

# VÉRKÉSZÍTMÉNYEK, PLAZMADERIVÁTUMOK

Dr. Pécs Miklós



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem,  
Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék



BMTL Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

1

## A VÉR BIOKÉMIÁJA

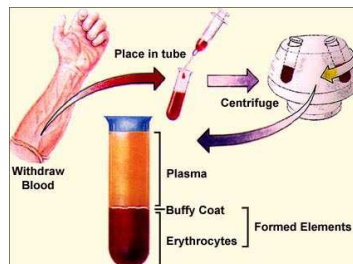
Áramló folyadék, amely anyagokat és hőt szállít a szervezeten belül, és beállítja az állandó belső környezetet a sejtek számára. A sejt közötti folyadékban diffúziós transzport működik, a vér viszont áramlik = konvekciós transzport. Kétirányú: a sejtekhez viszi a tápanyagokat és az oxigént, elszállítja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

Lazarostos kötőszövet.

Mennyisége kb. 5 liter.

Vér = vérplazma + sejtés elemek

Vér = szérum + vérlepleny



2




BMTL Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

## A VÉR BIOKÉMIÁJA

Place in tube → Centrifuge

Withdraw Blood → Plasma → Buffy Coat → Erythrocytes } Formed Elements




BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

3

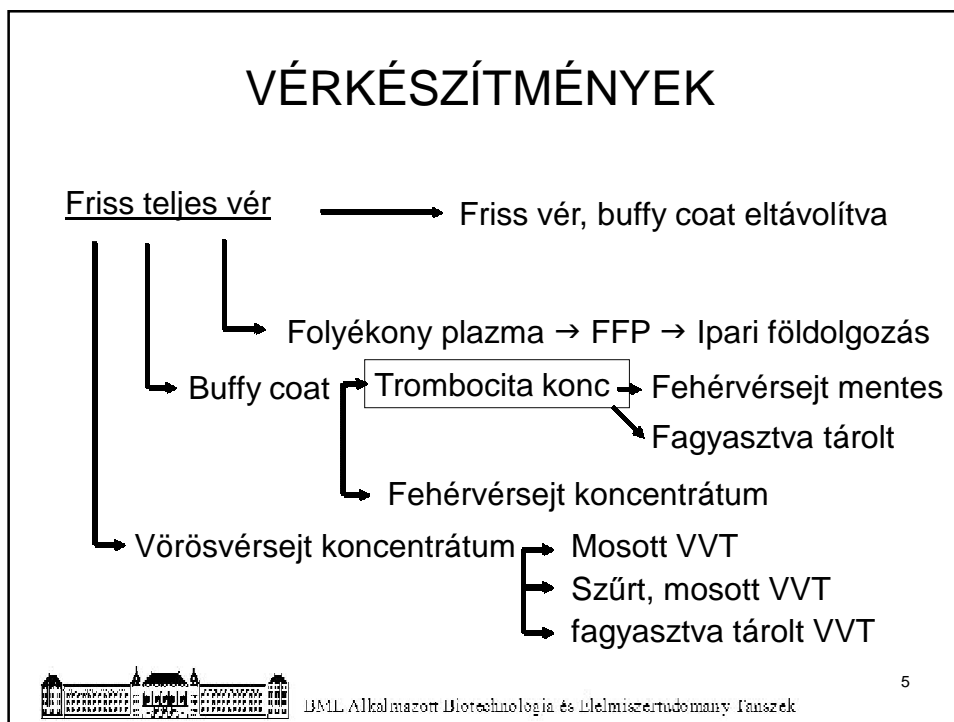
## A VÉR ÖSSZETÉTELE

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék


4



5

## 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
<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, glicerin mentesre mosott VVT	VVT	+4°C	24 óra


 BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

6

## VÉRKÉSZÍTMÉNYEK

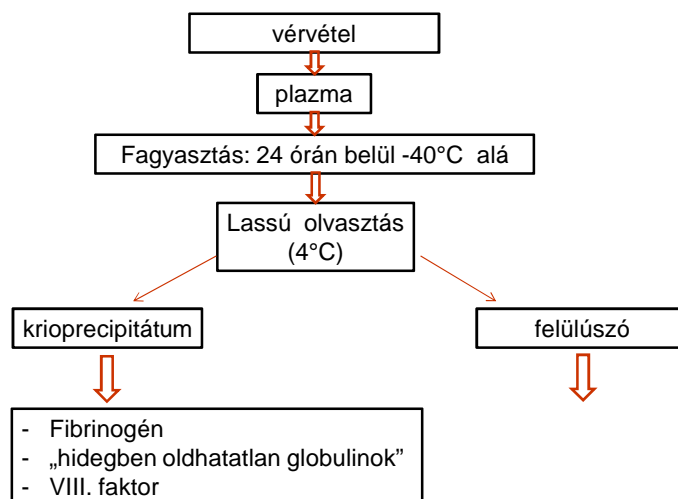
Vérkészítmény	Biológiai hatást kifejtő komponens	Tárolás	Lejártat
Trombocita készítmények			
Trombocita koncentrátum	trombociták	20 - 24°C	5 nap
Fehérvérsejt mentesre szűrt tromb. koncentrátum	trombociták	20 - 24°C	1-5 nap
Fagyasztott, felolvasztott, mosott trombocita konc.	trombociták	Az elkészítés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

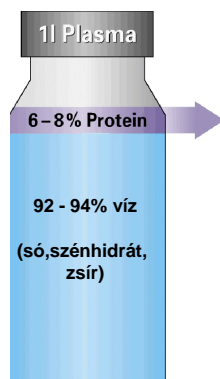
7

## 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 <sub>3</sub> , α <sub>2</sub> -Makroglobulin, α <sub>1</sub> - 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:

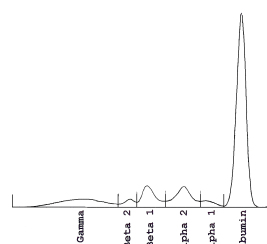
**Albumin:** pufferol, beállítja az ozmózisnyomást, N tartalék, apoláros hordozó.

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

**γ globulin:** immunfehérjék, antitestek, a fehér véresejtek termelike

**Véralvadási faktorok:** fibrinogén

Szérum fehérje elektroforézis  
On agarose gel (Hydrigel)



Frakciók	%	Normal %	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 - 8.4	
Beta 2	2.8	1.6 - 5.6	
Gamma	11.8	6.9 - 14.7	

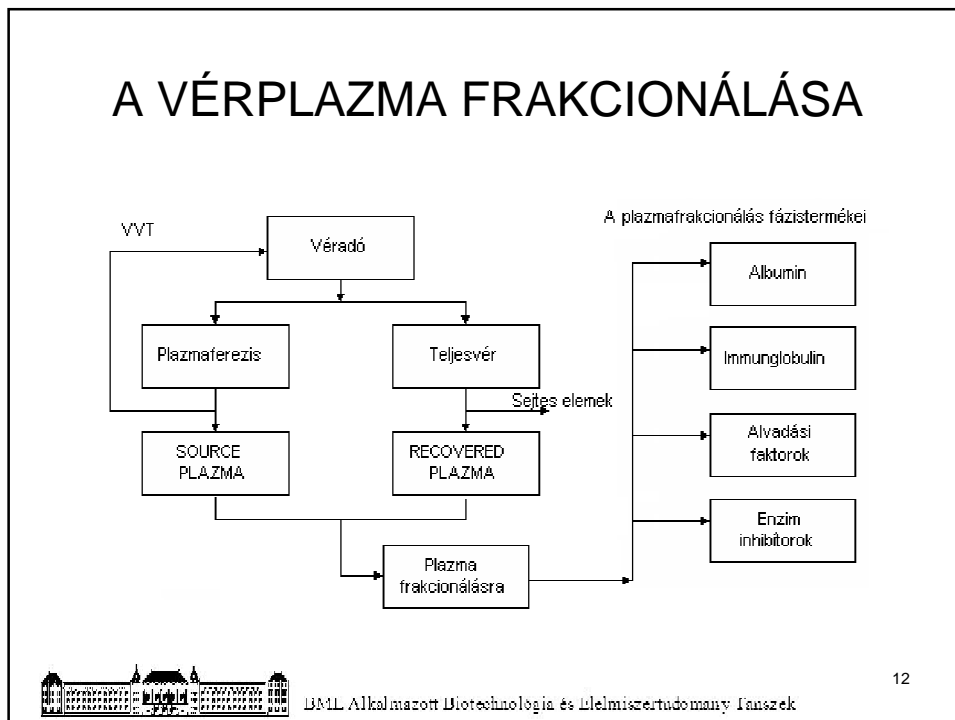
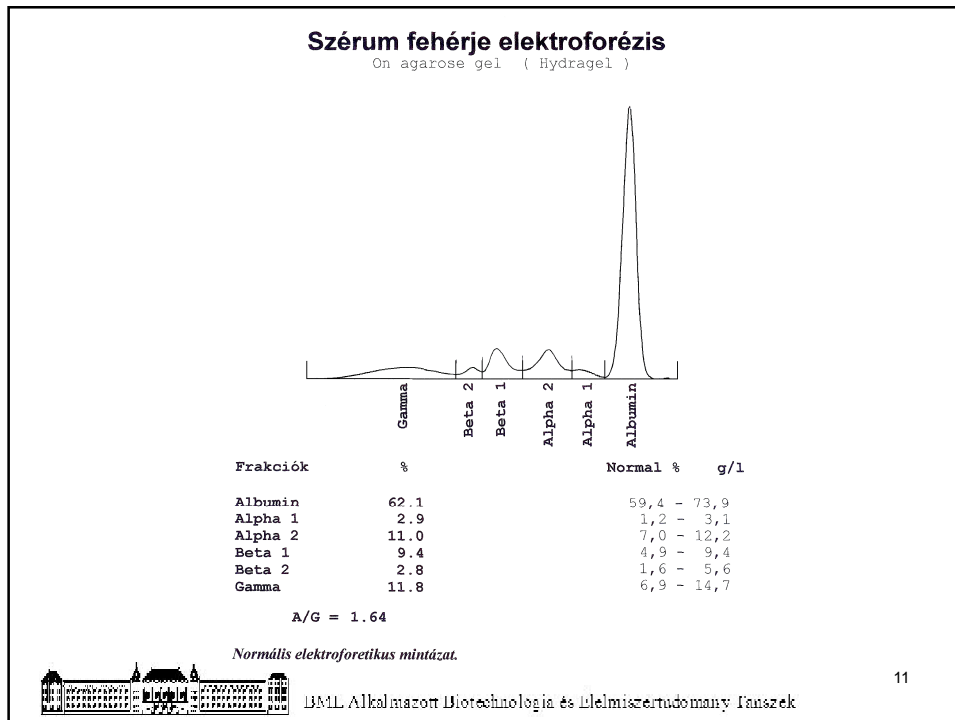
A/G = 1.64

Normális elektroforetikus mintázat.



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		
Hepatitisz 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	$3 \times 10^{-4}$	18-22
FVIII + vW fakt.	vWillebrand betegek kezelése	1-4 M		15
Faktor IX	B hemofiliások kezelése	57.000	$5 \times 10^{-3}$	12-18
F II, VII, IX, X PCC	Orálisan alvadásgátolt betegek kezelése	72.000 50.000 59.000	0,1 $5 \times 10^{-3}$ $10 \times 10^{-3}$	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	$5 \times 10^{-3}$	20
Trombin=FIIa	Fibrin aktiváló enzim	72.000	0,1	500 NE/ml



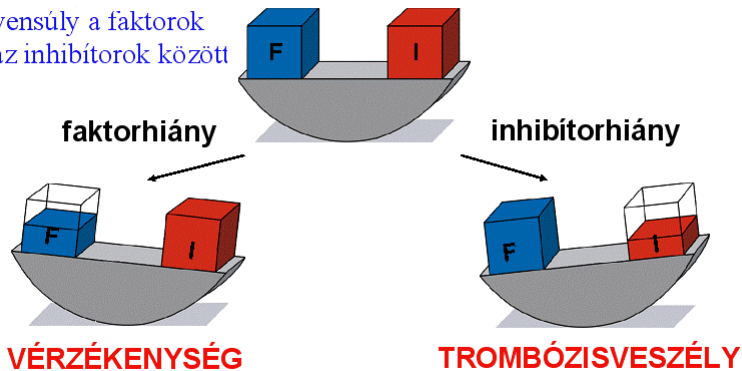
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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

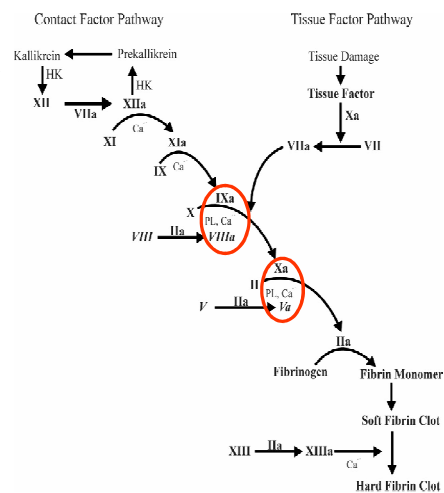
„Kaszád” reakciósor: az egyes lépésekben a faktorok szelektív és részleges proteolízissel aktiválják a következő enzimet.

Két indítási lehetőség:

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

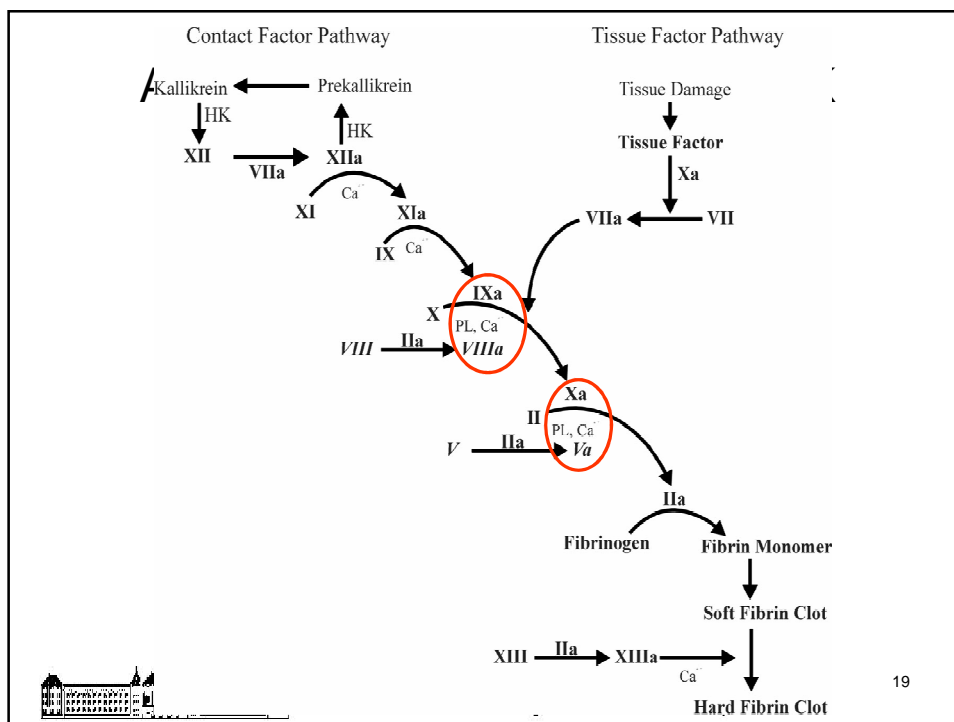
Belső (intrinsic) út:

„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 változából komoly anyagmennyiség átalakulása lesz:

XII faktor – 10 ppb



IX faktor – 3-5000 ppb



Fibrinogén – 4.000.000 ppb

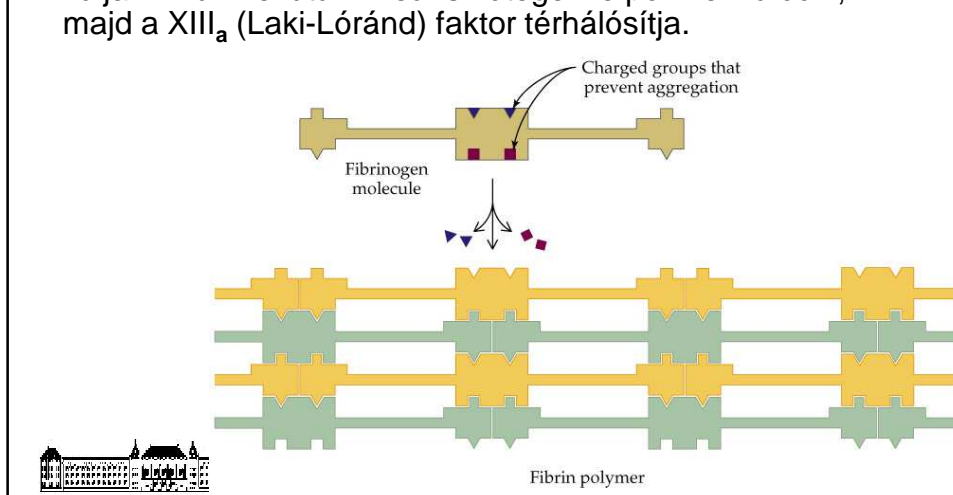
A kétféle alvadási reakciósor a X (Stuart) faktor aktiválásával közösen folytatódik.

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



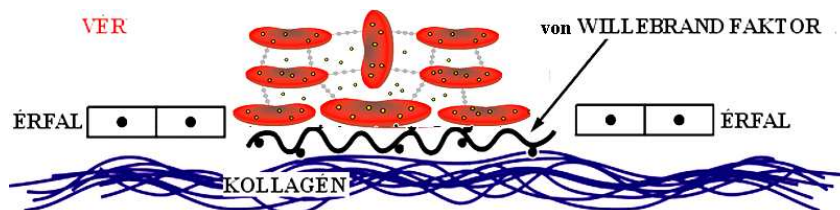
## VÉRALVADÁS 3.

A trombin a fibrinogén  $\rightarrow$  fibrin ( $I \rightarrow I_a$ ) 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 (rágcsálóirtó szer, antidotum: K-vitamin)




## TECHNOLÓGIÁK

### Technológiák kialakulása, fejlődése

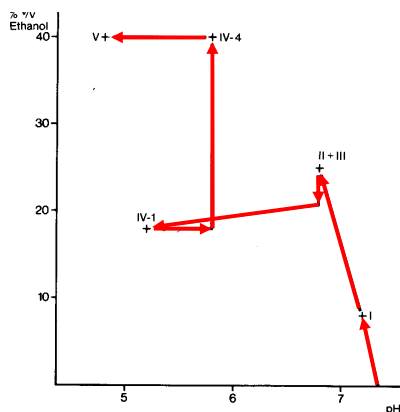
- 1940 USA Hadügyminisztérium kutató csoport
- 1941 Pilot Plant laboratórium (Harvard)
- 1946 COHN 6. Method (E.J. Cohn and co-workers  
J.Am.Chem. Soc. 68. 459-475 1946)
- 1962 KISTLER & NITSHMANN Method
- 1960-70 egyéb kicsapószer
- 1970- Kromatográfiás technológia,
- 1970- Alvadási faktorok iv IgG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



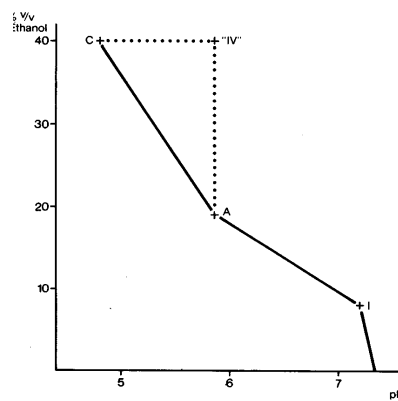
		Albumin	IVIG	ImIgG	FVIII	F IX	PCC
<b>Plazma pool minősítés</b>							
Plazmaminősítés	Verifikálás	+	+	+	+	+	+
	PCR vizsgálat	+	+	+	+	+	+
<b>Fehérje elválasztás</b>							
Kicsapás	Alkoholos kicsapás	+	+	+			
Kioldás	Csapadék oldása	+	+	+	+	+	+
Folyadék/szilárd elválasztás	Centrifugálás	+	+	+	+	+	+
	Szűrés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



## 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



## Vírusinaktiválás / eltávolítás

### PASZTÖRIZÁLÁS

Fehérje oldat



Stabilizálószer adagolás



Hőkezelés 10 óra 60°C (vízfürdő v.duplikátor)



Stabilizálószer eltávolítás



További tisztítás



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

29

## 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)

Kromatográfiás tisztítás (C18 tölteten)

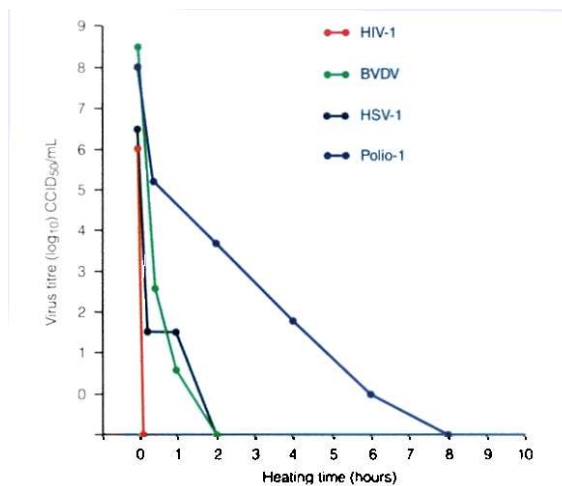
Ultraszűrés



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

30

## Beriplex P/N<sup>®</sup> pasztörizációs vírusinaktiválás kinetikája



BMT Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

31

## Beriplex P/N vírusmentesítésének validációs eredménye

<b>Modellvírusok</b>	<b>HIV</b> env.,RNA	<b>HSV</b> env.,DNA	<b>BVDV</b> Mod.f.Hep.C	<b>Polio</b> 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



BMT 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 vérzésesillapító 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.

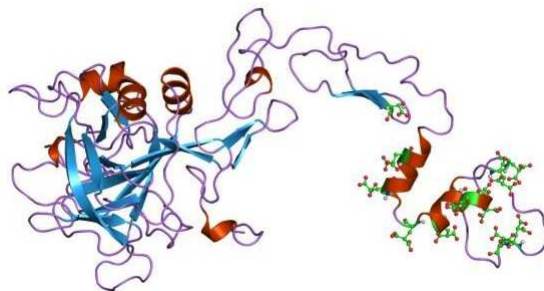
A vérkeringésben féleletideje 18-24 óra.



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

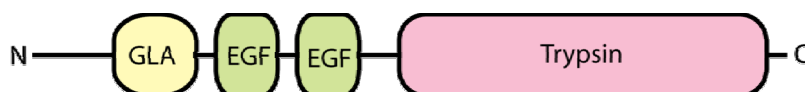
## A IX-es faktor fehérjeszerkezete

Domének:

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

EGF (Epidermal Growth Factor) domén: itt egy másik szokatlan aminosav, hidroxizsparaaminsav 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

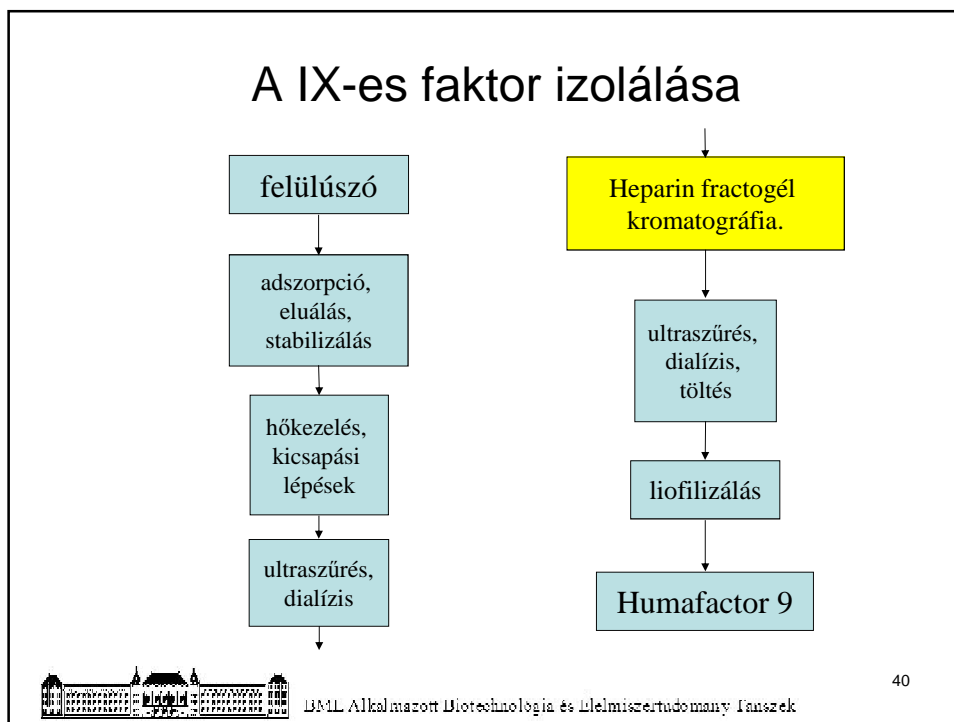
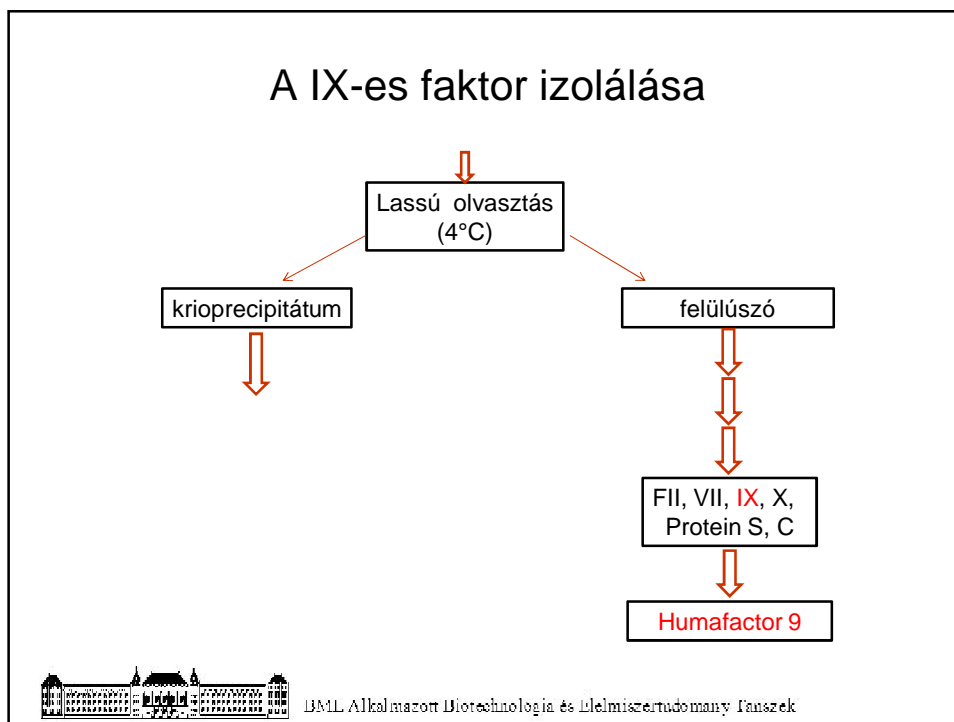


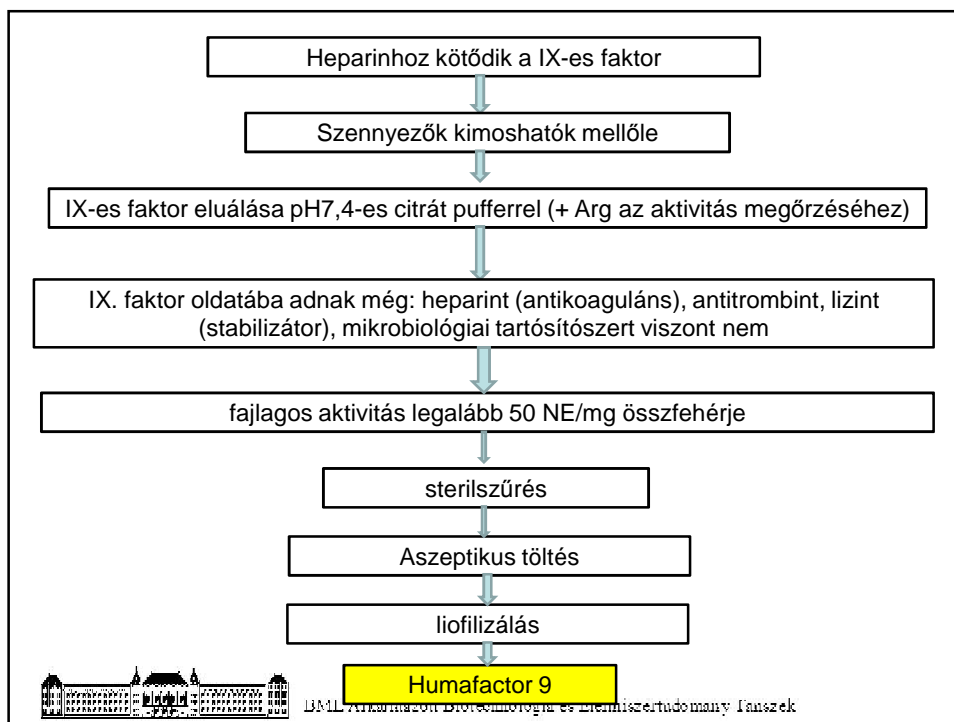
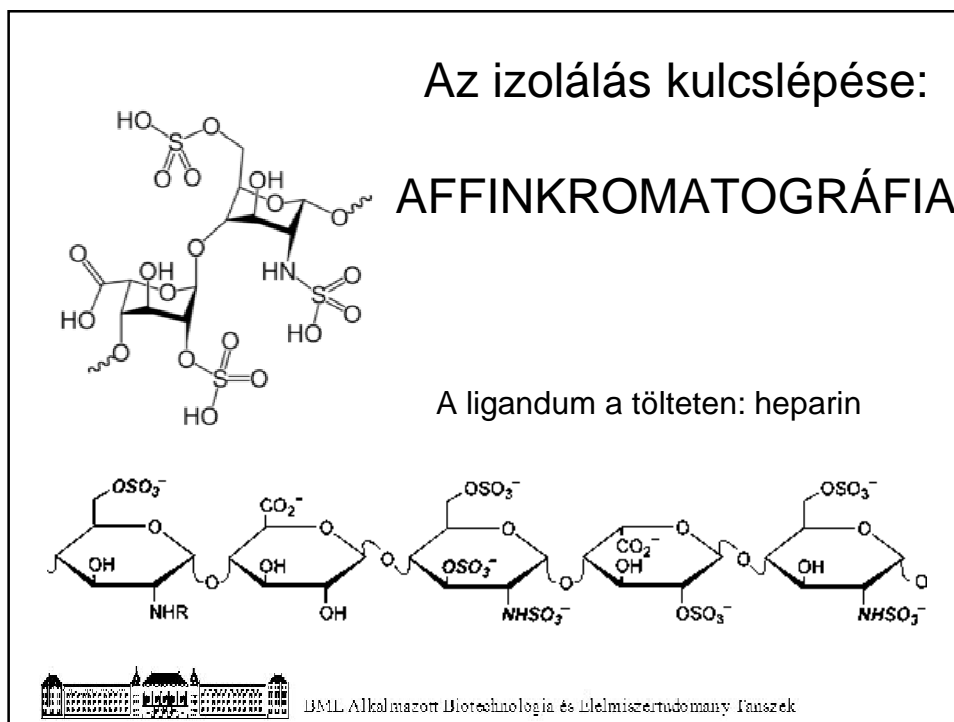
## A IX-es faktor genetikája

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.







## ALVADÁSIFAKTOR-TERMELŐ ÜZEM



BMT Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

43