



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 33 82 834 T3** 2006.11.16

(12) **Übersetzung der geänderten europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 464 872 B2**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **P 33 82 834.2**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **91 115 793.1**
(96) Europäischer Anmeldetag: **01.12.1983**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **08.01.1992**
(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **30.08.2000**
(97) Veröffentlichungstag
des geänderten Patents beim EPA: **20.07.2005**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **16.11.2006**

(51) Int Cl.⁸: **B01J 20/32** (2006.01)
B01J 47/00 (2006.01)
B01J 20/22 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

21237982	02.12.1982	JP
3119483	25.02.1983	JP
6811683	18.04.1983	JP
7096783	21.04.1983	JP
18736583	05.10.1983	JP

(73) Patentinhaber:
Kanegafuchi Kagaku Kogyo K.K., Osaka, JP

(74) Vertreter:
HOFFMANN & EITLE, 81925 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, FR, GB, IT, LI, LU, NL, SE

(72) Erfinder:
Tani, Nobutaka, Minoo-shi, Osaka-fu, JP; Hayashi, Tsuneo, Ashiya-shi, Hyogo-ken, JP

(54) Bezeichnung: **Sorbentmittel und dessen Herstellungsverfahren**

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein neues Adsorptionsmittel und ein Verfahren zu dessen Herstellung, ganz besonders ein Adsorptionsmittel zur Entfernung von Lipoproteinen niedriger und/oder sehr niedriger Dichte (VLDL) aus Blut oder Plasma, in einer extrakorporalen Zirkulationsbehandlung.

[0002] Es war ein Mittel zur selektiven Entfernung schädlicher Substanzen, die in der Körperflüssigkeit auftreten und in enger Beziehung zu den Ursachen oder dem Fortschreiten einer Krankheit stehen, erforderlich. Es ist zum Beispiel bekannt, daß Plasmalipoproteine, insbesondere Lipoproteine mit sehr niedriger Dichte (im folgenden als "VLDL" bezeichnet) und/oder Lipoproteine mit niedriger Dichte (im folgenden als "LDL" bezeichnet), eine große Menge Cholesterin enthalten und Arteriosklerose verursachen. Bei Hyperlipämien wie der familiären Hyperlipämie und der familiären Hypercholesterinämie zeigen VLDL und/oder LDL um ein Vielfaches höhere Werte wie unter normalen Bedingungen und verursachen häufig Arteriosklerose wie Coronararteriosklerose. Obgleich verschiedene Behandlungsarten wie Diäten und medizinische Behandlungen angewendet wurden, sind deren Wirkungen beschränkt, und es besteht die Gefahr von ungünstigen Nebenwirkungen. Besonders bei der familiären Hypercholesterinämie ist eine Plasmaaustauschtherapie, die sich aus der Plasmaentfernung und der kompensatorischen Ergänzung exogener menschlicher Plasmaproteinlösungen zusammensetzt, heutzutage wohl die einzige Behandlungsmethode, die wirksam ist. Jedoch weist die Plasmaaustauschtherapie verschiedene Mängel auf, wie (1) eine Notwendigkeit für die Verwendung von teurem, frischem Plasma oder Plasmafraktionen, (2) die Gefahr von Infektionen durch Hepatitisviren und dergleichen und (3) den Verlust aller Plasmakomponenten, die nicht nur schädliche Komponenten sondern auch nützliche enthalten, d.h. im Fall von Lipoproteinen gehen nicht nur VLDL und/oder LDL sondern auch Lipoprotein mit hoher Dichte (im folgenden als "HDL" bezeichnet) verloren. Um die obigen Mängel zu beheben, wurde eine selektive Entfernung von schädlichen Komponenten durch eine Membran oder dergleichen eingesetzt. Jedoch sind diese Verfahren in der Selektivität unzulänglich und verursachen einen großen Verlust von nützlichen Komponenten aus der Körperflüssigkeit. Es wurde auch ein selektives Entfernen von schädlichen Komponenten durch Adsorption versucht. Zum Beispiel wurde ein synthetisches Adsorptionsmittel wie Aktivkohle oder Amberlite XAD (ein eingetragenes Warenzeichen, kommerziell erhältlich von Rohm + Haas Co.) bei Leberkrankheiten verwendet. Solche Adsorptionsmittel weisen jedoch viele Nachteile auf, wie eine geringe Selektivität und die Unfähigkeit zur Entfernung hochmolekularer Verbindungen. Weiterhin wurde mit dem Ziel, die Selektivität zu erhöhen, ein Adsorptionsmittel basierend auf dem Prinzip der Affinitätschromatographie verwendet, das sich aus einem Träger, auf dem ein Material mit einer Affinität für eine spezifisch zu entfernende Substanz (solch ein Material wird im folgenden als "Ligand" bezeichnet) immobilisiert ist, zusammensetzt. In diesem Fall ist es jedoch schwierig, eine ausreichende Fließgeschwindigkeit für eine extrakorporale Behandlung zu erhalten, weil der Träger ein weiches Gel wie Agarose ist. Dementsprechend ist eine bestimmte Veränderung der Kolonnenform erforderlich, um eine große Fließgeschwindigkeit zu erhalten, und das Risiko einer gelegentlichen Verstopfung bleibt noch bestehen. Deshalb kann ein stabiler, extrakorporaler Kreislauf durch das obige Verfahren nicht erreicht werden.

[0003] Ein Adsorptionsmittel der vorliegenden Erfindung wird zum selektiven Entfernen von VLDL und/oder LDL aus Blut oder Plasma verwendet.

[0004] Es ist eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Adsorptionsmittel zum selektiven Entfernen von VLDL und LDL aus Blut oder Plasma in der extrakorporalen Zirkulationsbehandlung zur Verfügung zu stellen.

[0005] Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein Verfahren zur Herstellung des Adsorptionsmittels zur Verfügung zu stellen.

[0006] Diese und andere Aufgaben der vorliegenden Erfindung werden aus der nachfolgenden Beschreibung ersichtlich.

[0007] Gemäß der vorliegenden Erfindung wird ein Adsorptionsmittel gemäß Anspruch 1 bereitgestellt.

[0008] [Fig. 1](#) und [Fig. 2](#) sind jeweils Abbildungen, die die Beziehung zwischen der Fließgeschwindigkeit und dem Druckabfall erhalten in den Referenzbeispielen 1 und 2 zeigen, und [Fig. 2](#) ist ein Diagramm der Polyacrylamid-Disk-Gel-Elektrophorese erhalten in Referenzbeispiel 39.

[0009] Die in der vorliegenden Erfindung verwendeten Träger haben die folgenden Eigenschaften:

- (1) eine relativ hohe mechanische Festigkeit,
- (2) einen niedrigen Druckabfall und keine Säulenverstopfung im Falle der Durchleitung von Blut oder Plas-

ma durch eine mit einem Träger gepackte Säule,

(3) eine große Zahl von Mikroporen, in die eine zu entfernende Substanz im wesentlichen eindringt und

(4) geringe, durch ein Sterilisierungsverfahren wie das Dampfsterilisieren im Autoklaven hervorgerufene Veränderungen.

[0010] Deshalb ist in der vorliegenden Erfindung der verwendete Träger ein wasserunlösliches poröses vernetztes Polyacrylat.

[0011] Das in der vorliegenden Erfindung verwendete poröse Hartgel quillt mit einem Lösungsmittel weniger und wird durch Druck weniger deformiert als ein weiches Gel wie Dextran, Agarose oder Acrylamid.

[0012] Der Ausdruck "hartes Gel" und "weiches Gel" in der vorliegenden Erfindung wird wie folgt erläutert: Ein hartes Gel wird von einem weichen Gel durch das folgende, in den Referenzbeispielen 1 und 2 beschriebene Verfahren unterschieden. Das bedeutet, wenn eine Beziehung zwischen der Fließgeschwindigkeit und dem Druckabfall durch Durchleiten von Wasser durch eine gleichförmig mit einem Gel gepackte Säule bestimmt wird, zeigt ein hartes Gel eine lineare Beziehung während ein weiches Gel eine nichtlineare Beziehung zeigt. Im Falle eines weichen Gels wird das Gel deformiert und verfestigt sich bei einem bestimmten Druck, so daß die Fließgeschwindigkeit nicht weiter ansteigt. In der vorliegenden Erfindung wird ein Gel mit der obigen linearen Beziehung bei mindestens 0,3 kg/cm als "hartes Gel" bezeichnet.

[0013] Eine Porengröße des porösen Cellulosegels wird ausgewählt abhängig vom Molekulargewicht, Form oder Größe einer zu entfernenden Substanz, und die am meisten geeignete Porengröße kann in jeweiligen Fall ausgewählt werden. Zum Messen der Porengröße gibt es verschiedene Arten von Methoden, wie die Quecksilberporosimetrie und die Beobachtung durch ein Elektronenmikroskop als Direktmeßverfahren. Im Hinblick auf wasserhaltige Teilchen können die obigen Verfahren manchmal jedoch nicht angewendet werden. In einem solchen Fall kann eine Ausschlußgrenze als ein Maß der Porengröße angenommen werden. Der Ausdruck "Ausschlußgrenze" (exclusion limit) in der vorliegenden Erfindung bedeutet das kleinste Molekulargewicht eines Moleküls, das nicht in eine Pore in einer Gelpermeationschromatographie (vgl. Hiroyuki Hatano und Toshihiko Hanai: Zikken Kosoku Ekitai Chromatography (Experimental High-Pressure Liquid Chromatography), veröffentlicht von Kabushiki Kaisha Kagaku Dojin) eindringen kann. Außergewöhnlich wird ein Molekül mit einem Molekulargewicht größer als die Ausschlußgrenze nahe dem Porenvolumen eluiert. Deshalb kann die Ausschlußgrenze durch Untersuchung der Beziehungen zwischen Molekulargewichten und Elutionsvolumina unter Verwendung von Substanzen mit verschiedenen Molekulargewichten durch Gelpermeationschromatographie untersucht werden. Eine Ausschlußgrenze variiert mit der Art der auszuschließenden Substanzen. In der vorliegenden Erfindung wird eine Ausschlußgrenze des porösen Cellulosegels unter Verwendung von globulären Proteinen und/oder Viren gemessen, und die bevorzugte Ausschlußgrenze beträgt 5×10^3 bis 1×10^9 . Wenn die Ausschlußgrenze größer als 1×10^9 ist, sinkt die adsorbierte Menge einer zu entfernenden Substanz mit der Abnahme der Menge des immobilisierten Liganden, und außerdem wird die mechanische Festigkeit des Gels reduziert.

[0014] VLDL und/oder LDL sind riesige Moleküle mit einem Molekulargewicht von größer als 1×10^6 . Die Ausschlußgrenze zum Entfernen von VLDL und/oder LDL ist 1×10^6 bis 1×10^9 , besonders bevorzugt 1×10^6 bis 1×10^8 .

[0015] Im Hinblick auf die poröse Struktur des in der vorliegenden Erfindung verwendeten porösen Cellulosegels ist eine Struktur, die in jedem Teil des Gels gleichförmig Poren aufweist (im folgenden als "gleichförmige Struktur" bezeichnet) bevorzugter als eine Struktur, die nur an der Oberfläche des Gels Poren aufweist. Es ist bevorzugt, daß die Porosität des Gels nicht kleiner als 20% ist. Die Form des Trägers wird abhängig von der Art der zu entfernenden Substanz ausgewählt. Der Träger kann aus geeigneten Formen wie Partikeln, Fasern, Folien und Hohlfasern ausgewählt werden. Im Falle der Verwendung eines Trägers in Form von Partikeln steigt der Druckabfall mit einer extrem kleinen Größe an, obwohl Partikel mit einer kleineren Größe im allgemeinen eine exzellente Adsorptionskapazität zeigen. Deshalb sind Partikel mit einer Größe von $1 \mu\text{m}$ bis $5.000 \mu\text{m}$ bevorzugt. Weiterhin ist es bevorzugt, daß ein Träger funktionale Gruppen, die zur Immobilisierung der Liganden verwendet werden, oder Gruppen, die leicht zu aktiveren sind, aufweist. Beispiele dieser Gruppen sind zum Beispiel Amino-, Carboxyl-, Hydroxyl-, Thiol-, Säureanhydrid-, Succinylimid-, Chlor-, Aldehyd-, Amido-, Epoxygruppen und dergleichen.

[0016] Das wasserlösliche poröse Polymer-Hartgel, das in der vorliegenden Erfindung verwendet wird, ist ein vernetztes Polyacrylat.

[0017] Der Ligand, der eine spezifische Affinität aufweist, ist eine Polyanionverbindung zum Entfernen eines Lipoproteins wie VLDL oder LDL.

[0018] Die zu entfernenden Substanzen sind VLDL und/oder LDL, die eine große Menge Cholesterin enthalten und Arteriosklerose hervorrufen. Beispiele der Polyanionverbindungen sind zum Beispiel sulfatisierte Polysaccharide wie Heparin, Chondroitinsulfat, Chondroitinpolysulfat, Heparansulfat, Keratansulfat, Heparinsulfat, Xylansulfat, Caroninsulfat, Cellulosesulfat, Chitinsulfat, Chitosansulfat, Pectinsulfat, Inulinsulfat, Argininsulfat, Glycogensulfat, Polylactosesulfat, Carrageenansulfat, Stärkesulfat, Polyglucosesulfat, Laminarinsulfat, Galactansulfat, Levansulfat und Mepesulfat, Phosphorwolframsäure, polysulfatisiertes Anethol, Polyvinylalkoholsulfat, Polyphosphorsäure und/oder Salze davon und dergleichen. Bevorzugte Beispiele der obigen Polyanionverbindungen sind zum Beispiel Heparin, Chondroitinpolysulfat und/oder Salze davon. Beispiele des Salzes der obigen Polyanionverbindung sind zum Beispiel ein wasserlösliches Salz wie ein Natriumsalz oder Kaliumsalz und dergleichen.

[0019] Zum Kuppeln eines Liganden mit einem Träger werden kovalente Kupplungsverfahren verwendet. Um das Adsorptionsmittel der vorliegenden Erfindung zur extrakorporalen Zirkulationsbehandlung zu verwenden, ist es wichtig, daß sich der Ligand nicht löst. Falls notwendig, kann ein Abstandsstück (Spacer) zwischen Ligand und Träger eingeführt werden.

[0020] Es ist bevorzugt, daß ein Gel aktiviert wird durch ein Reagenz wie ein Cyanhalogenid, Epichlorhydrin, eine Polyoxyranverbindung wie Bisepoxid oder Triazinhalogenid, und dann mit einem Liganden umgesetzt wird unter Bildung des gewünschten Adsorptionsmittels. In diesem Falle ist es bevorzugt, daß ein Gel mit einer zu aktivierenden Gruppe wie einer Hydroxylgruppe als ein Träger verwendet wird. Von den obigen Reagenzien sind Epichlorhydrin oder eine Polyoxyranverbindung wie Bisepoxid besonders bevorzugt, weil ein Ligand auf einem unter Verwendung eines solchen Reagenzes aktivierten Träger stark immobilisiert und die Ablösung des Liganden vermindert ist.

[0021] Die Menge des immobilisierten Liganden variiert in Abhängigkeit von den Eigenschaften des verwendeten Liganden wie seiner Form und seiner Aktivität. Zur ausreichenden Entfernung von VLDL und/oder LDL unter Verwendung einer Polyanionverbindung zum Beispiel, ist es bevorzugt, daß die Polyanionverbindung immobilisiert wird in einer Menge von nicht weniger als 0,02 mg/ml eines offensichtlichen Säulenvolumens, das durch ein Adsorptionsmittel eingenommen wird (im folgenden auch als "Schüttvolumen" (bed volume) bezeichnet), unter wirtschaftlichen Gesichtspunkten 100 mg oder weniger. Der bevorzugte Bereich beträgt 0,5 bis 20 mg/ml des Schüttvolumens. Nach der Kupplungsreaktion kann die nicht umgesetzte Polyanionverbindung zur Wiederverwendung durch Reinigung etc. wiedergewonnen werden.

[0022] Es ist bevorzugt, daß die verbleibenden, nicht umgesetzten aktiven Gruppen mit Ethanolamin und dergleichen blockiert werden.

[0023] Das Adsorptionsmittel der vorliegenden Erfindung kann für die extrakorporale Zirkulationsbehandlung, durchgeführt durch Füllen einer Säule in einem extrakorporalen Zirkulationskreislauf und Durchleiten von Körperflüssigkeit wie Blut oder Plasma durch die Säule, wobei die Säule mit dem Adsorptionsmittel der vorliegenden Erfindung gepackt ist, verwendet werden. Die Verwendung des Adsorptionsmittels ist nicht notwendigerweise auf das obige Beispiel beschränkt.

[0024] So lange der Ligand nicht stark degeneriert wird, kann das Adsorptionsmittel der vorliegenden Erfindung der Dampfsterilisation durch Autoklaven unterzogen werden, und dieses Sterilisationsverfahren beeinflusst die Mikroporenstruktur, die Teilchenform und das Gelvolumen des Adsorptionsmittels nicht.

[0025] Die vorliegende Erfindung wird durch die folgenden Referenzbeispiele und Beispiele genauer beschrieben und erläutert.

Referenzbeispiel 1

[0026] Biogel A5m (ein kommerziell erhältliches Agarosegel, hergestellt von Biorad Co., Teilchengröße: 50 bis 100 mesh) als weiches Gel und Toyopearl HW65 (ein kommerziell erhältliches vernetztes Polyacrylatgel, hergestellt von Toyo Soda Manufacturing Co., Ltd., Partikelgröße: 50 bis 100 µm) und Cellulofine GC-700 (ein kommerziell erhältliches poröses Cellulosegel, hergestellt von Chisso Corporation, Partikelgröße: 45 bis 105 µm) als Hartgel wurden gleichförmig in eine Glassäule (Innendurchmesser: 9 mm, Höhe: 150 mm) gepackt, die sowohl an der Spitze als auch am Boden der Säule Filter (Porengröße: 15 µm) aufwies. Wasser wurde durch

die so erhaltene Säule durchgeleitet, und die Beziehung zwischen der Fließgeschwindigkeit und dem Druckabfall wurde bestimmt. Die Ergebnisse sind in [Fig. 1](#) gezeigt. Wie in [Fig. 1](#) gezeigt, steigt die Fließgeschwindigkeit nahezu proportional mit dem Anstieg des Druckabfalls im porösen Polymer-Hartgel an. Auf der anderen Seite verfestigte sich das Agarosegel. Als Ergebnis verursacht ein ansteigender Druck kein Ansteigen der Fließgeschwindigkeit.

Referenzbeispiel 2

[0027] Die Verfahren von Referenzbeispiel 1 wurden wiederholt, ausgenommen daß FPG (ein kommerziell erhältliches poröses Glas, hergestellt durch Wako Pure Chemical Industry Ltd., Partikelgröße: 80 bis 120 mesh) anstelle der porösen Polymer-Hartgele als poröses anorganisches Hartgel verwendet wurde. Die Ergebnisse sind [Fig. 2](#) gezeigt. Wie in [Fig. 2](#) gezeigt, stieg die Fließgeschwindigkeit nahezu proportional mit dem Anstieg des Druckabfalls im porösen Glas an, was beim Agarosegel nicht der Fall war.

Referenzbeispiel 3

[0028] Toyopearl HW55 (ein kommerziell erhältliches vernetztes Polyacrylatgel, hergestellt durch Toyo Soda Manufacturing Co., Ltd., Ausschlußgrenze: 7×10^5 , Partikelgröße: 50 bis 100 μm) mit einer gleichförmigen Struktur wurde als Träger verwendet.

[0029] Zu 10 ml des Gels wurden 6 ml gesättigte wäßrige NaOH-Lösung und 15 ml Epichlorhydrin gegeben, und die Reaktionsmischung wurde unter Rühren bei 50°C für 2 Stunden umgesetzt. Das Gel wurde nacheinander mit Alkohol und Wasser gewaschen, um Epoxygruppen in das Gel einzuführen. Zu dem resultierenden epoxyaktivierten Gel wurden 20 ml konzentriertes wäßriges Ammoniak gegeben, und die Reaktionsmischung wurde unter Rühren bei 50°C für 2 Stunden umgesetzt, um Aminogruppen in das Gel einzuführen. 3 ml des so erhaltenen aktivierten Gels, das Aminogruppen enthielt, wurden zu 10 ml einer wäßrigen Lösung (pH 4,5), die 200 mg Heparin enthielt, gegeben. Zur resultierenden Reaktionsmischung wurden 200 mg 1-Ethyl-3-(dimethylaminopropyl)-carbodiimid gegeben, während die Reaktionsmischung bei pH 4,5 gehalten wurde, und die Reaktionsmischung wurde bei 4°C für 24 Stunden geschüttelt. Nach Abschluß der Reaktion wurde die resultierende Reaktionsmischung nacheinander mit einer wäßrigen 2 M NaCl-Lösung, einer wäßrigen 0,5 M NaCl-Lösung und Wasser gewaschen, um das gewünschte Gel zu ergeben, auf dem Heparin immobilisiert war (im folgenden als "Heparinigel" bezeichnet). Die Menge des immobilisierten Heparins betrug 2,2 mg/ml des Schüttvolumens.

Beispiele 1 bis 3

[0030] Das Verfahren von Referenzbeispiel 3 wurde wiederholt, ausgenommen daß Toyopearl HW60 (Ausschlußgrenze: 1×10^6 , Partikelgröße: 50 bis 100 μm), Toyopearl HW65 (Ausschlußgrenze: 5×10^6 , Partikelgröße: 50 bis 100 μm) und Toyopearl HW75 (Ausschlußgrenze: 5×10^7 , Partikelgröße: 50 bis 100 μm) anstelle von Toyopearl HW55 verwendet wurden, um jeweils ein Heparinigel zu ergeben. Toyopearl HW60, Toyopearl HW65 und Toyopearl HW75 sind alle kommerziell erhältliche vernetzte Polyacrylatgele mit einer gleichförmigen Struktur, hergestellt durch Toyo Soda Manufacturing Co., Ltd. Die Mengen des immobilisierten Heparins betragen 1,8 mg, 1,4 mg bzw. 0,8 mg/ml des Schüttvolumens.

Referenzbeispiel 4

[0031] Cellulofine GC 700 (ein kommerziell erhältliches poröses Cellulosegel, hergestellt von Chisso Corporation, Ausschlußgrenze: 4×10^5 , Partikelgröße: 45 bis 105 μm) mit einer gleichförmigen Struktur wurde als ein Träger verwendet.

[0032] Das Gel wurde durch einen Filter abgesaugt und 4 g 20%ige NaOH und 12 g Heptan wurden zu 10 g des abgesaugten Gels hinzugefügt. Ein Tropfen Tween 20 (nichtionisches oberflächenaktives Mittel) wurde weiter zu dem Reaktionsgemisch hinzugefügt, das zum Dispergieren des Gels gerührt wurde. Nach 2-stündigem Rühren bei 40°C wurden 5 g Epichlorhydrin zum Reaktionsgemisch hinzugefügt, das weiter bei 40°C 2 Stunden gerührt wurde. Danach ließ man das Reaktionsgemisch stehen, der resultierende Überstand wurde abdekantiert, und das Gel wurde mit Wasser gewaschen, um Epoxygruppen in das Gel einzuführen. Zum resultierenden epoxyaktivierten Gel wurden 15 ml konzentriertes wäßriges Ammoniak hinzugefügt, und das Reaktionsgemisch wurde 1,5 Stunden bei 40°C gerührt, durch einen Filter abgesaugt und mit Wasser gewaschen, um Aminogruppen in das Gel einzuführen.

[0033] Eine 3 ml-Portion des so erhaltenen aktivierten Gels, enthaltend Aminogruppen, wurde zu 10 ml einer wäßrigen Lösung (pH 4,5), enthaltend 200 mg Heparin, hinzugefügt. Zum resultierenden Reaktionsgemisch wurden 200 mg 1-Ethyl-3-(dimethylaminopropyl)-carbodiimid hinzugefügt, während das Reaktionsgemisch bei pH 4,5 gehalten wurde, und anschließend wurde das Reaktionsgemisch 24 Stunden bei 4°C geschüttelt. Nach Vervollständigung der Reaktion wurde das resultierende Reaktionsgemisch nacheinander mit 2 M wäßriger NaCl-Lösung, 0,5 M wäßriger NaCl-Lösung und Wasser gewaschen, unter Bildung des gewünschten Heparin-Cellulofine A-3. Die Menge des immobilisierten Heparins betrug 2,5 mg/ml Schüttvolumen.

Referenzbeispiele 5 bis 6

[0034] Die Verfahren von Referenzbeispiel 4 wurden wiederholt, außer daß Cellulofine A-2 (Ausschlußgrenze: 7×10^5 , Teilchengröße: 45 bis 105 μm) bzw. Cellulofine A-3 (Ausschlußgrenze: 5×10^5 , Teilchengröße: 45 bis 105 μm) anstelle von Cellulofine GC 700 verwendet wurden, um jeweils ein Heparin-gel zu ergeben. Sowohl Cellulofine A-2 als auch Cellulofine A-3 sind kommerziell erhältliche poröse Cellulosegele mit einer einheitlichen Struktur, hergestellt von Chisso Corporation. Die Mengen des immobilisierten Heparins betragen 2,2 mg bzw. 1,8 mg/ml des Schüttvolumens.

Referenzbeispiel 7

[0035] Die Verfahren von Referenzbeispiel 4 wurden wiederholt, außer daß Cellulofine A-3 mit einer Teilchengröße von 150 bis 200 μm anstelle von 45 bis 105 μm verwendet wurde. Die Menge des immobilisierten Heparins betrug 1,5 mg/ml Schüttvolumen.

Beispiel 4

[0036] Die Verfahren von Referenzbeispiel 3 wurden wiederholt, außer daß Toyopearl HW65 anstelle von Toyopearl HW55 und Chondroitinpolysulfat anstelle von Heparin verwendet wurden, um das gewünschte Chondroitinpolysulfat-Toyopearl HW65 zu erhalten. Die Menge des immobilisierten Chondroitinpolysulfats betrug 1,2 mg/ml Schüttvolumen.

Referenzbeispiel 8

[0037] Zu 4 ml Cellulofine A-3 wurde Wasser zum Auffüllen des Volumens auf 10 ml hinzugefügt, und dann wurden 0,5 Mol NaIO_4 hinzugefügt. Nach 1-stündigem Rühren bei Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch mittels Filtration mit Wasser gewaschen, um Aldehydgruppen in das Gel einzuführen. Das so erhaltene Gel wurde in 10 ml Phosphatpuffer von pH 8 suspendiert und nach Zugabe von 50 mg Ethylendiamin 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Gel wurde abfiltriert und anschließend in 10 ml 1%iger NaBH_4 -Lösung suspendiert. Nach 15-minütiger Reduktionsreaktion wurde das Reaktionsgemisch abfiltriert und mit Wasser gewaschen, um Aminogruppen in das Gel einzuführen.

[0038] In 10 ml 0,25 M NaIO_4 -Lösung wurden 300 mg Natriumsalz der Dextranschwefelsäure gelöst. Nach 4-stündigem Rühren bei Raumtemperatur wurden 200 mg Ethylenglykol zur resultierenden Lösung hinzugefügt und eine Stunde gerührt. Die resultierende Lösung wurde auf pH 8 eingestellt und dann wurde das obige Gel, enthaltend Aminogruppen, in der Lösung suspendiert und 24 Stunden gerührt. Nach Vervollständigung der Reaktion wurde das Gel filtriert, mit Wasser gewaschen und dann in 10 ml 1%iger NaBH_4 -Lösung suspendiert. Die resultierende Suspension wurde 15 Minuten der Reduktionsreaktion unterzogen und durch Filtration mit Wasser gewaschen, um das gewünschte Natriumsalz des Dextransulfat-Cellulofins A-3 zu geben. Die Menge des immobilisierten Natriumsalzes des Dextransulfats betrug 0,5 mg/ml des Schüttvolumens.

Referenzbeispiel 9

[0039] Cellulofine A-3 wurde auf die gleiche Weise wie in Referenzbeispiel 4 behandelt, um Epoxygruppen in das Gel einzuführen.

[0040] 2 ml des so erhaltenen epoxyaktivierten Gels wurden zu 2 ml einer wäßrigen Lösung, enthaltend 0,5 g Natriumsalz von Dextransulfat (innere Viskosität 0,055 dl/g, mittlerer Polymerisationsgrad: 40, Schwefelgehalt: 19 Gew.-%), hinzugefügt, und das Reaktionsgemisch wurde auf pH 12 eingestellt. Die Konzentration des Natriumsalzes von Dextransulfat betrug ungefähr 10 Gew.-%. Das resultierende Reaktionsgemisch wurde abfiltriert und nacheinander mit 2 M wäßriger NaCl-Lösung, 0,5 M wäßriger NaCl-Lösung und Wasser gewaschen, um das gewünschte Natriumsalz des Dextransulfat-Cellulofins A-3 zu ergeben. Die zurückbleibenden

unumgesetzten Epoxygruppen wurden mit Monoethanolamin blockiert. Die Menge des immobilisierten Natriumsalzes von Dextransulfat betrug 1,5 mg/ml des Schüttvolumens.

Referenzbeispiel 10

[0041] Zu 5 g durch einen Filter abgesaugtem Cellulofine A-3 wurden 2,5 ml 1,4-Butandiolglycidylether und 7,5 ml 0,1 N wäßrige NaOH-Lösung hinzugefügt, und das Reaktionsgemisch wurde 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, um Epoxygruppen in das Gel einzuführen.

[0042] Das so erhaltene epoxyaktivierte Gel wurde mit Natriumsalz von Dextransulfat auf die gleiche Weise wie in Referenzbeispiel 9 umgesetzt, um das gewünschte Natriumsalz von Dextranschwefelsäure (bzw. sulfat)-Cellulofine A-3 zu geben. Die Menge des immobilisierten Natriumsalzes von Dextransulfat betrug 1,8 mg/ml Schüttvolumen.

Referenzbeispiel 11

[0043] Die Verfahren von Referenzbeispiel 9 wurden wiederholt, außer daß Cellulofine A-6 (ein kommerziell erhältliches poröses Cellulosegel, hergestellt von Chisso Corporation, Ausschlußgrenze: 1×10^8 , Teilchengröße: 45 bis 105 μm) mit einer einheitlichen Struktur anstelle von Cellulofine A-3 verwendet wurde, um das gewünschte Natriumsalz von Dextransulfat-Cellulofine A-6 zu ergeben. Die Menge des immobilisierten Natriumsalzes von Dextransulfat betrug 1,2 mg/ml des Schüttvolumens.

Referenzbeispiel 12

[0044] Toyopearl HW65 wurde in der gleichen Weise wie in Referenzbeispiel 3 behandelt, um Epoxygruppen in das Gel einzuführen.

[0045] 2 ml des so erhaltenen epoxyaktivierten Gels wurden in der gleichen Weise behandelt wie in Referenzbeispiel 9, um das gewünschte Natriumsalz von Dextransulfat-Toyopearl HW65 zu geben. Die Menge des immobilisierten Natriumsalzes von Dextransulfat betrug 0,4 mg/ml des Schüttvolumens.

Referenzbeispiel 13

[0046] Cellulofine A-3 wurde auf die gleiche Weise behandelt wie in Referenzbeispiel 4, um Epoxygruppen in das Gel einzuführen.

[0047] Zu 10 ml des so erhaltenen epoxyaktivierten Gels wurden 50 mg Protein A hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde auf pH 9,5 eingestellt und 24 Stunden der Reaktion bei Raumtemperatur unterzogen. Das resultierende Reaktionsgemisch wurde nacheinander mit 2 M wäßriger NaCl-Lösung, 0,5 M wäßriger NaCl-Lösung und Wasser gewaschen. Die verbleibenden unumgesetzten Epoxygruppen wurden durch 16-stündige Reaktion mit Ethanolamin blockiert. Das Reaktionsgemisch wurde dann mit Wasser gewaschen, um das gewünschte Protein-A-Cellulofine A-3 zu ergeben.

Referenzbeispiel 14

[0048] Die Verfahren von Referenzbeispiel 13 wurde wiederholt, außer daß Cellulofine A-7 (ein kommerziell erhältliches poröses Cellulosegel, hergestellt von Chisso Corporation, Ausschlußgrenze: 5×10^6 , Teilchengröße: 45 bis 105 μm) mit einer einheitlichen Struktur anstelle von Cellulofine A-3 verwendet wurde, und die Kupplungsreaktion wurde bei pH 8,5 durchgeführt, um das gewünschte Protein-A-Cellulofine A-7 zu ergeben.

Referenzbeispiel 15

[0049] Toyopearl HW65 wurde in der gleichen Weise wie in Referenzbeispiel 3 behandelt, um Epoxygruppen in das Gel einzuführen.

[0050] Das so erhaltene aktivierte Gel wurde mit Protein A in der gleichen Weise behandelt wie in Referenzbeispiel 13, um das gewünschte Protein A-Toyopearl HW65 zu geben.

Referenzbeispiel 16

[0051] 20 ml Cellulofine A-3 wurden in Wasser dispergiert. Dazu wurden 6 g Cyanbromid langsam hinzugefügt, während das Reaktionsgemisch bei pH 11 bis 12 gehalten wurde. Nach 10-minütigem Rühren wurde das Gel abfiltriert und mit kaltem Wasser und 0,1 M wäßriger NaHCO₃-Lösung gewaschen, unter Bildung eines aktivierten Gels. Das so erhaltene aktivierte Gel wurde zu 20 ml 0,1 M wäßriger NaHCO₃-Lösung, enthaltend 1,5 g Polymyxin B-Sulfat, gegeben und 24 Stunden bei 4°C geschüttelt. Die verbleibenden nichtumgesetzten aktiven Gruppen wurden mit Monoethanolaminlösung blockiert, und dann wurde das gewünschte Polymyxin-B-Cellulofine A-3 erhalten.

Referenzbeispiel 17

[0052] Cellulofine A-3 wurde auf die gleiche Weise wie in Referenzbeispiel 4 behandelt, um Epoxygruppen in das Gel einzuführen. Das so erhaltene epoxyaktivierte Gel wurde mit Polymyxin B-sulfat auf die gleiche Weise wie in Referenzbeispiel 16 unter Bildung des gewünschten Polymyxin-B-Cellulofine A-3 umgesetzt.

Referenzbeispiel 18

[0053] Cellulofine A-2 wurde auf die gleiche Weise wie in Referenzbeispiel 4 behandelt, um Epoxygruppen in das Gel einzuführen. Zu 1 ml des so erhaltenen epoxyaktivierten Gels wurden 10 mg IgG hinzugefügt, und das Reaktionsgemisch wurde auf pH 9 eingestellt und der Reaktion 24 Stunden bei Raumtemperatur unterzogen. Das Gel wurde abfiltriert und nacheinander mit 2 M wäßriger NaCl-Lösung, 0,5 M wäßriger NaCl-Lösung und Wasser gewaschen. Nachdem die verbleibenden nichtumgesetzten Epoxygruppen mit Monoethanolaminlösung blockiert waren, wurde das gewünschte IgG-Cellulofine A-3 erhalten.

Referenzbeispiel 19

[0054] Cellulofine A-3 wurde auf die gleiche Weise wie in Referenzbeispiel 4 behandelt, um Epoxygruppen in das Gel einzuführen. 1 ml des so erhaltenen epoxyaktivierten Gels wurde mit 10 mg hitzedenaturiertem IgG auf die gleiche Weise wie in Referenzbeispiel 18 bei pH 8,5 umgesetzt, unter Bildung des gewünschten hitzedenaturierten IgG-Cellulofine A-3.

Referenzbeispiel 20

[0055] Cellulofine A-7 wurde auf die gleiche Weise wie in Referenzbeispiel 4 behandelt, um Epoxygruppen in das Gel einzuführen. 1 ml des so erhaltenen epoxyaktivierten Gels wurde mit 100 mg Hämoglobin auf die gleiche Weise wie in Referenzbeispiel 18 bei pH 8,5 umgesetzt, unter Bildung des gewünschten Hämoglobin-Cellulofine A-7.

Referenzbeispiel 21

[0056] Toyopearl HW55 wurde in der gleichen Weise wie in Referenzbeispiel 3 behandelt, um Epoxygruppen in das Gel einzuführen.

[0057] Das so erhaltene aktivierte Gel wurde mit Hämoglobin in der gleichen Weise behandelt wie in Referenzbeispiel 20, um das gewünschte Hämoglobin-Toyopearl HW55 zu geben.

Referenzbeispiel 22

[0058] Cellulofine A-7 wurde auf die gleiche Weise wie in Referenzbeispiel 4 behandelt, um Epoxygruppen in das Gel einzuführen. Das so erhaltene epoxyaktivierte Gel wurde mit DNA auf die gleiche Weise wie in Referenzbeispiel 18 umgesetzt, unter Bildung des gewünschten DNA-Cellulofine A-7.

Referenzbeispiel 23

[0059] Cellulofine A-3 wurde auf die gleiche Weise wie in Referenzbeispiel 4 behandelt, um Epoxygruppen in das Gel einzuführen. Das so erhaltene epoxy-aktivierte Gel wurde mit Anti-DNA-Kaninchen-Antikörper auf die gleiche Weise wie in Referenzbeispiel 18 bei pH 8,5 umgesetzt, unter Bildung des gewünschten Anti-DNA-Kaninchen-Antikörper-Cellulofine A-3.

Referenzbeispiel 24

[0060] Cellulofine A-3 wurde auf die gleiche Weise wie in Referenzbeispiel 4 behandelt, um Epoxygruppen in das Gel einzuführen. Das so erhaltene epoxyaktivierte Gel wurde mit einer Acetylcholinrezeptorfraktion auf die gleiche Weise wie in Referenzbeispiel 18 umgesetzt, unter Bildung des gewünschten Acetylcholinrezeptorfraktion-Cellulofine A-3.

Referenzbeispiel 25

[0061] FPG 2000 (Ausschlußgrenze: 1×10^9 , Partikelgröße: 80 bis 120 mesh, durchschnittliche Porengröße: 1950 Å) wurde in verdünnter Salpetersäure für 3 Stunden erhitzt. Nach Waschen und Trocknen wurde das Gel bei 500°C für 3 Stunden erhitzt und dann in einer 10%igen γ -Aminopropyltriethoxysilan-Lösung in Toluol für 3 Stunden erhitzt. Nach Waschen mit Methanol wurde ein γ -Aminopropyltriethoxysilan-aktiviertes Glas erhalten. 2 g des so erhaltenen Glases wurden zu 10 ml einer wäßrigen Lösung (pH 4,5) gegeben, die 200 mg Heparin enthielt. Die Reaktionsmischung wurde in der gleichen Weise wie in Referenzbeispiel 3 behandelt, um das gewünschte Heparin-FPG 2000 zu ergeben. Die Menge des immobilisierten Heparins betrug 1,2 mg/ml des Schüttvolumens.

Referenzbeispiele 26 bis 28

[0062] Die Verfahren von Referenzbeispiel 25 wurden wiederholt, ausgenommen daß FPG 700 (ein kommerziell erhältliches poröses Glas, hergestellt von Wako Pure Chemical Industry Ltd., Ausschlußgrenze: 5×10^7 , Partikelgröße: 80 bis 120 mesh, durchschnittliche Porengröße: 70 Å), FPG 1000 (ein kommerziell erhältliches poröses Glas, hergestellt von Wako Pure Chemical Industry Ltd., Ausschlußgrenze: 1×10^9 , Partikelgröße: 80 bis 120 mesh, durchschnittliche Porengröße: 1091 Å) und Lichrospher Si4000 (ein kommerziell erhältliches poröses Silicagel von Wako Pure Chemical Industry Ltd., Ausschlußgrenze: 1×10^9 , Partikelgröße: 10 μ m, durchschnittliche Porengröße: 4000 Å) anstelle von FPG 2000 verwendet wurden. Die Mengen des immobilisierten Heparins waren 3,2 mg, 2,2 mg bzw. 0,5 mg/ml des Schüttvolumens.

Referenzbeispiel 29

[0063] Die Verfahren von Referenzbeispiel 25 wurden wiederholt, ausgenommen daß Chondroitinpolysulfat anstelle von Heparin verwendet wurde, um das gewünschte Chondroitinpolysulfat-FPG 2000 zu erhalten. Die Menge des immobilisierten Chondroitinpolysulfats betrug 1,0 mg/ml des Schüttvolumens.

Referenzbeispiel 30

[0064] FPG 2000 wurde in der gleichen Weise behandelt wie in Referenzbeispiel 25, um die γ -Aminopropylgruppen in das Gel einzuführen. Das so erhaltene aktivierte Gel wurde mit dem Natriumsalz des Dextransulfats in der gleichen Weise wie in Referenzbeispiel 8 umgesetzt, um das gewünschte Natriumsalz des Dextransulfats-FPG 2000 zu erhalten. Die Menge des immobilisierten Natriumsalzes des Dextransulfats betrug 0,5 mg/ml des Schüttvolumens.

Referenzbeispiel 31

[0065] FPG 2000 wurde unter Rückfluß in einer 1%igen Lösung von γ -Glycidoxypropyltrimethoxysilan für 3 Stunden erhitzt und dann mit Methanol gewaschen. Das so erhaltene aktivierte Gel wurde mit dem Natriumsalz von Dextransulfat in der gleichen Weise wie in Referenzbeispiel 9 umgesetzt, ausgenommen daß die Reaktion bei pH 8,5 bis 9 und bei 45°C durchgeführt wurde, um das gewünschte Natriumsalz von Dextransulfat-FPG 2000 zu ergeben.

Referenzbeispiel 32

[0066] FPG 1000 wurde in der gleichen Weise wie in Referenzbeispiel 25 aktiviert. Das so erhaltene aktivierte Gel wurde mit Protein A in der gleichen Weise wie in Referenzbeispiel 13 umgesetzt, um das gewünschte Protein A-FPG 1000 zu erhalten.

Referenzbeispiel 33

[0067] FPG 2000 wurde in der gleichen Weise wie in Referenzbeispiel 31 aktiviert. Das so erhaltene aktivierte

Gel wurde mit Polymyxin B in der gleichen Weise wie in Referenzbeispiel 16 umgesetzt, um das gewünschte Polymyxin B-FPG 2000 zu erhalten.

Referenzbeispiel 34

[0068] FPG 1000 wurde in der gleichen Weise wie in Referenzbeispiel 25 aktiviert. Das so erhaltene aktivierte Gel wurde mit hitzedenaturiertem IgG in der gleichen Weise wie in Referenzbeispiel 18 umgesetzt, um das gewünschte hitzedenaturierte IgG-FPG 1000 zu erhalten.

Referenzbeispiel 35

[0069] FPG 700 wurde in der gleichen Weise wie in Referenzbeispiel 31 aktiviert. Das so erhaltene aktivierte Gel wurde mit DNA in der gleichen Weise wie in Referenzbeispiel 18 umgesetzt, um das DNA-FPG 700 zu erhalten.

Testbeispiel 1

[0070] Jedes Adsorptionsmittel, wie oben erhalten, wurde gleichförmig in eine Säule gepackt (inneres Volumen: ungefähr 3 ml, innerer Durchmesser: 9 mm, Höhe: 47 mm) und 18 ml Plasma, enthaltend 200 U Heparin, wurden durch die Säule bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,3 ml/min. durchgeleitet, mit variieren der Herkunft des Plasmas je nach Art der gewünschten zu entfernenden Substanz. Das heißt, menschliches Plasma erhalten aus familiärer Hypercholesterinämie, normales menschliches Plasma wie auch normales menschliches Plasma, enthaltend ungefähr 100 µg/ml eines kommerziell erhältlichen Endotoxins, menschliches Plasma stammend von Rheumatismus, menschliches Plasma stammend von systemischem Lupus erythematodes bzw. menschliches Plasma stammend von Myasthenia gravis wurden für die Tests zum Entfernen von VLDL und/oder LDL; IgG, C_{1g} oder Haptoglobin; Endotoxin; rheumatischer Faktor; Anti-DNA-Antikörper oder DNA und Anti-Acetylcholinrezeptor-Antikörper verwendet. Der Druckabfall in der Säule betrug 0,02 bar (15 mmHg) oder weniger während der Testphase und kein Zusammenklumpen wurde beobachtet. In jedem Adsorptionsmittel wurde eine zu entfernende Substanz im Plasma, die durch die Säule geleitet wurde, bestimmt, um eine Entfernungseffizienz zu erhalten. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1

Beispiel-Nr.	Ligand	Träger	Kupplungsverfahren	Zu entfernende Substanz	Entfernungs-effizienz (%)
Ref. 3	Heparin	Toyopearl HW55	Epichlorhydrin-Ammoniak	VLDL und/oder LDL	23
Bsp. 1	"	Toyopearl HW60	"	"	31
Bsp. 2	"	Toyopearl HW65	"	"	54
Bsp. 3	"	Toyopearl HW75	"	"	51
Ref. 4	"	Cellulofine GC700	"	"	15
Ref. 5	"	Cellulofine A-2	"	"	26
Ref. 6	"	Cellulofine A-2 (Partikelgröße: 45 bis 105 µm)	"	"	56
Ref. 7	"	Cellulofine A-3 (Partikelgröße: 150 bis 200 µm)	"	"	55
Ref. 25	"	FPG 2000	Aminosilan	"	57
Ref. 26	"	FPG 700	"	"	16
Ref. 27	"	FPG 1000	"	"	28
Ref. 28	"	Lichrosphere Si 4000	"	"	24
Bsp. 4	Chondroitinpolysulfat	Toyopearl HW65	Epichlorhydrin-Ammoniak	"	46
Ref. 29	"	FPG 2000	Aminosilan	"	45

Tabelle 1 (Forts.)

Beispiel-Nr.	Ligand	Träger	Kupplungsverfahren	Zu entfernende Substanz	Entfernungseffizienz (%)
Ref. 8	Natriumsalz von Dextransulfat	Cellulofine A-3	NaIO ₄ -Diamin	VLDL und/oder LDL	38
Ref. 30	"	FPG 2000	"	"	37
Ref. 9	"	Cellulofine A-3	Epichlorhydrin	"	50
Ref. 10	"	Cellulofine A-3	Bisepoxid	"	65
Ref. 11	"	Cellulofine A-6	Epichlorhydrin	"	60
Ref. 12	"	Toyopearl HW65	"	"	42
Ref. 31	"	FPG 2000	Epoxyasilan	"	60
Ref. 13	Protein A	Cellulofine A-3	Epichlorhydrin	IgG	35
Ref. 14	"	Cellulofine A-7	"	"	45
Ref. 15	"	Toyopearl HW65	Epichlorhydrin-Ammoniak	"	35
Ref. 32	"	FPG 1000	Aminosilan	"	41
Ref. 16	Polymyxin B	Cellulofine A-3	CNBr	Endotoxin	60
Ref. 17	"	"	"	"	62
Ref. 33	"	FPG 2000	Epoxyasilan	"	54
Ref. 18	IgG	Cellulofine A-2	Epichlorhydrin	C _{1q}	30
Ref. 19	hitzenaturiertes IgG	Cellulofine A-3	"	rheumatoider Faktor	54

Tabelle 1 (Forts.)

Beispiel-Nr.	Ligand	Träger	Kupplungsverfahren	Zu entfernende Substanz	Entfernungs-effizienz (%)
Ref. 34	hitzedenaturiertes IgG	FPG 1000	Aminosilan	rheumatoider Faktor	51
Ref. 20	Hämoglobin	Cellulofine A-7	Epichlorhydrin	Haptoglobin	50
Ref. 21	"	Toyopearl HW55	Epichlorhydrin-Ammoniak	"	41
Ref. 22	DNA	"	"	Anti-DNA-Antikörper	43
Ref. 35	"	FPG 700	Epoxyasilan	"	30
Ref. 23	Anti-DNA-Kaninchen-Antikörper	Cellulofine A-3	Epichlorhydrin	DNA	47
Ref. 24	Acetylcholinrezeptorfraktion	"	"	Anti-Acetylcholinrezeptor-Antikörper	36

[0071] Im Hinblick auf das Kupplungsverfahren in Tabelle 1 werden das Epichlorhydrin-Verfahren, das Epichlorhydrin-Ammoniak-Verfahren, NaIO_4 -Diamin, Bisepoxid-Verfahren bzw. CNBr -Verfahren auf die gleichen Weisen wie in Referenzbeispielen 3 und 4, 8, 10, 16, 26 und 32 durchgeführt.

Beispiel 36

[Wirkung der inneren Viskosität und Schwefelgehalt des Dextransulfats und/oder des Salzes davon]

[0072] Cellulofine A-3 wurde auf die gleiche Weise wie in Referenzbeispiel 4 behandelt, um Epoxygruppen in das Gel einzuführen. Das so erhaltene epoxyaktivierte Gel wurde jeweils mit dem Natriumsalz von Dextransulfat mit der inneren Viskosität und dem Schwefelgehalt, die in der folgenden Tabelle 2 gezeigt sind (Präparate-Nrn. (1) bis (7)), auf die gleiche Weise wie in Referenzbeispiel 9 umgesetzt.

[0073] Eine 1 ml-Portion des jeweils erhaltenen Adsorptionsmittels wurde in eine Säule gepackt und dann wurden 6 ml menschliches Plasma, enthaltend 300 mg/dl Gesamtcholesterin, erhalten von einem Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie, durch die Säule geleitet mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,3 ml/min. Die Entfernungseffizienz für LDL wurde aus der Menge des adsorbierten LDL, gemessen unter Verwendung der Gesamtmenge des Cholesterins, als Kennzeichen bestimmt. Das heißt, die Menge des Cholesterins im verwendeten menschlichen Plasma war größtenteils aus LDL erhalten. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 gezeigt.

Tabelle 2

Präparate-Nr.	Intrinsische Viskosität (dl/g)	Schwefelgehalt (Gew.%)	Konzentration des Natriumsalzes des Dextransulfats im Reaktionsssystem (Gew.%)	Menge des immobilisierten Dextransulfats (mg/ml des Schüttvolumens)	Entfernungseffizienz
(1)	0,20	17,7	ungefähr 10	4,2	18
(2)	0,124	5,7	"	2,5	17
(3)	0,027	17,7	"	2	62
(4)	0,055	19,0	"	1,5	50
(5)	0,083	19,2	"	4,0	44
(6)	0,118	17,7	"	4,3	39
(7)	0,055	19,0	2,5	0,15	32

Referenzbeispiel 37 [Wirkung der Menge der eingeführten Epoxygruppen]

[0074] Toyopearl 65 wurde in der gleichen Weise behandelt wie in Referenzbeispiel 3, um Epoxygruppen in das Gel einzuführen, und CSKA-3 (ein kommerziell erhältliches poröses Cellulosegel, hergestellt von Chisso Corporation, Ausschlußgrenze: 5×10^7 , Teilchengröße: 45 bis 105 μm) mit einer einheitlichen Struktur wurde auf die gleiche Weise wie in Referenzbeispiel 4 behandelt, um Epoxygruppen in das Gel einzuführen. Die Mengen der eingeführten Epoxygruppen betragen 250 μmol bzw. 30 $\mu\text{mol/ml}$ des Schüttvolumens.

[0075] Jedes Gel wurde mit dem Natriumsalz von Dextransulfat (intrinsische Viskosität: 0,027 dl/g; Schwefelgehalt: 17,7 Gew.-%) auf die gleiche Weise wie in Referenzbeispiel 9 umgesetzt, außer daß die Konzentration des Natriumsalzes des Dextransulfats bezogen auf das Gewicht des gesamten Reaktionssystems mit Ausnahme des Trockengewichts des Gels aufgezogen wurde.

[0076] Das so erhaltene Adsorptionsmittel wurde der Bestimmung der Entfernungseffizienz für LDL auf die gleiche Weise wie in Referenzbeispiel 36 unterzogen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

Tabelle 3

Träger	Menge der eingeführten Epoxygruppen ($\mu\text{mol/ml}$ des Schüttvolumens)	Menge des immobilisierten Natriumsalzes des Dextransulfats		Konzentration des Natriumsalzes des Dextransulfats (Gew.%)	Entfernungseffizienz
		mg/ml des Schüttvolumens	$\mu\text{mol/ml}$ des Schüttvolumens		
Toyoparl HW65	250	0,4	1,6	13	40
CSKA-3	30	0,15	5	2,5	36
"	30	2,3	76	13	63

Referenzbeispiel 38

[0077] Eine 1 ml-Portion des Adsorptionsmittels erhalten in Referenzbeispiel 36 Präparat-Nr. (3) wurde gleichförmig in eine Säule mit einem Innenvolumen von 1 ml gepackt, und 6 ml normales menschliches Plasma, enthaltend LDL und HDL-Cholesterin in dem Verhältnis von ungefähr 1:1, wurden durch die Säule geleitet. LDL im durch die Säule geleiteten Plasma wurde größtenteils reduziert, während HDL mäßig reduziert wurde.

Referenzbeispiel 39

[0078] Eine 1 ml-Portion des Adsorptionsmittels erhalten in Referenzbeispiel 36 Präparat-Nr. (3) wurde gleichförmig in eine Säule mit einem Innenvolumen von 1 ml gepackt, und 6 ml normales Kaninchenplasma, enthaltend Lipoproteine von VLDL, LDL und HDL, wurden durch die Säule geleitet. Das Plasma, das vor bzw. nach der Säulenbehandlung erhalten wurde, wurde durch Polyacrylamid-Disk-Gel-Elektrophorese bestimmt. Die Ergebnisse sind in [Fig. 2](#) gezeigt. In [Fig. 3](#) zeigen die Kurven A bzw. B die Ergebnisse erhalten vor und nach der Säulenbehandlung. Die Ordinatenachse bedeutet die Extinktion bei 570 nm und die Abszisse bedeutet die Wanderungspositionen, bei welchen die Banden von VLDL, LDL bzw. HDL erscheinen.

[0079] Wie in [Fig. 2](#) gezeigt, werden VLDL und LDL erheblich adsorbiert, während HDL nicht adsorbiert wird.

Referenzbeispiel 40

[0080] Die Adsorptionsmittel erhalten in den Referenzbeispielen 3, 4, 5 und 6 und 9 bis 12 und Beispielen 1 bis 3 wurden 15 Minuten bei 120°C in einem Autoklaven sterilisiert. Jede der erhaltenen sterilisierten Adsorptionsmittel wurde der Bestimmung der Entfernungseffizienz für LDL auf die gleiche Weise wie in Testbeispiel 1 unterzogen. Als Ergebnis liegen die Entfernungseffizienzen nicht unter denen, die ohne Sterilisation im Autoklaven erhalten wurden. Zusätzlich änderte sich der Druckabfall nicht.

Patentansprüche

1. Adsorptionsmittel zur selektiven Entfernung von Lipoproteinen niedriger Dichte (LDL) und/oder Lipoproteinen sehr niedriger Dichte (VLDL) aus Blut oder Plasma in einer extrakorporalen Zirkulationsbehandlung, das umfaßt: ein wasserunlösliches, poröses, vernetztes Polyacrylat-Hartgel mit einer Ausschlußgrenze von 10^6 bis 10^9 Dalton, auf dem als Ligand eine Polyanionenverbindung mit einer Affinität für LDL und/oder VLDL, mit Ausnahme eines Dextransulfats, eines Salzes davon oder einer Mischung des Dextransulfats und Salzen davon mit einem Schwefelgehalt von nicht weniger als 15 Gew.-%, durch eine kovalente Bindung immobilisiert ist.

2. Adsorptionsmittel nach Anspruch 1, worin die genannte Polyanionenverbindung eine sulfatisierte Verbindung ist, die durch Sulfatisierung einer hydroxyhaltigen Verbindung erhalten wurde.

3. Adsorptionsmittel nach Anspruch 2, worin die sulfatisierte Verbindung ein sulfatisiertes Kohlenhydrat ist.

4. Adsorptionsmittel nach Anspruch 3, worin das sulfatisierte Kohlenhydrat ein sulfatisiertes Saccharid ist.

5. Adsorptionsmittel nach Anspruch 4, worin das sulfatisierte Saccharid ein sulfatisiertes Polysaccharid ist.

6. Adsorptionsmittel nach Anspruch 5, worin das sulfatisierte Polysaccharid ein Bestandteil ist, der aus der Gruppe ausgewählt wird, die aus Heparin, Chondroitinsulfat und Salzen davon ausgewählt wird.

7. Adsorptionsmittel nach Anspruch 2, worin die sulfatisierte Verbindung ein sulfatisierter mehrwertiger Alkohol ist.

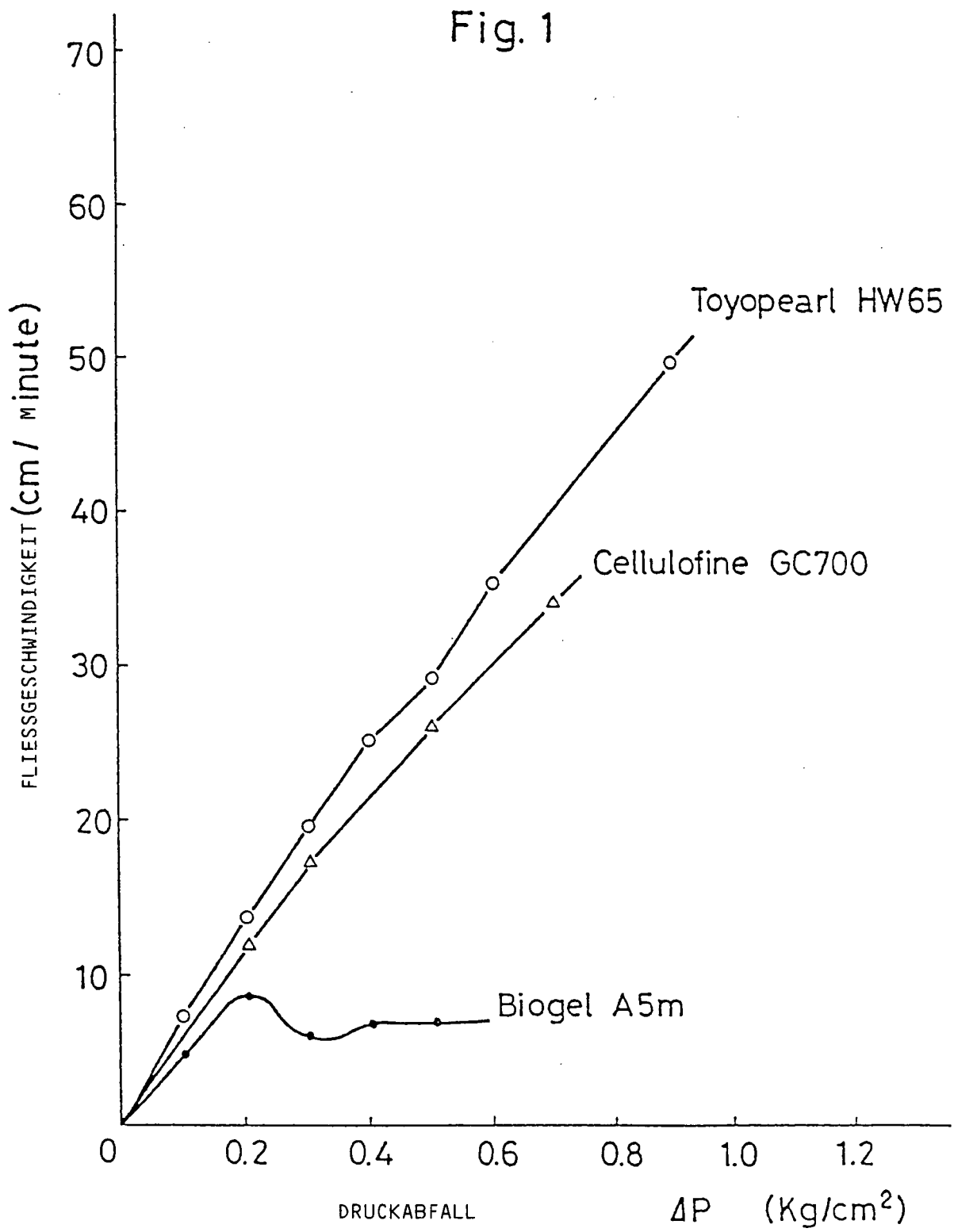
8. Adsorptionsmittel nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 7, worin die Polyanionenverbindung in einer Menge von 0,02 bis 100 mg/ml des Schüttungsvolumens immobilisiert ist.

9. Adsorptionsmittel nach Anspruch 8, worin die Polyanionenverbindung in einer Menge von nicht weniger als 0,2 mg/ml des Schüttungsvolumens immobilisiert ist.

10. Verfahren zur Herstellung eines Adsorbens nach Anspruch 1, wobei das wasserunlösliche, poröse, vernetzte Polyacrylat-Hartgel mit Epichlorhydrin oder einer Polyoxiranverbindung zur Einführung von Epoxygruppen auf das Gel umgesetzt wird und dann das resultierende epoxyaktivierte Gel mit der Polyanionenver-

bindung umgesetzt wird.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen



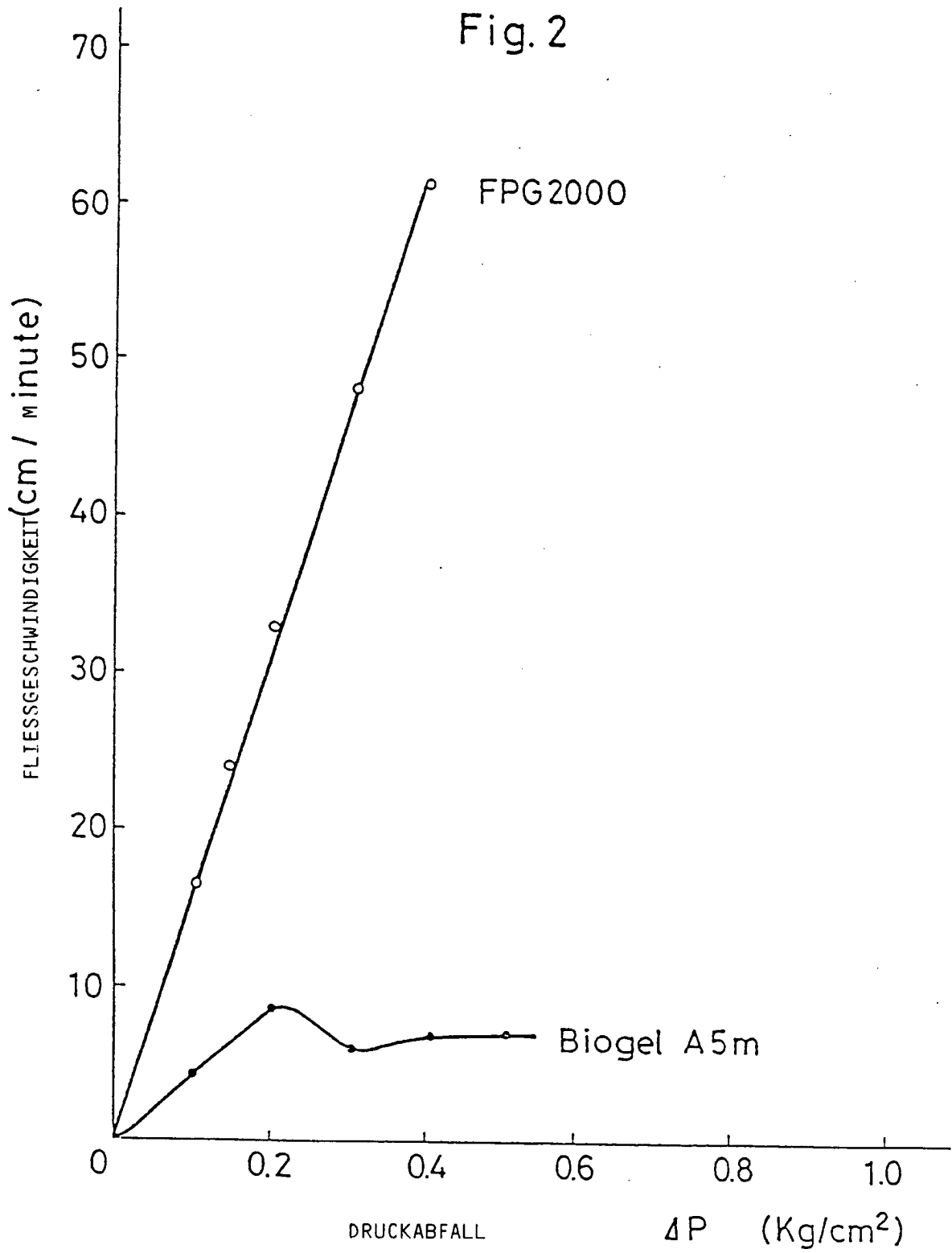


Fig. 3

