(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号

特表2006-508703

(P2006-508703A)

(43)公表日　平成18年3月16日(2006.3.16)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
A61M 1/36	(2006.01)	A61M	1/36	543	4C077
B01J 20/26	(2006.01)	A61M	1/36	545	4C081
A61L 33/00	(2006.01)	B01J	20/26	H	4G066
A61P 31/04	(2006.01)	A61L	33/00	B	
		A61L	33/00	Z	

審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 29 頁）　最終頁に続く

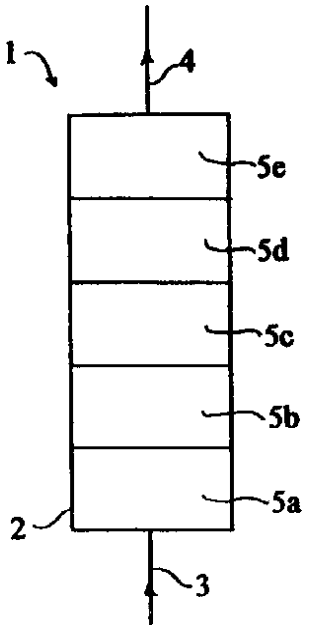
(21)出願番号　特願2003-587542 (P2003-587542)
(86)(22)出願日　平成15年4月4日 (2003.4.4)
(85)翻訳文提出日　平成16年10月25日 (2004.10.25)
(86)国際出願番号　PCT/SE2003/000553
(87)国際公開番号　WO2003/090924
(87)国際公開日　平成15年11月6日 (2003.11.6)
(31)優先権主張番号　0201257-3
(32)優先日　平成14年4月25日 (2002.4.25)
(33)優先権主張国　スウェーデン(SE)

(71)出願人　504397055
アルテコ　メディカル　アクティエボラーグ
スウェーデン国，エス－２２２　２２　ルンド，リッラ　グロブロエデルスガタン　３セー
(74)代理人　100099759
弁理士　青木　篤
(74)代理人　100077517
弁理士　石田　敬
(74)代理人　100087871
弁理士　福本　積
(74)代理人　100087413
弁理士　古賀　哲次

最終頁に続く

(54)【発明の名称】改善された分離

(57)【要約】
本発明は、全血又は体液から、少なくとも１の成分を選択的に結合し且つ除去するための方法であって、それによって血液又は体液が硬質一体型分離マトリックスをそこから排除されることなく、通過させられる、前記方法に関する。該マトリックスは、５ミクロン～５００ミクロンの範囲の孔サイズ並びに０．５cm^2～１０m^2の範囲の活性表面を有する、多孔質構造を有し、該表面はそのような成分を結合可能である。



【特許請求の範囲】
【請求項１】
全血又は体液から、少なくとも１の成分を選択的に結合し、且つ分離するための方法であって、ここで、前記血液又は体液が、硬質一体型分離マトリックスを、そこから排除されることなく通過させられ、前記マトリックスが、５ミクロン～５００ミクロンの範囲の孔サイズ、並びに０．５cm^2～１０m^2の範囲の活性表面を有する多孔質構造を有し、前記少なくとも１の成分を結合可能である、前記方法。
【請求項２】
前記マトリックスがさらに、前記多孔質構造のコーティング及び／又は表面修飾によって導入された、少なくとも１の官能基を含み、前記少なくとも１の官能基が単独で又は前記多孔質構造の非機能付加領域とともに、前記少なくとも１の成分を結合可能である、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記マトリックスが、金属、無機酸化物、カーボン、ガラス、セラミック、合成ポリマー、及び／又は天然ポリマー、或いはそれらの混合物から作られる、請求項１に記載の方法。
【請求項４】
前記金属が磁性を有する、請求項３に記載の方法。
【請求項５】
前記合成又は天然ポリマーが、前記金属、表面積の広い無機酸化物、カーボン、ガラス、セラミック、合成ポリマー、及び／又は天然ポリマー、或いはそれらの混合物上にコーティングされた、請求項３又は４に記載の方法。
【請求項６】
前記合成ポリマーが、ポリオレフィン、ビニルポリマー、フッ素含有ポリマー、ポリアクリレート、ポリアミド、ポリイミド、ポリイミン、ポリスチレン及びそのコポリマー、シリコンゴム、ポリエステル、ポリカーボネート、ポリウレタン、ポリスルホネート、ポリグリコール、ポリエーテル、又はポリアルキドオキサイド、或いはそれらのコポリマー又はハイブリッドである、請求項３又は５に記載の方法。
【請求項７】
前記天然ポリマーが、ポリサッカライド、ポリ炭化水素、ポリアミノ酸、ポリ乳酸、又はポリグリコール酸、或いはそれらのコポリマー又はハイブリッドである、請求項３又は５に記載の方法。
【請求項８】
前記表面修飾が、電着、電気蒸着、プラズマ化学沈着、イオンプラズマ流からの沈着、プラズマ重合、プラズマにより促進された表面ポリマー沈着、又は化学蒸着によって達成される、請求項２に記載の方法。
【請求項９】
前記多孔質構造が、焼結、押し出し成形、型成形、又は発泡法によって得られる、請求項１に記載の方法。
【請求項１０】
前記少なくとも１の官能基が、スルフヒドリル、カルボキシレート、アミン、アルデヒド、ケトン、ヒドロキシル、ハロゲン、ヒドラジド、又は活性水素である、請求項２に記載の方法。
【請求項１１】
リガンドが、前記少なくとも１の官能基に共有結合で結合されている、請求項２に記載の方法。
【請求項１２】
前記リガンドが、タンパク質、ペプチド、抗体又はそれらの断片、炭化水素、ポリサッカライド、ホルモン、抗酸化物質、糖タンパク質、リポタンパク質、脂質、脂溶性ビタミン、胆汁酸、反応性色素、アラントイン、尿酸、又はポリミキシン、或いはそれらの組み

合わせである、請求項１１に記載の方法。
【請求項１３】
クロスリンカーが、前記少なくとも１の官能基及び前記リガンドの間に共有結合で結合されている、請求項１１又は１２に記載の方法。
【請求項１４】
前記クロスリンカーが、ホモ二機能性、ヘテロ二機能性、又は三機能性のクロスリンカーである、請求項１３に記載の方法。
【請求項１５】
前記クロスリンカーが、スペーサーとして、前記少なくとも１の官能基及び前記リガンドの間に共有結合で結合されている、請求項１３又は１４に記載の方法。
【請求項１６】
前記スペーサーが、シラン、ジイソシアネート、グリコレート、ポリエチレングリコール、サクシニミジル試薬、ジヒドラジン、アジピン酸、ジアミン、アミノ酸、オリゴアミノ酸、ポリアミノ酸、ペプチド、又はタンパク質である、請求項１５に記載の方法。
【請求項１７】
前記分離マトリックスが、ディスク、ロッド、シリンダー、リング、球、管、又は中空の管の形状を有する、請求項１に記載の方法。
【請求項１８】
請求項１～１７のいずれか１項に記載の方法であって、以下の：
（１）ハウジング；
（２）入り口；
（３）出口；及び
（４）前記少なくとも１の分離マトリックス（５ａ、５ｂ、…）；
を含む装置中で実施される、前記方法。
【請求項１９】
前記装置が数個の分離マトリックス（５ａ、５ｂ、…）を有し、ここで、各分離マトリックスが、全血又は体液からの少なくとも１の成分を選択的且つ別々に除去する、請求項１８に記載の方法。
【請求項２０】
前記装置を通過する流速が、５ml/時間～６０００ml/分の範囲である、請求項１８又は１９に記載の方法。
【請求項２１】
成分を、これを含む水性溶液から除去するための、支持体上に固定化された胆汁酸部分の使用。
【請求項２２】
前記胆汁酸部分が、デオキシコール酸部分である、請求項２１に記載の使用。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、全血又は体液からの成分の除去における改善に関する。より特別には、本発明は、血液又は体液が硬質一体型分離マトリックスを、そこから排除されることなく通過させられる、方法に関する。
【背景技術】
【０００２】
敗血症のような炎症性の過程は、ヒトにおける罹病率及び死亡率の主要な原因である。毎年、アメリカだけで、４００００００～５０００００の敗血症の症状発生によって、１００００００～１７５０００人が死亡すると推定される。ドイツにおいては、集中治療室に置かれた患者の１９％に達する敗血症の割合が注目された。敗血症はまた、非外傷性の病気の患者の間で集中治療室での死亡原因の第一位となった。過去１０年間の重い感染症の治療における主な進歩にもかかわらず、発病率及び敗血症による死亡率は、上昇を続けてい

る。

【０００３】

感染する生物の型により特徴付けられた、敗血症の３の主要な型がある。グラム陰性敗血症が最も一般的である。これらの感染症の大部分は、エシェリシア・コリ（Esherichia coli）、クレブシエラ・ニューモニエ（Klebsiella pneumoniae）及びシュードモナス・アエルギノーサ（Pseudomonas aeruginosa）によって引き起こされる。スタフィロコッカス（staphylococci）及びストレプトコッカス（streptococci）のようなグラム陽性病原体は、２番目に主要な敗血症の原因である。第３の主要な群は、カビを含む。カビ感染は、敗血症の原因の中でも比較的小さなパーセンテージを構成するが、それらは高い死亡率をもたらす。

【０００４】

敗血症における確立したメカニズムは、脂肪酸基、リン酸基、及び炭化水素鎖から成るグラム陰性細菌の毒性成分、すなわちリポ多糖細胞壁構造（LPS、エンドドキシン）、に関連している。

【０００５】

局所的に産生されるサイトカインの放出のような、エンドドキシンに対する宿主応答のいくつかは、同定されている。しかしながら、大規模な刺激の場合には、末梢血へ溢れ出て、器官不全の誘導のような潜在的な有害効果が生じる。

【０００６】

敗血症ショックの主要なメディエーターは、主要壊死因子（TNF-α）、インターロイキン１（IL-1）及びインターロイキン１７（IL-17）であって、それらは単球及びマクロファージによって放出される。それらは相乗的に作用して、循環虚脱及び多臓器不全に導く生理学的変化のカスケードを引き起こす。実際、高濃度のTNF-αは敗血症の症状及び結果を擬態することができる。

【０００７】

通常は、エンドトキシンは、小腸の内腔内に保持される。たとえば、心肺バイパスの間には、内臓虚血又は組織酸素代謝失調の存在は、粘膜障壁及び腸内腔から門脈循環へのエンドドキシンの転位（すなわち、小腸から循環系へのエンドドキシンの輸送）の破壊を起こす。

【０００８】

多様な型の抗生物質は、感染の予防及び治療のために広く使用される。しかしながら、多様な細菌種の間で、抗生物質耐性が多くの一般的に使用される抗生物質に対して生じた。これは、生物が耐性を発生させるための一定の選択圧下にある、病院における常在菌叢について特に真実である。さらに、病院においては、潜在的な感染患者の高い密度及びスタッフからスタッフへ、そしてスタッフから患者への接触が抗生物質耐性生物の蔓延を容易にする。使用される抗生物質は、最も経済的、最も安全かつ最も投与が容易であり、一定の感染を抑制するのに充分広いスペクトルを有さないかもしれない。アレルギー、他の薬物との相互作用を引き起こし、そして（肝臓、腎臓などの）主要器官に直接の損傷を与えることによって、抗生物質は程度の異なる毒性を有することができる。多くの抗生物質はまた、正常の腸管内菌叢を変化させ、それは、下痢及び栄養吸収不良をおこすことができる。

【０００９】

ポリミキシンＢのような一定の抗生物質は、エンドトキシンの作用を中和することが知られている。この抗生物質は、エンドトキシンのリピドＡ部分に結合し、その活性を中和する。ポリミキシンは、その毒性によって日常的に使用されることはない。それは、腎臓の定常的な監督及びモニタリング下にある患者にのみ与えられる。

【００１０】

さらに、細菌成分に対する能動免疫に固有のいくつかの制限を克服するために、エンドトキシンに結合する抗体を産生するための多様な技術が使用された。多数の抗体が細菌によるヒトの免疫化によって調製された。より一致する治療的抗体調製物を開発するために

、非常に多数のＬＰＳ反応性のモノクローナル抗体が開発された。不運なことに、臨床的研究は有益な結果とならなかった。しかしながら、これらの試験が敗血症の症状発症後のヒトにおいて実施されたことは、注目すべきである。敗血症後に投与された抗－エンドトキシン抗体治療では、僅かの利益しかもたらさない、と広く考えられている。それはなぜなら、抗体はエンドトキシンによって開始された炎症性カスケードを逆行させることができないからである。

【００１１】

日本国特許第ＪＰ06022633号においては、抗脂質抗体のための吸収剤が示され、それは、水不溶性の多孔質材料上に固定化された陰イオン性官能基を有する化合物を含む。上記多孔質材料は、アガロース、セルロース、デキストラン、ポリアクリルアミド、ガラス、シリカゲル、またはスチレン－ジビニルベンゼンコポリマーで作製された硬質ポリマーであることができ、そして上記多孔質材料は分離装置内のばらばらの粒子の層として充填される。

【００１２】

血液から成分を除去しようとする試みにおいて、異なる吸着剤材料が調製された。固相支持媒体上に固定化されたリガンドを含む、エンドトキシン除去吸着剤が、ＰＣＴ国際出願公開第ＷＯ01/23413号中に示される。好ましい支持媒体は、ビーズの形態である。分離装置中に充填された場合、固相支持媒体はビーズの間の血液細胞通過を可能とするのに充分に多孔質である。

【００１３】

ＰＣＴ国際出願公開第ＷＯ00/62836号において、吸着材料は、血液からβ－２マクログロブリンを除去するのに適した大きさと構造を有する。この文献の吸着剤材料は、タンパク質及び血小板の吸着を防ぐように改変されたビーズ及び孔の表面を有する、マクロ多孔質合成ポリマーであることができる。しかしながら、上記ポリマーの各球形ビーズは、例えば、ビーズを充填したカラムにおいて得られる、約５００ｇの負荷で機械的に破壊された。そのような負荷は、カラム上への顕著な圧力低下を引き起こす。

【００１４】

圧力低下を軽減するために、吸収剤がヨーロッパ特許第ＥＰ464872号において調製され、それは、10^6～10^9ダルトンの排除限界分子量を有する、水不溶性の多孔質硬質ゲル粒子を含む。ゲル層は、体外循環治療における血液又は血漿からのリポタンパク質の選択的除去に使用される。

【００１５】

同様に、PCT国際出願公開第WO01/23413号においては、エンドトキシン除去のための多孔質支持体材料は、容器中へ入れることのできるビーズであり、該ビーズは、カラム又はフィルター層へ充填されるときに、ビーズ間に不可欠な空間を提供するのに充分な大きさを有する。多孔質支持体材料はまた、圧力低下を最小限にするために、精密濾過用の中空糸又は平板膜であることもできる。

【００１６】

ヨーロッパ特許第EP424698号においては、生体高分子を除去するための吸着剤が示され、それは、５０～１５０ミクロンの粒子サイズ、少なくとも10^5ダルトンの排除限界分子量を有する多孔質球形粒子担体から成る。ポリミキシンBは粒子に結合され、そして続いて体外における全血からのエンドトキシン除去に使用されるカートリッジに充填される。体外における血液からの毒性成分の除去のためのこれらの慣用システムにおいては、容器又はカートリッジが最初に液体で満たされ、そして吸着性の多孔質ビーズが後から導入される。米国特許第US6,408,894号において、ビーズのより均一な分配及びより密な充填を提供する方法が示される。該方法は、液体及びビーズの混合物から、そして容器から液体が搾り出されるような方法で、上記混合物を容器に強制的に供給することを含む。

【００１７】

したがって、例えば、上記のPCT国際特許出願公開第WO00/62836号又は同第WO01/23413号中に記載されたように、血液細胞の除去は血漿中に存在する成分の除去を容易にする。

しかしながら、そのような技術は、そのどちらも生物不適合性によって細胞の有害な活性化の危険を高めることに寄与し得るところの２の分離ステップを含む。

【発明の開示】

【００１８】

本発明の目的は、全血又は体液から少なくとも１の成分を選択的に結合し、且つ分離するための新しい方法であって、それによって炎症性過程と関連した上記の問題が排除される、該方法を提供することである。

【００１９】

他の目的は、それによって、血液を血漿と血液細胞に分離する必要のない、全血に対する選択的結合及び分離を達成することのできる方法を提供することである。

【００２０】

本発明のさらなる目的は、サイズに依存しない、すなわち血液成分が排除の手段によらずに分離される、方法を提供することである。

【００２１】

本発明のなおさらなる目的は、それによって分離装置中で、時間にともなう顕著な圧力低下をおこさずに高い流速が得られることのできるような方法を提供することでる。

【００２２】

さらなる目的は、血管への損傷を防ぐために、低いライン圧を維持する一方、非常に高い流速においても分離装置内で血液にせん断力を与えないような方法を提供することである。

【００２３】

これらの目的は、請求項１の特徴を有する本発明によって達成されることができる。本発明の他の利点は、請求項２１及びサブクレームによって明らかとなるであろう。

【００２４】

本発明によれば、全血又は体液からの少なくとも１の成分の選択的結合及び分離のための方法が提供される。血液又は体液は硬質一体型分離マトリックスを、そこから排除されることなく通過させられ、ここで、該マトリックスは、５ミクロン～５００ミクロンの範囲の孔サイズ及び１又はいくつかの成分を結合することのできる０．５cm^2～１０m^2の範囲の活性表面を有する多孔質構造を有する。

【００２５】

本発明の好ましい実施態様において、該マトリックスはさらに、多孔質構造のコーティング及び／又は表面修飾によって導入された少なくとも１の官能基を含む。これによって、得られた活性表面は、単独で又はその非機能付加領域とともに、全血又は体液の少なくとも１の成分を選択的に結合することができる。除去される成分は、天然並びに非天然のものであることができ、すなわち、抗体のような特異的リガンドが成分に結合される。

【００２６】

さらに、多孔質構造表面の直接的又は間接的な選択的変換によって得られた官能基は、さらにリガンドの固定化のために使用された。しかしながら、多孔質構造の官能基は、本発明においてそのままで使用されることができる。

【００２７】

骨格のような多孔質構造の孔サイズ並びに表面は、全血の精製に関して本発明方法の分離マトリックス中で使用されるために適合させられた。しかしながら、本発明方法はまた、他の体液並びに水性溶液からの成分除去に使用されることもできる。いずれの成分又はいずれの溶媒も分離手順の間にマトリックスから排除されないということは、本発明の重要な側面である。

【００２８】

本発明によれば、硬質一体型のマトリックスは、０．５cm^2～１０m^2の使用可能な表面を有するべきであり、マトリックス構造の密度は本発明方法の実施を制限しない。

【００２９】

この関係で、「硬質」という用語は、該マトリックスが、柔軟でなく、曲がったり又は

屈することがなく、しかし少なくとも０．５バールの圧力に耐えることができるということを意味する。「一体型」という用語は、広い表面積を有する該マトリックスが完全な統一体であることを意味する。

【００３０】

本発明方法中のマトリックスの多孔質構造は、金属、無機酸化物、カーボン、ガラス、セラミック、合成ポリマー、及び／又は天然ポリマー或いはそれらの混合物から作られる。充分に定義された孔サイズ及び広い表面積を有する多孔質固体金属構造は、均一な孔サイズを作り出す、厳密に制御された焼結方法を用いて製造されることができる。

【００３１】

マトリックスのための所望の孔サイズ及び広い表面積を有する、型成形又は押し出し成形された多孔質材料並びに多孔質構造として、異なるポリマーが製造された。それらはまた、フォームとしても製造された。例えば、イソシアネート及び多様な他の有機化合物から製造されたポリウレタンは、活性水素原子を有し、これはポリ付加物を製造するために使用された。この活性水素原子は、ポリアルコール、ポリアミンのような二機能又は多機能性化合物に由来することができる。水との反応は、特異的リガンドの共有結合による固定化のために使用された一級アミンを生じさせる。

【００３２】

ステンレススチール、ニッケル、チタニウム、モネル、インコネル、ハステロイ及び他の特別な金属材料のような、広く多様な金属及び合金が使用された。表面積の広い無機酸化物、特別にはアルミナ及びジルコニア、もまた定められた孔構造を有するセラミック材料を製造するための同じ技術とともに利用された。

【００３３】

ゼオライトなどのアモルファスシリカ、及びラバロック（溶岩石）のような天然の硬質材料もまた使用された。

【００３４】

本発明方法においてマトリックス材料として使用されることのできる、天然材料及びそれらの水素化物は、セルロースのようなポリサッカライド及び他の炭化水素ポリマー材料である。他の好適な天然ポリマー材料は、ポリアミノ酸、合成アミノ酸を含むポリアミノ酸、及び乳酸とのコポリマーである。

【００３５】

この関係において、「ハイブリッド」という用語は、例えば好ましいポリサッカライド誘導体であるセルロースジアセテートなどの天然材料のような誘導体を包含する。

【００３６】

本発明において使用されるマトリックスのための好適な合成ポリマーは、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリブチレン、ポリメチルペンテン、及びエチレンビニルアセテートコポリマーのようなポリオレフィン；ポリビニルアルコール、ポリビニルアセタール、及びポリビニルピロリドンのようなビニルポリマー；ポリテトラフルオロエチレン、エチレン－プロピレンコポリマーフッ化物、ポリクロロフルオロエチレン、ポリビニルフルオライド、及びポリビニリデンフルオライドのようなフッ素含有ポリマー；ポリメチルメタクリレート、シアノアクリレート、ポリアクリロニトリル、及びポリメタクリレートのようなポリアクリレート；ポリアクリルアミドのようなポリアミド；ポリエチレンイミンのようなポリイミド；ポリスチレン及びアクリロニトリル－ブタンジエン－スチレン－ポリマーのようなポリスチレン及びそのコポリマー；シリコンゴム；ポリエステル／エーテル；ポリカーボネート；ポリウレタン；ポリスルホネート；ポリグリコール；ポリエチレンオキサイド、ポリプロピレンオキサイドのようなポリアルキドオキサイド；並びにそれらのコポリマー又はハイブリッドである。

【００３７】

好ましい実施態様において、少なくとも１の官能基が硬質一体型分離マトリックスの多孔質構造上へ導入された。官能基は異なる種類、すなわち、陰イオン性、陽イオン性又は非イオン性のタイプのものであることができる。多孔質構造の官能基は、ペプチド／タン

パク質と胆汁酸（例えば、デオキシコール酸）、抗体とそれらの断片、並びに他の生体分子とエンドトキシン及び／又は炎症誘発性メディエーターとの選択的結合能を有する物質、のような物質の共有結合に使用された。

【００３８】

表面修飾、すなわち、間接的な方法による表面への機能付加は、電着、電気蒸着、プラズマ化学沈着（plasma chemical deposition）、イオンプラズマ流からの沈着（deposition from an ion plasma flow）、又は化学蒸着（例えば、プラズマ重合、プラズマにより促進された表面ポリマー沈着）の方法によって達成された。表面修飾法は、それ自体知られており、N. Inagaki, 1996, Technomic Publishing, Lancaster, USAの「プラズマ表面修飾及びプラズマ重合」中に見出される。異なる３次元マトリックス構造がこれらの方法によって処理され、非常に均一な活性表面の修飾が達成された。

【００３９】

OH、NH_2、CN及びCOOHのような極性基による、アクリルの又はアリルの二重結合を有する二機能性モノマーの重合化が、高密度の官能基を有するプラズマポリマーを製造するために使用された。例えば、アリルアミンのようなアリル化合物のプラズマ環境において、無機的及び有機的表面への表面機能付加が行われた

【００４０】

それはNH_3、O_2、又はCO_2プラズマ環境における有機ポリマー表面に対しても可能であり、＝NH、－NH_2、＝CN、－OH、又は－COOHのいずれかの官能基を生じさせる。使用されたガスの他の例は本分野において周知である。

【００４１】

プラズマ化学加工はまた、古典的な化学合成と組み合わされ、表面修飾のポリマー選択性が顕著に亢進された。１のアプローチは、共存するプラズマ官能基の化学的統一化がそれに直ちに続く、特異的なプラズマガスによる表面修飾の適用であった。

【００４２】

官能基の導入の他の方法は、直接的機能付加、すなわちポリマー材料による表面のコーティング、による。この関係においては、合成又は天然ポリマーが表面積の広い金属、無機酸化物、カーボン、ガラス、セラミック、並びに他の好適な合成ポリマー、及び／又は天然ポリマー、或いはそれらの混合物上にコーティングされた。

【００４３】

上記のポリマーの多く、特別にはポリエチレン、ポリプロピレン、ポリテトラフルオロエチレンなどのような官能基を有さないもの、は、それらの表面特性を変化させるために、さらなる処理を必要とする。したがって、ポリマー表面の上記のようなプラズマ又はコロナ処理は、ヒドロキシル、カルボニル、カルボキシル、アミノ及びイミノ基などのような非常に独特の官能基を作り出し、それらは表面に共有結合で結合される。

【００４４】

コーティングもまた、官能基を有するポリマー物質の吸着又は吸収によって達成された。そのような物質の例は、ポリリジン、ポリアルギニン、及びポリエチレンイミンである。

【００４５】

例えば、プラズマ技術を用いることによって、多孔質表面上にポリエチレンイミン様の物質が得られた。全血又は体液からの少なくとも１の成分を選択的に結合し、且つ分離するための本発明方法において、分離マトリックスが使用された場合、タンパク質様の血液成分の親水性並びに疎水性の領域は、所望の成分を除去するために加工された表面と相互作用することができる。機能付加の後、選択的結合及び分離のためのマトリックス表面が、ポリエチレン又はポリプロピレンなどのポリオレフィンを含む場合、アミノ基の正の電荷は同様に静電気的相互作用に使用され、そして疎水性領域は疎水性相互作用のために使用される。このアプローチは、例えばリポポリサッカライドの異なる領域の選択的結合のための本発明方法において使用される。

【００４６】

例えば反応性のヒドロキシルを有するポリマー及び金属も、シラン処理によって機能付加されることができる。

【００４７】

したがって、多様な異なる官能基が共有結合で表面積の広い多孔質マトリックス構造に結合された。直接的及び／又は間接的機能付加の後、多孔質構造は、異なる血液成分と相互作用することのできる、親水性並びに疎水性の領域を有することができる。したがって、着目の物質の特徴的性質は、本発明方法によって使用される表面の製造時に利用される。

【００４８】

好ましくは、活性表面の官能基は、スルフヒドリル、カルボキシレート、アミン、アルデヒド、ケトン、ヒドロキシル、ハロゲン、ヒドラジド、及び活性水素である。

【００４９】

他の好ましい実施態様においては、リガンドが、表面積の広い多孔質構造の少なくとも１の官能基に共有結合で結合される。この関係において、リガンドは、全血又は体液から除去される成分に高い親和性を有する物質である。したがって、リガンドは、吸着特性及び結合効率を高めるために使用される。

【００５０】

リガンドは、好ましくは組換えタンパク質であるタンパク質、ペプチド、抗体又はその断片、ポリサッカライドなどの炭化水素、ホルモン、抗酸化物質、糖タンパク質、リポタンパク質、脂質、ビタミンEなどの脂溶性ビタミン、胆汁酸、反応性色素、アラントイン、尿酸、又はポリミキシン、或いはそれらの組み合わせであることができる。

【００５１】

好適な胆汁酸は、内因性の疎水性物質である、デオキシコール酸である。そのような胆汁酸は、直接的に、スペーサーを介して、又は大きな分子を介して官能基に結合されることができ、そして本発明方法中におけるように、血液、体液及び水性溶液からエンドトキシンを除去するために使用される。

【００５２】

この関係において、スペーサーは、リガンドを多孔質構造の表面に連結する、大きな又は小さな分子である。

【００５３】

例えば、本発明方法において、分離マトリックスの多孔質構造が付加されたアミン基を有するポリオレフィンを含む場合、この基はそこへ結合したアルブミンを有することができ、そして今度は、この大きな分子に結合した少なくとも１の胆汁酸部分を有することができる。

【００５４】

したがって、本発明は、成分をそれを含む水溶液から除去するための、支持体上に固定された胆汁酸部分の新しい使用にも関する。好ましくは、胆汁酸部分は、デオキシコール酸部分である。

【００５５】

したがって、胆汁酸部分を固定化するための好適な固体支持体は、硬質一体型分離マトリックスであって、５ミクロン～５００ミクロンの範囲、好ましくは７０ミクロン～１７０ミクロンの孔サイズ、及び０．５cm^2～１０m^2の範囲の活性表面を有するものである。

【００５６】

また、好ましくは、本発明方法中のマトリックスのリガンドは、アルブミン又は組み替え技術により製造されたアルブミンであって、血清アルブミン、ポリミキシンB（すなわち、疎水性構造上の荷電した基）、又はデオキシコール酸の代わりに使用されることのできるものである。

【００５７】

したがって、リガンドは本発明方法中のスペーサーとして作用することもできる。例えば、ヒト組み替えタンパク質又は他の大きな分子（例えば、ヒアルロン酸）を、除去され

る成分に特異的なリガンドを続いて結合させることを可能とする、多孔質構造に最初に共有結合で結合させることも可能であった。

【００５８】

必要な場合には、クロスリンカーが、少なくとも１の官能基及びリガンドの間に共有結合で結合される。この関係において、クロスリンカーは、リガンドを支持体である多孔質構造に共有結合させる要素であり、該要素は、多孔質構造自身から離れたところにあるリガンドを連結する場合にはスペーサーである。そのような分子スペーサーは、本分野において周知である。それらは、リガンドへより良い有効性を提供することによって、結合され、且つ、全血又は体液から分離される成分への親和性を増加させるために、導入された。多孔質マトリックス構造表面の生物適合性もまた、これらの分子スペーサーの導入によって増加される。

【００５９】

クロスリンカー／スペーサーは、ゼロ長のクロスリンカー単独で、又は介在性のクロスリンカーとともに含むことができ、得られた最終的な複合体は、クロスリンクされた物質へ構造を付加する化学物質によって一緒に結合されている。これらの介在性のクロスリンカーは、ホモ二機能性（例えば、ジアルデヒド）、ヘテロ二機能性（例えば、アミノ酸）の型又は三機能性クロスリンク型であることができる。

【００６０】

スペーサーの主な目的は、使用される特異的リガンドのバイオアベイラビリティを増加させることである。

【００６１】

スペーサーは、例えば、シラン、ジイソシアネート、グリコレート、ポリエチレングリコール、サクシニミジル試薬、ジヒドラジン、アジピン酸、ジアミン、アミノ酸、ポリ又はオリゴアミノ酸、ポリアミノ酸、ペプチド、或いはタンパク質であることができる。好ましくは、タンパク質はヒト組み替えタンパク質である。

【００６２】

クロスリンカーの官能基は、いくつかの例によれば、アミノ基（Lys、Arg）と、スルフヒドリル基（Cys）と、又はカルボキシル（Asp、Glu）と反応するように設計される。

【００６３】

反応基の化学との関係では、Bioconjugate Techniques, Greg T Hermanson, Academic Press, USA 1996を参考にした。

【００６４】

したがって、活性多孔質マトリックス表面は、本発明方法において例えば、エンドトキシンを単独で、又は多孔質構造の使用可能な非機能付加領域とともに除去することができる。活性表面はまた、アミノ酸、ポリペプチド及び抗体などの生体分子のような化学物質を、そのような特別な成分の除去を選択的に促進するために、共有結合によって固定化するための手段として使用されることもできる。

【００６５】

全血又は体液からの少なくとも１の成分の選択的除去を意図する分離マトリックスは、一定の孔サイズ及び／又は意図される適用に依存する孔サイズ範囲を有する多孔質構造で作られることができる。好ましくは、多孔質構造は、血液細胞の通過を許容しなくてはならない。したがって、一定の型の血液細胞もまた、本発明方法によって全血から除去されることができる。そのような細胞は、病気の細胞又は活性化された貪食細胞などの特異的な表面受容体を有する細胞であることができる。

【００６６】

特別な適用のためには、金属構造は磁性を有することができる。磁性を有するマトリックスは、例えば、ポリエチレンなどのポリマーで焼結磁鉄鉱をコーティングすることによって得られることができる。そして、細胞の有効な除去は、磁性デキストラン鉄標識を有する抗体が血中の特異的な細胞に結合することを可能としつつ、実施されることができる。

【００６７】
孔サイズは、細胞が損傷又は細胞が排除されることなく、高い流速が維持されるように、５ミクロン～５００ミクロン、好ましくは７０ミクロン～１７０ミクロン、最も好ましくは８０ミクロン～１００ミクロンの範囲内であるべきである。したがって、本発明方法によって達成される分離は、成分のいかなるサイズ分布にも基づくことはない。実際に、全血又は体液のすべての成分が、本発明方法によって除去されることができる。
【００６８】
１以上の一次的毒性エフェクター、すなわちエンドトキシン、の除去後、さらに二次的な毒性エフェクターが除去されることができる。二次的エフェクターはサイトカイン（例えば、TNF-α）、インターロイキン（例えば、IL-1）、活性酸素、及び窒素ラジカルなどであることができる。
【００６９】
本発明方法を実施する場合、１又は数個の分離マトリックスがハウジング内に保護され、該ハウジングはその適用に依存した多様な形状並びに多様な及び／又は異なる入り口及び出口を有することができる。そして、そのような装置はエンドトキシン除去及び／又はサイトカイン除去及び／又はサイトカインの中和に使用されることができる。これは、血液又は体液を、冠内、体側又は体外に提供された装置を、その中の該硬質一体型分離マトリックスから液体が排除されることなく通過するようにさせることによって達成される。その後、多孔質構造の活性表面、官能基及び／又はその上の特異的リガンドは、液体からの少なくとも１の成分を選択的に結合し、且つ分離する。該装置はまた、水性溶液からのエンドトキシンの除去のために有利に使用されることもできる。
【００７０】
本発明方法の重要な特徴は、敗血症ショックのすべての側面が予防手段を講じられることができる、すなわち、一次的並びに二次的毒性エフェクターが本発明方法によって除去されることができる、ということである。
【００７１】
本発明方法の実施に関して図１を参照する。装置１はハウジング２を含み、ここで、該装置の該ハウジング（又はカートリッジ）は、全血、又は体液がポンプによって循環させられるところの閉じた循環中へ一体化されている。ハウジング２においては、少なくとも１の分離マトリックス５a、５b、…が配置され、それぞれが全血又は体液から１の成分を選択的に除去することを意図されている。ハウジング２は、入り口３及び出口４を備え、その位置は分離マトリックス及びハウジング内に適切な流れが得られる限り、重要ではない。好ましくは、ポンプは入り口３の上流に配置される。
【００７２】
この方法で、顕著な圧力低下なしに５ml／時間～６０００ml／分の流速を維持する装置が得られる。体外適用された場合、非常に速い流速においても、ポンプからカニューレへの３００mmHg以下のライン圧が得られる。
【００７３】
硬質一体型分離マトリックスは、本発明方法において使用されるための異なる形状に製造されることができる。例えば、それはディスク、ロッド、シリンダー、リング、球、管、中空管、平板、又は他の成型された形状に設計されることができる。
【００７４】
各分離マトリックス内の流れがその空隙率に依存するために、血液成分又は体液成分と活性表面との接触時間は制御されることができる。さらに、所望の流れのグラジエントは、分離装置内の各分離マトリックスの空隙率及び構成を変えることによって該装置内で作り出されることができる。
【００７５】
図２及び図３において、本発明方法の実施時に使用されることのできる装置の異なる模式的実施態様が示される。矢印は、個別の分離マトリックス及びそのためのハウジング内の血液又は体液の流れを示し、大きな矢印は小さな矢印よりも高い流速を表す。異なる構

成のこれらの例において、１又は数種の成分を血液又は体液から除去するために、分離マトリックスは同じ又は多様な型の官能基又はリガンドを有するか、或いは有さず、同じ又は異なる空隙率を有することができる。

【００７６】

分離マトリックスは、ハウジング内のいかなる液体又は成分のマトリックスへの流入も妨害されないこと、すなわちそこから排除されることのないことを確実にするために、好ましくは（それぞれが入り口３及び出口４を有する）ハウジングと一体化されている。図２において、ハウジング２内の分離マトリックス５の（ａ）及び（ｂ）の例がしめされ、ここで、該マトリックスは異なる構成である。ハウジング２内の２の分離マトリックス5ａ、5bの例が図２（ｃ）及び（ｄ）に示される。図２（ｃ）の装置において、適用された薄膜（applied skin）のような、分離マトリックス５ａの外面上の不透過性のコーティング６が、装置に供給されたすべての物質がこのマトリックス全体を通過することを確実にする。一方、図２（ｄ）の装置においては、供給された物質のいくらかは、分離マトリックス５ｂよりも分離マトリックス５ａ中での滞留時間が短く、そしてその逆も成り立つ。

【００７７】

図３においては、各装置は数個の分離マトリックス５ａ～５ｇを含む。図３（ａ）においては、仕切り壁７がマトリックス全体を通る流れを確実にする。分離マトリックスは、図３（ｂ）及び（ｃ）にそれぞれ示すように、それらの長軸方向に対して側方に又は交差して配置されることができる。図３（ｄ）においては、装置は異なる大きさの分離マトリックスを含む。

【００７８】

結論として、本発明方法は冠内に、体側に、又は体外に適用された、或いは孤立した装置であって、それによって循環中の、好ましくは血中のエンドトキシン及び潜在的な有害前炎症性メディエーター、特別にはＴＮＦ－α、ＩＬ－１及びＩＬ－１７、を減少させることができるものとともに使用されることができる。エンドトキシンを他の水性溶液から選択的に除去することもまた可能である。該成分は、硬質一体型分離マトリックスの活性表面に吸着によって結合すると考えられる。

【実施例】

【００７９】

本発明はここに、本発明を包含するように注意深く選ばれた以下の実施例を参照することによってさらに記載され、そして例解されるであろう。したがって、それらはどんな方法であっても、本発明を制限するものと解してはならない。

【００８０】

表面修飾

実施例１

３５０ミクロンの空隙率及び１０cm^2の活性表面を有する多孔質ポリエチレン（Porex Technologies, Germany）のマトリックス表面を、O_2を使用したプラズマ化学蒸着（Plasma Science, USA, Type PS 0350 Plasma Surface Treatment System）によって修飾した。

【００８１】

得られたマトリックスの多孔質構造表面上のヒドロキシル基の形成をDyeテストによってアッセイし、その親水性を確認した。

【００８２】

実施例２

１００ミクロンの空隙率及び２０cm^2の活性表面を有する多孔質ポリエチレン（Porex Technologies, Germany）のマトリックス表面を、O_2を使用したプラズマ化学蒸着（Plasma Science, USA, Type PS 0350 Plasma Surface Treatment System）によって修飾した。

【００８３】

得られたマトリックスの多孔質構造表面上のカルボキシル基の形成及びその量を、ヒドロキサム酸へ変換することによって決定した。この関係において、Feigel et al.,; Micr

ochemie 15:18, 1934に記載されたように、すべてのヒドロキサム酸が酸性溶液中、塩化鉄で赤又はバイオレット色を呈した。

【００８４】

実施例３

１７０ミクロンの空隙率及び０．０４m^2の活性表面を有する多孔質ポリエチレン（Porex Technologies, Germany）のマトリックス表面を、アリルアミンを使用したプラズマ重合（Plasma Science, USA, Type PS 0350 Plasma Surface Treatment System）によって修飾した。

【００８５】

得られたマトリックスの多孔質構造表面上の一級アミンの量を、トリニトロベンゼンスルホン酸（TNBS）アッセイによって決定した。

【００８６】

実施例４

７０ミクロンの空隙率及び０．２６m^2の活性表面を有する多孔質ポリエチレン（Porex Technologies, Germany）のマトリックス表面を、アクリル酸を使用したプラズマ重合（Plasma Science, USA, Type PS 0350 Plasma Surface Treatment System）によって修飾した。

【００８７】

得られたマトリックスの多孔質構造表面上のカルボキシル基の量を実施例２に記載の通りにアッセイした。

【００８８】

実施例５

５ミクロンの空隙率及び０．９m^2の活性表面を有する多孔質ポリエチレン（Porex Technologies, Germany）のマトリックス表面を、NH_3を使用したプラズマ重合（Plasma Science, USA, Type PS 0350 Plasma Surface Treatment System）によって修飾した。

【００８９】

得られたマトリックスの多孔質構造表面上の一級アミンの量を実施例３に記載の通りにアッセイした。

【００９０】

実施例６

１０ミクロンの空隙率及び１００cm^2の活性表面を有する多孔質ポリテトラフルオロエチレン、PTFE（W.L. Gore & Associates Inc., USA）のマトリックス表面を、NH_3を使用したプラズマ化学蒸着（Plasma Science, USA, Type PS 0350 Plasma Surface Treatment System）によって修飾した。

【００９１】

得られたマトリックスの多孔質構造表面上の一級アミンの量を実施例３に記載の通りにアッセイした。

【００９２】

実施例７

１０ミクロンの空隙率及び３００cm^2の活性表面を有する多孔質ポリスチレン（Dow Chemical, USA）のマトリックス表面を、CO_2を使用したプラズマ化学蒸着（Plasma Science, USA, Type PS 0350 Plasma Surface Treatment System）によって修飾した。

【００９３】

得られたマトリックスの多孔質構造表面上のカルボキシル基の量を実施例２に記載の通りにアッセイした。

【００９４】

実施例８

８０ミクロンの空隙率及び１００cm^2の活性表面を有する多孔質ポリウレタン（Polymers Unlined, Sweden）のマトリックス表面を、アルデヒディックアルコキシシラン(Ardehydic Alkoxy Silane)製品番号（PSX 1050, United Chemical Technologies Inc., USA）の

９５％エタノール中２％溶液を使用して修飾した。溶液のｐＨを酢酸でｐＨ５．５に調節し、溶液をマトリックスを通して還流し、これを室温で一夜インキュベートし、その後０．９％生理食塩水で洗浄した。

【００９５】

得られたマトリックスのアルデヒド機能性を、過酸化水素によるｐ－フェニレンジアミンの酸化の触媒による促進によって評価した。ここで、ｐ－フェニレンジアミンは、酢酸溶液中過酸化水素で酸化され、Bandrowskiの塩基として知られている。

【００９６】

実施例９

２００ミクロンの空隙率及び０．５m^2の活性表面を有する多孔質シリコン（Nusil, France）のマトリックス表面を、アミン－シラン（製品番号 0750, United Chemical Technologies Inc., USA）の９５％エタノール中２％溶液を使用して修飾した。溶液をマトリックスを通して還流し、これを室温で一夜インキュベートし、最終的に０．９％生理食塩水で洗浄した。

【００９７】

得られたマトリックスの多孔質構造表面上の一級アミンの量を実施例３に記載の通りにアッセイした。

【００９８】

共有結合によるコーティング

実施例１０

ポリ－リジン（２００mg）を１０mlの５０mM炭酸ナトリウム溶液に溶解し、そして１００ミクロンの空隙率を有する多孔質ポリカーボネート（Milipore Plastics, USA）を該溶液に浸漬し、ポリ－リジンとポリカーボネートマトリックスの間に共有結合を得るために、４℃で２４時間保持した。多孔質マトリックスを最終的に過剰の蒸留水で洗浄した。

【００９９】

得られたマトリックスの多孔質構造表面上の一級アミンの量を実施例３に記載の通りにアッセイした。

【０１００】

実施例１１

実施例４によって得られた多孔質ポリエチレンマトリックスを、１－シクロヘキシル－３－（２－モルホリノエチル）カルボジイミドメト－ｐ－トルエンスルホン酸塩（WCCM）（Aldrich）の水溶液で、閉じた回路中で、５ml/分の流速で６時間還流した。そして、それを水ですすぎ、最終的にポリエチレンイミン（Sigma）（１０mg/ml、pH７．０）を加え、マトリックスを一夜インキュベートした。

【０１０１】

得られたマトリックスの多孔質構造表面上の一級アミンの量を実施例３に記載の通りにアッセイした。

【０１０２】

実施例１２

実施例３によって得られた多孔質ポリエチレンマトリックスを、１．０％グルタルジアルデヒドを使用して０．２Mリン酸緩衝液pH７．５中で結合させ、そして１ml/分の流速で室温で６時間還流した。その後、マトリックスをヒアルロン酸溶液（２mg/ml）とともに室温で１６時間インキュベートする前に、緩衝液で洗浄した。過剰のヒアルロン酸を最終的にすすいだ。

【０１０３】

得られたマトリックスの多孔質構造表面上のヒアルロン酸含量を立証し、Alcian Blue（Sigma）で決定した。

【０１０４】

吸着によるコーティング

実施例１３

７０ミクロンの空隙率及び０．１８m^2の活性表面を有する多孔質ポリエチレン（Porex Technologies, Germany）のマトリックスを、閉じた回路中、０．１MのHClで調節したpH３．３において、２mg/mlのヒアルロン酸溶液（BioHyos, Sweden, 12×10^6ダルトン）で１ml/分の流速、室温で１６時間還流した。

【０１０５】

得られたマトリックスの多孔質構造表面上のヒアルロン酸含量を、実施例１２に記載の通りに立証した。

【０１０６】

実施例１４

７０ミクロンの空隙率及び７．０m^2の活性表面を有する多孔質ポリエチレン（Porex Technologies, Germany）のマトリックスを、ガラスチューブ中に置いた。多孔質マトリックスをその中に有する該チューブを３５０mlの水中、０．１３％ポリ－リジン（Sigma）溶液で満たし、０．１MのHClでpH３．３に調節した。そして、該ポリ－リジン溶液を、フィルターマトリックスを有するチューブを通して室温で５ml/分未満の流速で再循環させた。多孔質マトリックスを最終的に逆浸透水ですすいだ。

【０１０７】

得られたマトリックスの多孔質構造表面上の一級アミンの量を実施例３に記載の通りにアッセイした。

【０１０８】

実施例１５

７０ミクロンの空隙率及び３．４m^2の活性表面を有する多孔質ポリエチレン（Porex Technologies, Germany）のマトリックスを、ガラスチューブ中に置いた。多孔質マトリックスをその中に有する該チューブを３５０mlの逆浸透水中、０．２％リコンブミン（登録商標）（組み換えHuman Serum Albumin, Hoechst-Pharma, USA）で満たし、０．１MのHClでpH３．３に調節した。

【０１０９】

そして、該リコンブミン（登録商標）溶液を、フィルターマトリックスを有するチューブを通して室温において、ポンプを用いた５ml/分未満の流速で再循環させた。多孔質マトリックスを最終的に逆浸透水ですすいだ。

【０１１０】

得られたマトリックスの多孔質表面上の表面タンパク質含量を、クマシーブリリアントブルー（BioRad, USA）を用いて決定した。

【０１１１】

実施例１６

実施例４によって得られた多孔質ポリエチレンマトリックスを、１０mg/mlのポリエチレンイミン（Sigma）溶液で、閉じた回路中、流速５ml/分で還流した。その後、該多孔質マトリックスを水ですすいだ。

【０１１２】

得られたマトリックスの多孔質構造表面上の一級アミンの量を実施例３に記載の通りにアッセイした。

【０１１３】

リガンドの直接結合

実施例１７

実施例５によって得られた多孔質ポリエチレンマトリックスを、WCCMの水性溶液を用いてデオキシコレート（DOC）と結合させた。１ミリモルのソディウムデオキシコレートを含む、水中、４０％ジメチルホルムアミド（DMF）（Sigma）の溶液３００mlを、０．３MのHClでpHをpH４．８に調節しつつ、攪拌しながら多孔質ポリカーボネートに加えた。DMF：水（１：.1.8）中、６mMのWCCM溶液をその後、１０分間にわたって添加した。懸濁液を、０．３MのHClの添加によってpH４．８に維持した。

【０１１４】

得られたマトリックスの多孔質構造表面上のDOC含量をBile Acid kit（Sigma）を使用して決定した。

【０１１５】

実施例１８

実施例３によって得られた多孔質ポリエチレンマトリックスを、０．１５Mリン酸緩衝液、pH７．０中、１２％のグルタルジアルデヒドを室温で２４時間使用して、結合させた。マトリックスを０．１５Mリン酸緩衝液で洗浄し、そして抗CD14抗体（DAKO、Denmark）を１mg/mlの濃度で添加し、８℃で２４時間インキュベートした。続いて、安定な二級アミン結合を生成するために、シアノボロ水素化ナトリウムによる還元を実施した。

【０１１６】

得られたマトリックスの多孔質構造表面上の抗体含量を、多孔質マトリックスとのインキュベーションの前後における抗体緩衝溶液についてのUV分光法によって間接的に決定した。

【０１１７】

実施例１９

実施例８によって得られた多孔質ポリエチレンマトリックスを、０．１５Mのリン酸緩衝液で洗浄し、そして組み替えIL-1受容体（Kineret, Amgen, USA）を１mg/mlの濃度で添加し、８℃で２４時間インキュベートした。続いて、安定な二級アミン結合を生成するために、シアノボロ水素化ナトリウムによる還元を実施した。

【０１１８】

得られたマトリックスの多孔質構造表面上のIL-1受容体含量を、多孔質マトリックスとのインキュベーションの前後におけるIL-1受容体緩衝溶液についてのUV分光法によって間接的に決定した。

【０１１９】

実施例２０

実施例５によって得られた多孔質ポリエチレンマトリックスを、０．２Mリン酸緩衝液、pH７．５及び１．０％のグルタルジアルデヒドを使用して、結合させた。マトリックスをこの溶液とともに３時間インキュベートした。リン酸緩衝液で洗浄後、マトリックスを再循環させながら、１mg/mlの硫酸ポリミキシンB（Sigma）溶液中で一夜インキュベートした。マトリックスを最終的に０．１Mのリン酸緩衝液、pH７．４で洗浄した。

【０１２０】

実施例２１

実施例２によって得られた多孔質ポリエチレンマトリックスを、０．１Mの２－（N-モルホリノ）エタンスルホン酸（MES）緩衝液（Sigma）、pH４．８中、５mg/mlの濃度の組み替えTNF-α受容体（Enbrel, Wyeth, UK）と結合させた。３０mg/mlのWCCMの水性溶液を添加し、マトリックスを８℃で一夜インキュベートした。マトリックスを最終的に０．１Mリン酸緩衝液、pH７．４で洗浄した。

【０１２１】

実施例２２

実施例３によって得られた多孔質ポリエチレンマトリックスを、０．２Mリン酸緩衝液、pH７．５中、１．０％のグルタルジアルデヒドを使用して、抗－ヒトTNF-α抗体（Sigma）と結合させた。マトリックスをTNF-α抗体緩衝溶液とともに３時間インキュベートした。リン酸緩衝液でマトリックスを洗浄後、１ml/分の流速で再循環させながら、リン酸緩衝液中、抗-ヒトTNF-α抗体（１mg/ml）を添加し、室温で６時間インキュベートした。マトリックスを最終的に０．１Mのリン酸緩衝液、pH７．４で洗浄した。

【０１２２】

得られたマトリックスの多孔質構造表面上のTHF-α受容体含量を、多孔質マトリックスとのインキュベーションの前後におけるTNF-α受容体緩衝溶液についてのUV分光法によって間接的に決定した。

【０１２３】

実施例２３

実施例５で得られた多孔質ポリエチレンマトリックスを、０．１MのMES緩衝液、pH４．８中で、２mg/mlの濃度のヒト殺菌１５mg/mlの濃度でこのマトリックスに添加し、８℃で一夜インキュベートした。マトリックスを最終的に０．１Mのリン酸緩衝液、pH７．４で洗浄した。

【０１２４】

得られたマトリックスの多孔質構造表面上のBPI含量を、多孔質マトリックスとのインキュベーションの前後におけるBPI緩衝溶液についてのUV分光法によって間接的に決定した。

【０１２５】

実施例２４

実施例１５によって得られた多孔質ポリエチレンマトリックスを、０．１MのMES緩衝液pH４．８中、１mg/mlの濃度のDOC溶液中でインキュベートした。その後、WCCMの水性溶液を添加し、マトリックスを８℃で一夜インキュベートした。マトリックスを最終的に０．１Mのリン酸緩衝液、pH７．４で洗浄した。

【０１２６】

得られたマトリックスの多孔質構造表面上のDOC含量を、実施例１７の通りに決定した。

【０１２７】

リガンドとスペーサーの結合

実施例２５

実施例３によって得られた多孔質ポリエチレンマトリックスを、室温で２４時間、０．２Mリン酸緩衝液、pH７．０中、１．２％のグルタルジアルデヒドで活性化した。マトリックスを緩衝液で洗浄し、続いて０．２Mリン酸緩衝液、pH７．０中、５０mg/mlの１，６－ジアミノヘキサン（DAH）（Sigma）中で２４時間インキュベートした。その後、１０mg/mlのシアノボロ水素化ナトリウム（Sigma）を溶液に添加した。多孔質マトリックスを０．１Mリン酸緩衝液で洗浄し、その後、０．１MのMES緩衝液、pH４．８中、DOC溶液（１mg/ml）中でインキュベートした。その後、WCCMの水性溶液を添加し、マトリックスを８℃で一夜インキュベートした。マトリックスを最終的に０．１Mリン酸緩衝液、pH７．４で洗浄した。

【０１２８】

得られたマトリックスの多孔質構造表面上のDOC含量を、実施例１７の通りに決定した。

【０１２９】

実施例２６

実施例５によって得られた多孔質ポリエチレンマトリックスを、０．２Mリン酸緩衝液、pH７．０中、１．２％のグルタルジアルデヒドで、室温において２４時間インキュベートした。マトリックスを緩衝液で洗浄し、その後、０．２Mリン酸緩衝液、pH７．４中、１０mg/mlの濃度のアジピン酸ジヒドラジド（Aldrich）とともに２４時間インキュベートした。その後、１０mg/mlのシアノボロ水素化ナトリウム（Sigma）を溶液に添加した。

【０１３０】

多孔質マトリックスを０．１Mリン酸緩衝液で洗浄し、その後、０．１MのMES緩衝液、pH４．８中、１mg/mlの濃度のDOC溶液中でインキュベートした。その後、WCCMの水性溶液を添加し、マトリックスを８℃で一夜インキュベートした。マトリックスを最終的に０．１Mリン酸緩衝液、pH７．４で洗浄した。

【０１３１】

得られたマトリックスの多孔質構造表面上のDOC含量を、実施例１７の通りに決定した。

【０１３２】

実施例２７

実施例１０によって得られたマトリックスを、WCCMの水性溶液を使用してDOCと結合させた。１ミリモルのソディウムデオキシコレートを含む、３００mlの４０％DMF（Sigma）水溶液を、攪拌しながら、多孔質ポリカーボネートマトリックスに添加した。０．３MのHClで、懸濁液のpHを４．８に調節した。DMF：水（１：１．８）中、WCCMの６mM溶液を１０分間にわたって添加し、３時間の間、周期的に０．３MのHClを添加することによって、pH４．８に維持した。そして、それを２４時間、室温に保持した。

【０１３３】

得られたマトリックスの多孔質構造表面上のDOC含量を、実施例１７の通りに決定した。

【０１３４】

実施例２８

実施例１４によって得られたマトリックスを、室温で２４時間、０．２Mリン酸緩衝液、pH７．０中、１．２％のグルタルジアルデヒドで活性化し、その後過剰量の緩衝液ですすいだ。０．１Mの炭酸水素緩衝液、pH８．０中、１０mg/mlの濃度のポリエチレンイミン（Sigma）を、多孔質マトリックス中へ導入し、マトリックスを溶液とともに１６時間インキュベートした。

【０１３５】

その後、マトリックスを緩衝液で洗浄し、WCCMの水性溶液を使用して、DOCと結合させた。攪拌しながら、１ミリモルのソディウムデオキシコレートを含む、３００ｍｌの水中４０％DMFを多孔質マトリックスに添加した。０．３MのHＣｌで、懸濁液のpHを４．８に調節した。DMF：水（１：１．８）中、WCCMの６mM溶液を１０分間にわたって添加し、３時間の間、周期的に０．３MのHClを添加することによって、pH４．８に維持した。そして、それを２４時間、室温に保持した。

【０１３６】

得られたマトリックスの多孔質構造表面上のDOC含量を、実施例１７の通りに決定した。

【０１３７】

実施例２９

実施例３によって得られた多孔質ポリエチレンマトリックスを、室温で２４時間、０．２Mリン酸緩衝液、pH７．０中、１．２％のグルタルジアルデヒドで活性化した。その後、マトリックスを緩衝液ですすぎ、０．２Mのリン酸緩衝液、pH７．０中、５０mg/mlの濃度の１，６－ジアミノヘキサン（DAH）（Sigma）とともに室温で２４時間インキュベートした。その後、多孔質マトリックスを０．１Mリン酸緩衝液で洗浄し、０．１Mリン酸緩衝液、pH７．４中、１０mg/mlの濃度のTNF-α受容体（Enbrel, Wyeth, UK）溶液中の懸濁液として、８℃で１２時間インキュベートした。その後、１０mg/mlの濃度で、シアノボロ水素化ナトリウム（Sigma）の溶液を懸濁液に添加した。マトリックスを最終的に０．１Mリン酸緩衝液、pH７．４で洗浄した。

【０１３８】

得られたマトリックスの多孔質構造表面上のTNF-α受容体含量を、多孔質マトリックスとのインキュベーションの前後におけるTNF-α受容体緩衝溶液についてのUV分光法によって間接的に決定した。

【０１３９】

血液成分の選択的結合及び分離

全血を、０．０２m^2の活性表面を有するディスク形状のマトリックスのフィルターを通過させることによって、細胞の分離を行った。

【０１４０】

エンドトキシン及びサイトカインの除去を、図４に示す試験系によって行った。２l以下の全血又は血漿を満たした容器８をポンプ９、圧力モニター１０及び４０以下のマトリックスプレートを有するフィルター装置１、すなわち７０及び１３０ミクロンの間の空隙率を有する７m^2以下の活性表面が提供された、に接続した。

【０１４１】
細胞の分離
実施例３０
特異的標識された抗CD45+抗体（MACS Antibody Microbeads; Miltenyi Biotec, Germany）を使用して、全血から白血球を分離するために、１００ミクロンの空隙率を有する、ポリエチレン及び磁性フェライト（８０％FeO、２０％BaO_2、Porex Technologies, Germany）の混合物を含む磁性多孔質マトリックスを使用した。そのような抗体で白血球を磁性標識した後、血液を多孔質マトリックスを通過させた。
【０１４２】
自動セルカウンターを使用することによって、白血球の細胞計数をおこなった。そして、分離後、血液中の９０％の白血球含量の減少を示した。
【０１４３】
実施例３１
好中球及び単球としてヒト貪食血液細胞を分離するために、200ミクロンの空隙率及び０．２m^2の活性表面を有する、多孔質セルロースジアセテート（Tenite, Eastman Chemicals, USA)のマトリックス表面を使用した。ヒト全血を、EDTA入り採血管（B&D、UK）中に集め、血液を多孔質マトリックスを通過させた。
【０１４４】
Turks試薬を使用してBurknerチャンバー中、顕微鏡下で示差的な細胞計数によって決定された、集めた血液における好中球及び単球の数の減少は、それぞれ５０％及び３５％であった。
【０１４５】
サイトカインの除去
実施例３２
エンドトキシン除去基でコーティングした、実施例２２によって得られたマトリックスを、図４に示す試験系において、多孔質ディスクとして使用した。
【０１４６】
グルタルジアルデヒドでTNF-αに対するポリクローナル抗体を多孔質ポリマー構造上のアミノ基に固定化した後、全血からのTNF-αの除去を調べた。LPSを血液に添加することによってTNF-αの生成を誘導し、活性化された全血を装置中の固定化フィルター上を還流させた。
【０１４７】
フィルターディスクによるTNF-αの取り込みを試験するために、酵素免疫アッセイ（Enzymimmuno-assay, Milenia Biotec GmbH, Germany）によって装置の前（黒菱形）と後（黒四角）において、全血中のTNF-α量を測定した（図５）。見てのとおり、全血における病理学的なTNF-α濃度の減少が得られた。
【０１４８】
エンドトキシンの除去
実施例３３
実施例２５によって得られたマトリックス、すなわちDOCをその上に有する、プラズマ修飾されたポリエチレンマトリックスは、ジアミノヘキサンのスペーサーを介してDOCをその上に固定化した。該スペーサーは、先ずグルタルジアルデヒドによってマトリックスに結合させ、そしてカルボジイミドを使用してデオキシコレートに結合させた。得られたマトリックスを、図４に示す系のフィルター装置中の多孔質ディスクとして使用した。
【０１４９】
血漿からのＬＰＳの除去は、実施例３２と同様に実施した。
【０１５０】
血漿中のＬＰＳ量を、Limulus Amebocyte Lysate assay(Endochrome-K, Charles River Laboratories Inc. USA)によって、フィルター装置を通る再循環中の異なる時間間隔において、バルクで測定した。

【０１５１】
エンドトキシン量（pg/ml）の減少の時間経過を図６に示す。２時間の再循環後、エンドトキシン負荷は、開始時の７５pg/mlから、検出限界の１５pg/mlまで減少した。
【０１５２】
実施例３４
実施例３（非固定化アミノ基）及び実施例１７（固定化DOC）によってそれぞれ得られたマトリックスを、多孔質ディスクとして使用し、それらのLPS除去能を比較した。LPSを蒸留水に溶解したという違い以外は、実施例３３と同様の再循環試験を実施した。
【０１５３】
１０mlの装置中の各フィルターを通過して、０．２２ml/分の流速で再循環させつつ、水溶液からのLPS除去を図４に示すように決定した。
【０１５４】
以下の表１において、実施例３及び実施例１７のそれぞれからの２のマトリックスによるLPS除去についての値を、最初のLPS濃度に対する１２０分の再循環後のLPS濃度のパーセンテージとして示す。
【０１５５】
【表１】

表１

	実施例３	実施例17
LPS除去（%）	81	96

【０１５６】
タンパク質、LPS及びリガンドの間の競合的相互作用によって、プラズマ（実施例３４）及び水（実施例３５）の間の除去程度の相違を説明することができる。
【０１５７】
組み合わせの除去
実施例３５
実施例１９及び実施例２９によって得られたマトリックスを、それぞれTNF-α及びIL-１の組み合わせの除去のために使用した。
【０１５８】
特異性の異なる２のマトリックスを、図４に示す２のフィルター装置の閉じたループの試験系内において、順に接続した。容器内の全血を３７℃に保持し、LPS添加によって活性化し、そして系に導入した。サイトカインの分析のために、異なる時間間隔で、容器とフィルター出口において同時に、サンプリングを行った。
【０１５９】
結果は、どちらのマトリックスにおいても、TNF-αとIL-1βのそれぞれについて７０％及び５５％のサイトカイン濃度の減少を示した。
【０１６０】
以下の表２は、全血又は体液からの異なる成分の選択的結合及び分離のための本発明方法の用途の広い適用性と顕著な有効性の概要を示す。この目的のためには、異なる多孔質マトリックスを、スペーサーを有するか又は有さないリガンドの結合のための支持体として使用した。したがって、固定化方法は、２の末端－NH_2を使用することによってグルタルジアルデヒドで、１の－NH2末端及び１の－OH又は－COOH末端においてそれぞれ１－エチル－３（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミドで実施した。アルデヒド又はアミノ基、抗体、酵素、ペプチド、タンパク質の特異的結合のためのアミノ機能性シラン結合試薬を介するシラン処理は、自然にアミン、ペプチド、及びタンパク質と反応するアル

デヒド基もまた、使用した。

【０１６１】

【表２】

表２

多孔質 ﾏﾄﾘｯｸｽ	方法	ｽﾍﾟｰｻｰ	ﾘｶﾞﾝﾄﾞ	成分	有効性 %
ﾎﾟﾘｴﾁﾚﾝ	—	HA	DOC	LPS	80.1
ﾎﾟﾘｴﾁﾚﾝ	—	ﾎﾟﾘ-Lys	DOC	LPS	12.8
ﾎﾟﾘｴﾁﾚﾝ	$-NH_2$	DAH	DOC	LPS	29.6
ﾎﾟﾘｴﾁﾚﾝ	$-NH_2$	—	DOC	LPS	12.5
ﾎﾟﾘｴﾁﾚﾝ	$-NH_2$	DAH	ﾎﾟﾘﾐｷｼﾝB	LPS	16.3
ﾎﾟﾘｴﾁﾚﾝ	$-NH_2$	DAH	ｱﾙｷﾞﾆﾝ	LPS	14.3
ﾎﾟﾘｴﾁﾚﾝ	$-NH_2$	DAH	ﾘｺﾝﾌﾞﾐﾝ	LPS	18.3
ﾎﾟﾘｴﾁﾚﾝ	$-NH_2$	—	抗-TNFα抗体	TNF-α	63.2
ﾎﾟﾘｴﾁﾚﾝ	ｱﾘﾙｱﾐﾝ	PEI	DOC	LPS	33.4
ﾎﾟﾘｴﾁﾚﾝ	ｱﾘﾙｱﾐﾝ	ﾎﾟﾘ-Lys	DOC	LPS	85.5
ﾎﾟﾘｴﾁﾚﾝ	-COOH	—	TNF-α受容体	TNF-α	59.2
ﾎﾟﾘｴﾁﾚﾝ	-COOH	—	ｲﾝﾀｰﾛｲｷﾝ-1 受容体	IL-1	64.0
ﾎﾟﾘｴﾁﾚﾝ	-COOH	—	ﾄﾛﾝﾎﾞﾓｼﾞｭﾘﾝ	ﾄﾛﾝﾋﾞﾝ	70.8
ﾎﾟﾘｴﾁﾚﾝ	-COOH	—	BPI	LPS	91.2
ﾎﾟﾘｴﾁﾚﾝ	-OH	Sil.ald.	TNF-α受容体	TNF-α	61.8
ﾎﾟﾘｴﾁﾚﾝ	-OH	Sil.ald.	ｲﾝﾀｰﾛｲｷﾝ-1 受容体	IL-1	62.0
ﾎﾟﾘｴﾁﾚﾝ	-OH	Sil.ald.	ﾄﾛﾝﾎﾞﾓｼﾞｭﾘﾝ	ﾄﾛﾝﾋﾞﾝ	73.7
ﾎﾟﾘｴﾁﾚﾝ	-OH	Sil.ald.	BPI	LPS	89.3
ﾎﾟﾘｴﾁﾚﾝ	HA	DAH	DOC	LPS	29.6
ﾎﾟﾘｴﾁﾚﾝ	ﾎﾟﾘ-Lys	DAH	DOC	LPS	73.3

【０１６２】

【表３】

表２（つづき）

多孔質 ﾏﾄﾘｯｸｽ	方法	ｽﾍﾟｰｻｰ	ﾘｶﾞﾝﾄﾞ	成分	有効性 %
ﾎﾟﾘｴﾁﾚﾝ	ﾘｺﾝﾌﾞﾐﾝ	—	DOC	LPS	20.8
ﾎﾟﾘｴﾁﾚﾝ	$-NH_2$	GDA	抗 CD 11b 抗体	顆粒球 及び単球	50.2
ﾎﾟﾘｴﾁﾚﾝ	-OH	Sil.ald.	抗 CD 11b 抗体	顆粒球 及び単球	56.1
ﾎﾟﾘｶｰﾎﾞﾈｰﾄ	—	ﾎﾟﾘ-Lys	DOC	LPS	44.4
ﾎﾟﾘｶｰﾎﾞﾈｰﾄ	-OH	Sil.Ald	TNF-α受容体	TNF-α	75.9
ﾎﾟﾘｶｰﾎﾞﾈｰﾄ	-COOH	—	ﾄﾛﾝﾎﾞﾓｼﾞｭﾘﾝ	ﾄﾛﾝﾋﾞﾝ	72.0
ﾎﾟﾘｳﾚﾀﾝ	—	DAH	DOC	LPS	30.2
ﾎﾟﾘｳﾚﾀﾝ	—	DAH	ﾘｺﾝﾌﾞﾐﾝ	LPS	18.5
ﾎﾟﾘｳﾚﾀﾝ	—	ﾎﾟﾘ-Lys	DOC	LPS	14.8
ﾎﾟﾘｳﾚﾀﾝ	—	Sil.Ald	TNF-α受容体	TNF-α	56.7
ﾎﾟﾘｳﾚﾀﾝ	—	Sil.Ald	BPI	LPS	88.0
ｼﾘｺﾝ	—	Sil.Ald	TNF-α受容体	TNF-α	55.3
ｼﾘｺﾝ	—	Sil.Ald	ﾄﾛﾝﾎﾞﾓｼﾞｭﾘﾝ	ﾄﾛﾝﾋﾞﾝ	68.2
ｾﾞｵﾗｲﾄ	—	Sil.Ald	TNF-α受容体	TNF-α	63.9
ｾﾞｵﾗｲﾄ	—	Sil.-NH_2	DOC	LPS	48.3
ｾﾞｵﾗｲﾄ		Sil.Ald	ｲﾝﾀｰﾛｲｷﾝ-1 受容体	IL-1	60.1
ｾﾙﾛｰｽ	CNBr	DAH	DOC	LPS	28.5
ｾﾙﾛｰｽ	CNBr	ﾎﾟﾘ-Lys	DOC	LPS	39.2
PTFE	ｱﾘﾙｱﾐﾝ	DAH	TNF-α受容体	TNF-α	73.0
PTFE	-COOH	—	ｲﾝﾀｰﾛｲｷﾝ-1 受容体	IL-1	77.7

略語：BPI＝殺菌透過性増加タンパク質；DAH＝1,6-ジアミノ-ヘキサン；DOC＝デオキシコレート；EDC＝1-エチル-3(3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド；GDA＝グルタルジアルデヒド；HA＝ヒアルロン酸；IL-1＝インターロイキン-1；PEI＝ポリエチレンイミン；リコンブミン＝組み換えヒトアルブミン；Sil.ald.＝アルデヒド機能性シラン結合試薬；Sil.-NH_2＝アミノ機能性シラン結合試薬；TNF-α＝腫瘍壊死因子-α

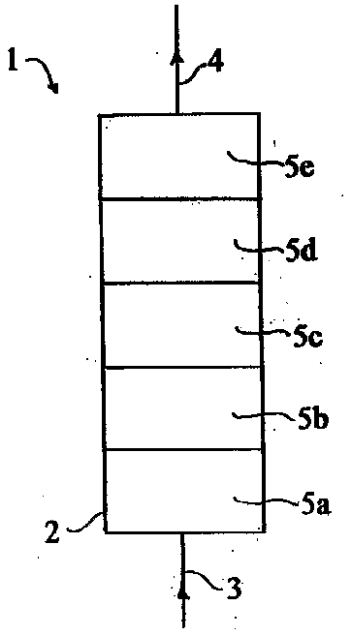
【図面の簡単な説明】

【０１６３】

（原文記載なし）

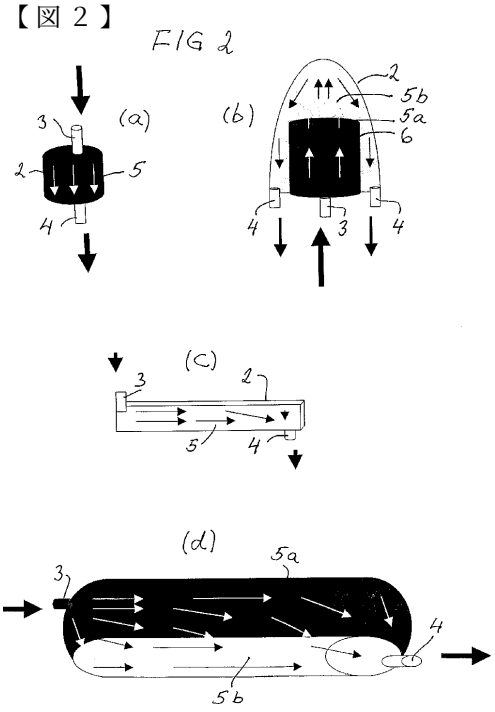
【図１】

Fig 1



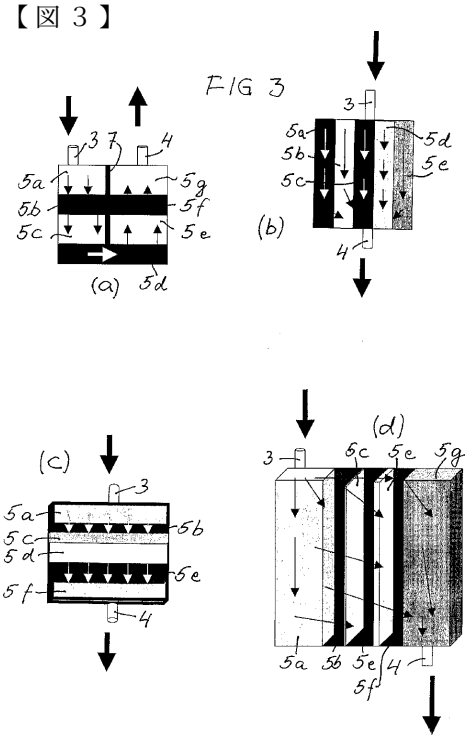
【図２】

FIG 2



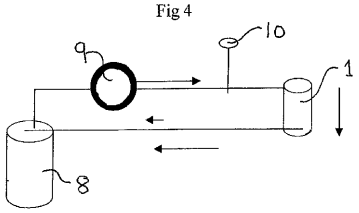
【図３】

FIG 3



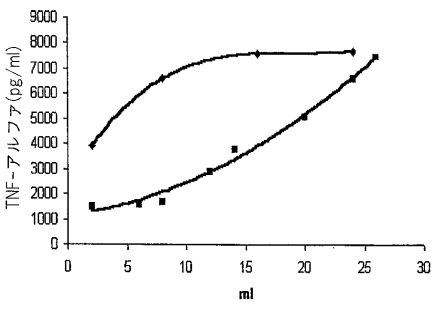
【図４】

Fig 4



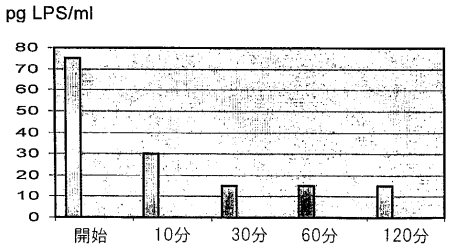
【図５】

Fig 5



【図６】

Fig 6



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SE 03/00553

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC7: B01J 20/32, C02F 2/38, A23L 2/38 // A61M 1/34
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC7: B01J, A61M, A23L, C02F

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

SE,DK,FI,NO classes as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0679436 A1 (TERUMO KABUSHIKI KAISHA), 2 November 1995 (02.11.95), page 6, line 4 - line 8; page 9, line 52	1-20
X	EP 0424698 A1 (FRESENIUS AG), 2 May 1991 (02.05.91), abstract	1-20
X	WO 0123413 A1 (GAMBRO DIALYSATOREN GMBH & CO., KG.), 5 April 2001 (05.04.01), claims 14,20	1-20
X	EP 0464872 A1 (KANEGAFUCHI KAGAKU KOGYO KABUSHIKI KAISHA), 8 January 1992 (08.01.92), page 3, line 14 - line 20	1-20

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
5 August 2003	06 -08- 2003
Name and mailing address of the ISA/ Swedish Patent Office Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. +46 8 666 02 86	Authorized officer Agneta Änggård/BS Telephone No. +46 8 782 25 00

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SE03/00553

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see next sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

1-20

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SE03/00553

Invention 1:

The invention according to claims 1-20 relates to a method for selectively binding and separating a component from body fluid.

Invention 2:

The invention according to claims 22 and 23 relates to the use of bile acid for eliminating component from an aqueous solution.

According to Article 34 (3) (a-c) and Rule 13.2 an international application shall relate to one invention only or to a group of inventions linked by one or more of the same or corresponding "special technical features" i.e. features that define a contribution which each of the inventions makes over prior art.

A search for this special technical feature among the claims of the present application did not reveal such a unifying, novel technical feature.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SE 03/00553

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0679436 A1	02/11/95	DE 69517466 D,T	08/02/01
		JP 7289891 A	07/11/95
		US 5667684 A	16/09/97
EP 0424698 A1	02/05/91	SE 0424698 T3	
		AT 146700 T	15/01/97
		CA 2026717 A	04/04/91
		DE 3932971 A,C	11/04/91
		DE 59010619 D	00/00/00
		ES 2098237 T	01/05/97
		JP 3100974 B	23/10/00
		JP 3254756 A	13/11/91
		US 5476715 A	19/12/95
WO 0123413 A1	05/04/01	CA 2383955 A	05/04/01
		EP 1220868 A	10/07/02
		JP 2003511354 T	25/03/03
EP 0464872 A1	08/01/92	SE 0464872 T3	
		AT 97832 T	15/12/93
		AT 42222 T	15/05/89
		AT 195891 T	15/09/00
		AU 571855 B	28/04/88
		AU 598643 B	28/06/90
		AU 1262188 A	02/06/88
		AU 2183283 A	07/06/84
		CA 1221307 A	05/05/87
		DE 3379644 D	00/00/00
		DE 3382723 D,T	24/03/94
		DE 3382834 D,T	22/03/01
		EP 0110409 A,B	13/06/84
		SE 0110409 T3	
		EP 0225867 A,B	16/06/87
		SE 0225867 T3	
		JP 1675623 C	26/06/92
		JP 3039736 B	14/06/91
		JP 59156431 A	05/09/84
		US 4576928 A	18/03/86
		US 4637994 A	20/01/87
		JP 59193135 A	01/11/84
		JP 1536999 C	21/12/89
		JP 59196738 A	08/11/84
		JP 63019214 B	21/04/88
		JP 4071551 B	16/11/92
		JP 60077769 A	02/05/85
		JP 1557432 C	16/05/90
		JP 59102436 A	13/06/84
		JP 62056782 B	27/11/87
		ZA 8308908 A	25/07/84

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1998)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	FI		テーマコード（参考）
	Ａ６１Ｌ 33/00	Ｔ	
	Ａ６１Ｐ 31/04		

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NI,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100127085
弁理士 越阪部 倫子
(74)代理人 100082898
弁理士 西山 雅也
(72)発明者 ヨンソン，ボー
ドイツ連邦共和国，８８７０９ メールスブルク，ヘヘンベーク １７
(72)発明者 リュングレン，レンナルト
スウェーデン国，エス－２２６ ５３ ルンド，ニョッベリョブス キュルコベーグ ３１

Ｆターム(参考) 4C077 AA13 BB02 BB03 CC06 EE01 KK09 KK13 LL23 MM07 NN14
NN16 PP09 PP10 PP12 PP13 PP14 PP15
4C081 AC15 BA01 BA14 BA17 BB02 BB08 BC02 CA021 CA031 CA051
CA081 CA131 CA161 CA181 CA201 CA211 CA231 CA241 CA251 CA271
CA281 CB011 CB051 CC01 CD011 CD111 CD31 CE11 CF112 CF22
CG01 DB03 DB07 EA03 EA06
4G066 AA02C AA04C AA09D AA12C AA43D AA52D AA71C AA72C AB07D AB09D
AB15D AB18D AC01D AC06C AC11C AC13C AC14C AC15C AC17C AC21C
AC23C AC24C AC26C AC27C AC28C AD01B AD06B AD13B AD15B AD20D
AE05B BA25 BA38 CA27 CA51 CA54 CA56 DA12 FA21 FA27