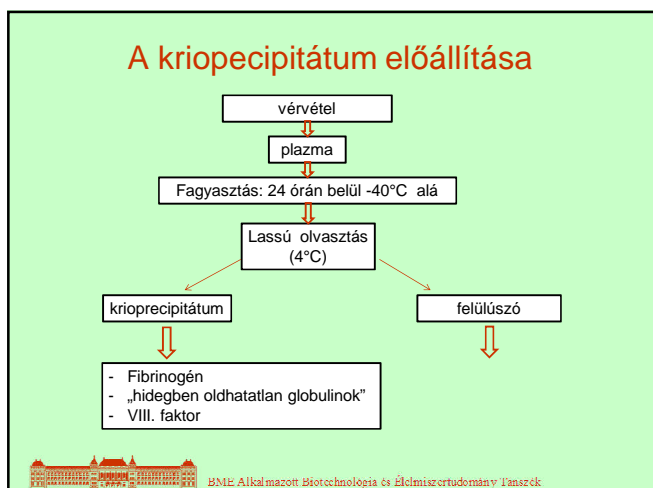
Véralvadási faktorok: fibrinogén

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 elektroretikus mintázat.

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 elektroretikus mintázat.

11

PLAZMAFEHÉRJÉK

1l Plazma

6-8% Protein

92-94% víz (sószenhidrát, zsír)

40 - 50 g/l Albumin

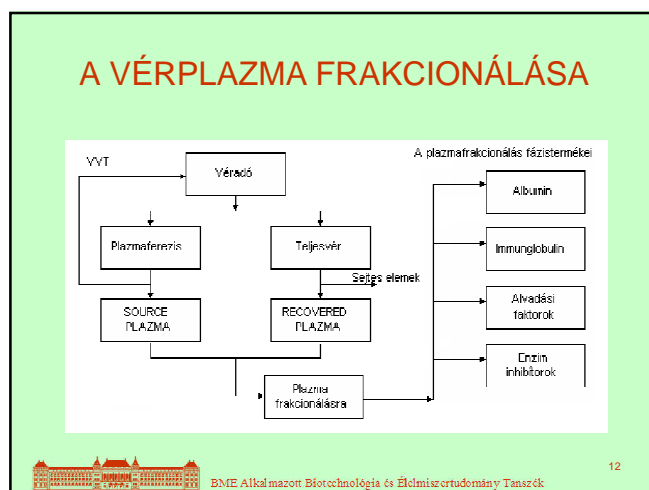
10 - 25 g/l Immunglobulinok

2 - 4 g/l Fibrinogén

9 - 10 g/l 6 nagy mólsúlyú fehérje (Transferrin, Haptoglobin, C₃, α_2 -Makroglobulin, α_1 -Proteinase-Inhibitor, Apolipoprotein I)

8,5 g/l kb. 110 különböző plazmafehérje (többek között alvadási faktorok és enzim inhibitorok)

9



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

13

3. HEMOSZTATIKUMOK

Termék	Indikáció	Molsúly Dalton	Plazma konc. g/l	Kihozatal %
Faktor VIII	„A” hemofiliások kezelése	300.000	3x10 ⁻⁴	18-22
FVIII + vW fakt.	vWillebrand betegek kezelése	1-4 M		15
Faktor IX	B hemofiliások kezelése	57.000	5x10 ⁻³	12-18
F II,VII,IX,X	Orálisan alvadástgátolt betegek kezelése	72.000	0,1	15-25
PCC		50.000	5x10 ⁻³	
		59.000	10x10 ⁻³	
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 ⁻³	20
Trombin=FIIa	Fibrin aktiváló enzim	72.000	0,1	500 NE/ml

16

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

14

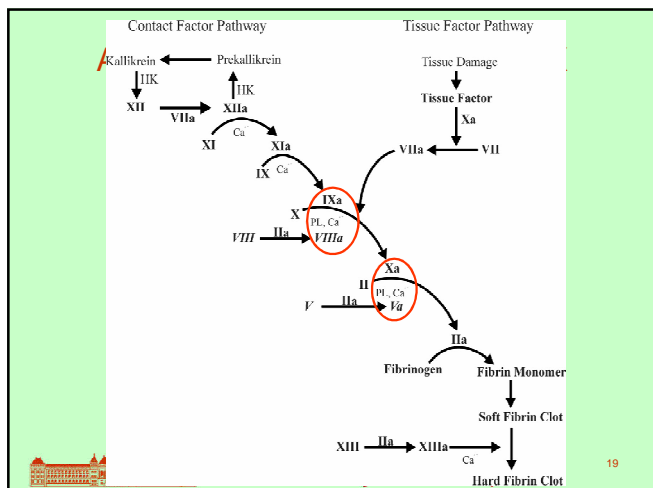


2. IMMUNGLOBULINOK

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		
Hepatitisz B, rubeola, veszttség, kullancs enc.				

15





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.

VÉRALVADÁS 2.

Biológiai erősítés: parányi kis változásból 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, akcelerán) katalizálja a protrombin → trombin (II → II_a) átalakulást.

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)

VÉRALVADÁS 3.

A trombin a fibrinogén → fibrin (I → I_a) folyamatot katalizálja. A fibrin ezután lineáris kötegekké polimerizálódik, majd a XIII_a (Laki-Lóránd) faktor térfelhálósítja.

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 kicsapószerek
- 1970- Kromatográfiai technológia,
- 1970- Alvadási faktorok iv IgG
- 1980- Nagy tisztaságú faktor készítmények
- 1990- Rekombináns készítmények

		Albumin	IVIG	ImIgG	FVIII	FIX	PCC
Plazma pool minősítés							
Plazmaminősítés	Verifikálás	+	+	+	+	+	+
	PCR vizsgálat	+	+	+	+	+	+
Fehérje elválasztás							
Kicsapás	Alkoholos kicsapás	+	+	+			
	Kioldás	+	+	+	+	+	+
Folyadék/szilárd elválasztás	Centrifugálás	+	+	+	+	+	+
	Szűrés	+	+	+	+	+	+
Adszorpció	adszorptív szűrés	+	+	+	+	+	+
	Ionsere	(+)	(+)	(+)	+	+	+
Kromatográfia	Immunaffinitás				(+)	(+)	(+)
Vírusinaktiválás/eltávolítás							
Hőkezelés	Pasztörizálás	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	S/D eljárás						
Kémiai módszer	Nanoszűrés						
	Nanoszűrés						
Formulálás, készelés							
Adszorpció	adszorptív szűrés	+	+	+			
	Membránszűrés	+	+	+	+	+	+
Stabilizálás	Dialízis/koncentráció	+	+	+	+	+	+
	Steril szűrés	+	+	+	+	+	+
Töltés	Kémiai adalékok	+	+	+	+	+	+
	Aszeptikus töltés	+	+	+	+	+	+
Szárítás	Liofilizálás	+	(+)	(+)	+	+	+
Végő inaktiválás							
Hőkezelés	Pasztörizálás	+					
	Szárashő					(+)	(+)
Végtermékminősítés							
Végtermékminősítés		+	+	+	+	+	+

+: alkalmazott művelet, (+): alkalmazható művelet

Vírusinaktiválás / eltávolítás

Fizikai módszerek

Inaktiválás hőkezeléssel

- Pasztörizálás
- Száraz hőkezelés
- Gőzölés

Eltávolítás

- Nanoszűrés
- Kromatográfiai módszerek
- Kicsapás

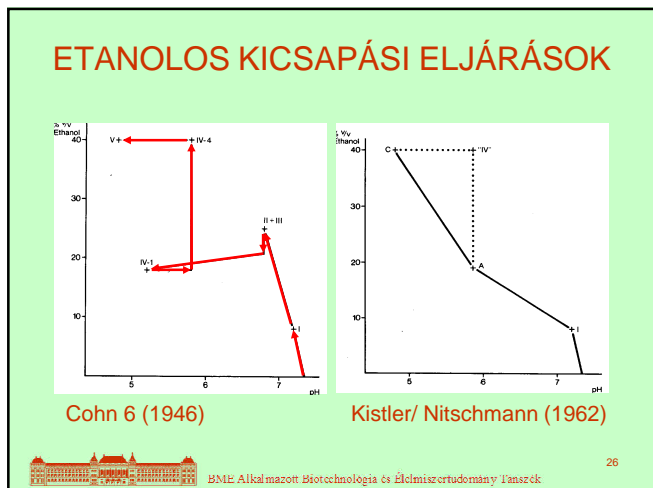
Kémiai módszerek

- Solvens – Detergens eljárás
- β-Propiolakton
- Jód

Fotokémiai módszerek

- Metilénkék
- Psoralen
- Hypericin

HMP Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 28



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, α1-antitrypsin, IgM
IV-4	40	5,8	α- és β-globulinok, transferrin, ceruloplazmin, haptoglobin
V	40	4,8	Albumin (α- és β-globulinok)

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 27

Vírusinaktiválás / eltávolítás

SD (SOLVENT-DETERGENT) KEZELÉS

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

4 óra 30° C-os hőkezelés

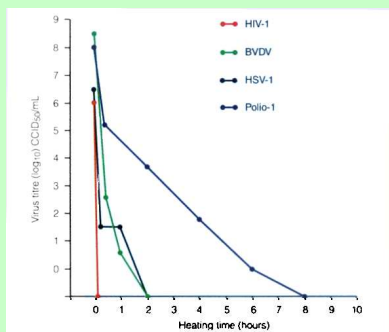
Extrakció növényi olajjal (pl. steril szójaolaj)

Kromatográfiai tisztítás (C18 tölteten)

Ultraszűrés

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 30

Beriplex P/N[®] pasztörizációs vírusinaktiválás kinetikája



HMP Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

31

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.



HMP Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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
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			

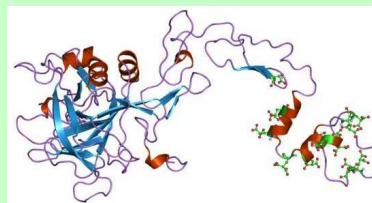


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

32

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

Tiszta faktorok gyártása:

IX-es faktor = antihemofiliás faktor B
 = Christmas faktor

Humafactor 9:

humán koagulációs IX-es faktor koncentrátum, speciális intravénásan alkalmazható szer hemofília-B kezelésére



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, hidroxi-aszparaginsav található.
 Ser-proteázis domén: analóg a tripszinnel 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.

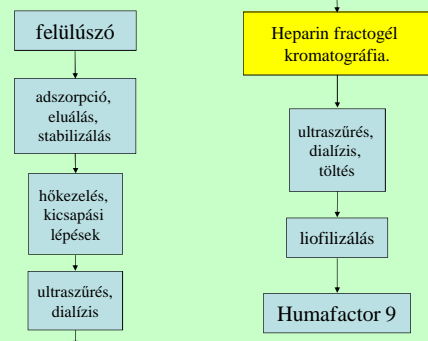
A vérzéses tünetek szoros korrelációban vannak a faktorhiány mértékével.

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

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



A IX-es faktor izolálása



A IX-es faktor genetikája

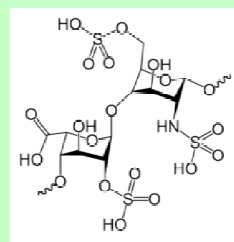
A IX-es faktor gén az X kromoszóma hosszú karján helyezkedik el.

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.

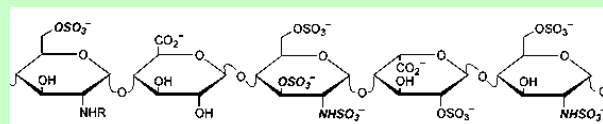


Az izolálás kulcslépése:

AFFINKROMATOGRÁFIA



A ligandum a tölteten: heparin



A IX-es faktor izolálása

