



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑪ CH 664 496 A5

⑤① Int. Cl.⁴: A 61 K 37/54

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑫ **PATENTSCHRIFT** A5

<p>⑰ Gesuchsnummer: 339/84</p> <p>⑳ Anmeldungsdatum: 31.05.1982</p> <p>㉔ Patent erteilt: 15.03.1988</p> <p>④⑤ Patentschrift veröffentlicht: 15.03.1988</p>	<p>⑦③ Inhaber: Mochida Pharmaceutical Co., Ltd, Shinjuku-ku/Tokyo (JP)</p> <p>⑦② Erfinder: Ohnishi, Haruo, Funabashi-shi/Chiba (JP) Kosuzume, Hiroshi, Yokohama-shi/Kanagawa (JP) Suzuki, Yasuo, Kawaguchi-shi/Saitama (JP) Mochida, Ei, Toshima-ku/Tokyo (JP)</p> <p>⑦④ Vertreter: Patentanwälte Schaad, Balass, Sandmeier, Alder, Zürich</p> <p>⑧⑥ Internationale Anmeldung: PCT/JP 82/00212 (Ja)</p> <p>⑧⑦ Internationale Veröffentlichung: WO 83/04180 (Ja) 08.12.1983</p>
--	--

⑤④ **Material zur Entfernung von Immunkomplexen aus dem Blut oder aus Plasma.**

⑤⑦ Das Material dient zur Entfernung eines Immunkomplexes aus dem Blut oder Plasma. Das Mittel kann bei Immunkomplexkrankheiten, wie rheumatoide Arthritis oder systemisches Erythematosis, verwendet werden.

Es enthält als wirksames Mittel ein Pepsin oder ein pepsinartiges Säugetierleukozytenenzym. Das Enzym ist an einen pharmazeutisch annehmbaren Träger gebunden.

PATENTANSPRÜCHE

1. Material zur Entfernung von Immunkomplexen aus dem Blut oder aus Plasma, dadurch gekennzeichnet, dass es einen pharmazeutisch annehmbaren Träger und ein wirksames Mittel aus der Gruppe von Pepsin und einem pepsinartigen Säugetierleukozyten-Enzym auf dem Träger immobilisiert enthält.

2. Material nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es Human-Urin-Pepsin enthält.

3. Material nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es Pepsin eines nicht-humanen Tieres enthält.

4. Material nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass der Träger aus der Gruppe von Sepharose, Agarose und Glasperlen gewählt ist.

5. Material nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass der Träger eine Filtermembrane eines künstlichen Dialysators umfasst.

6. Material nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass der Träger die Innenfläche einer Röhre umfasst.

BESCHREIBUNG

Technisches Gebiet

Die Erfindung betrifft ein Material zur Entfernung von Immunkomplex aus dem Blut oder aus Plasma.

Stand der Technik

Autoimmunstörungen oder Immunkomplexkrankheiten, wie rheumatoide Arthritis, systemischer Lupus erythematosus (SLE) und Lupus Nephritis, sind, wie die Namen zeigen, Störungen, die durch einen Komplex verschiedener Antikörper und Antigene, d. h. einem Immunkomplex, verursacht werden. Die Mechanismen von Immunkomplexkrankheiten sind derart kompliziert, dass verschiedene Punkte noch immer der Aufklärung harren, jedoch wird vermutet, dass diese Krankheiten wie folgt ablaufen:

Wenn Gewebe durch bakterielle oder virale Infektion beschädigt werden, werden Antikörper gegen neu gebildete Autoantigene oder viral infizierte Zellen gebildet, die mit dem entsprechenden Antigen zu Immunkomplexen reagieren. Da diese Immunkomplexe das Komplementsystem und die Blutplättchen aktivieren, werden vasoaktive Substanzen, wie Histamin und Serotonin, freigesetzt und die Permeabilität der Blutgefäße wird erhöht. Dann treten die im Kreislauf befindlichen Immunkomplexe in die Gefäßwand, deren Permeabilität erhöht wurde, ein und setzen sich entlang der Basalmembrane. An der Stelle der abgelagerten Immunkomplexe sammeln sich polymorphonukleare Leukozyten, infolge der auf Leukozyten wirksamen chemotaktischen Faktoren, die durch die Umsetzung des Komplementes mit den abgelagerten Immunkomplexen gebildet wurden. Die polymorphonuklearen Leukozyten, die mit den Immunkomplexen reagieren, setzen verschiedene gewebsbeschädigende Substanzen, wie Cathepsin D und E, Kollagenase, Elastase und Permeabilitätsfaktoren, frei, wobei diese Substanzen dann das Gewebe schädigen. Bei Patienten mit Immunkomplexkrankheiten, wie SLE, ist der Komplementgehalt im Serum im allgemeinen niedrig und die Verschlechterung des Krankheitszustandes steht in enger Beziehung mit der Abnahme des Komplementgehaltes. Es wird vermutet, dass diese Abnahme durch den starken Verbrauch des Komplementes an der Stelle der Reaktion zwischen Antigenen und Antikörpern, z. B. in den Nieren und Blutgefäßen, verursacht wird. Weiterhin besteht eine Beziehung zwischen Immunkomplexen und Blutkoagulationssystemen und es wird vermutet,

2

dass Immunkomplexe durch verschiedene Mechanismen ernste Symptome verursachen, z. B. Beschleunigung der Fibrinoidablagerung auf den beschädigten Geweben.

Gegenwärtig werden zur Behandlung dieser Immunkomplexkrankheiten zusätzlich zur medikamentösen Behandlung mit Steroiden, immunsuppressiven Mitteln, entzündungshemmenden Mitteln usw., Physiotherapie und Plasmaersatztherapie angewendet. Insbesondere ist die Plasmaersatztherapie eine der zuverlässigsten Behandlungsmethoden zur Entfernung eines Immunkomplexes, d. h. eines pathogenen Faktors, jedoch werden die Vorteile dieser Methode nicht genügend ausgenützt, da Schwierigkeiten bei der Beschaffung des notwendigen Plasmas für den Plasmaersatz bestehen.

Darstellung der Erfindung

Die Erfinder haben viele und intensive Untersuchungen zur Entwicklung eines Materials, welches die gleiche Wirksamkeit wie die Plasmaersatztherapie aufweist, jedoch keinen Plasmaersatz erfordert, ausgeführt. Sie haben nun gefunden, dass Pepsin und ein pepsinartiges Enzym, das in Säugetierleukozyten enthalten ist, bei einem neutralen pH-Bereich, ohne Schädigung normaler Plasmaproteine, Immunkomplexe spezifisch zersetzt. Aufgrund dieses Befundes haben sie eine Erfindung ausgearbeitet, die ein Mittel zur Behandlung von Immunkomplexkrankheiten, enthaltend dieses Enzym, das in der JP-Patentanmeldung Nr. 18429/1981 (PCT/JP82/00037) beschrieben ist, als wirksame Komponente betrifft. Das erfindungsgemässe Material stellt eine Verbesserung gegenüber dem vorhergehenden dar und ermöglicht die Entfernung eines Immunkomplexes ohne Schädigung der inherenten Funktionen von Plasmaproteinen. Dabei wird das Plasma eines an einer Immunkomplexkrankheit leidenden Patienten mit dem erfindungsgemässen Material behandelt.

Da das Hauptziel der Plasmaersatztherapie das Entfernen von nicht-dialysierbaren pathogenen Substanzen, insbesondere von Immunkomplexen, aus dem Plasma des Patienten ist, kann die Behandlung des Plasmas des Patienten mit dem obengenannten immobilisierten Pepsin die gleiche Wirksamkeit haben wie der Plasmaersatz, ohne dass Plasma ersetzt werden muss. Beispielsweise wird, wenn das Plasma eines Patienten mit einer Immunkomplexkrankheit einem extrakorporalen Kreislauf unterworfen wird, indem das Plasma durch eine mit dem obengenannten immobilisierten Pepsin bepakte Säule geführt wird, nur der Immunkomplex aus dem Plasma entfernt, ohne Beeinflussung der Plasmaproteine. Da dieses Verfahren die Verwendung von Ersatzplasma (vom Patienten oder einer anderen Person) nicht erfordert, kann ausserdem auf die Berücksichtigung von Nebenwirkungen, wie Serumhepatitis oder negative Reaktion infolge Blutunverträglichkeit, verzichtet werden.

Das erfindungsgemäss eingesetzte Pepsin ist ein bekanntes Enzym (Journal of Clinical Investigations, Vol. 27, Seite 818, 1948). Das erfindungsgemässe immobilisierte Pepsin kann durch Reinigung von im Magen, Blut, Urin etc. von verschiedenen Tieren vorkommendem Pepsinogen durch eine geeignete Methode und Fixieren des gereinigten Pepsinogens auf einen geeigneten Träger, gefolgt von der Aktivierung des immobilisierten Pepsinogens, durch eine Säurebehandlung erhalten werden. Als Pepsin für die Herstellung des erfindungsgemässen, immobilisierten Pepsin enthaltenden Materials wird Pepsin humanen Ursprungs bevorzugt, da es das sicherste und wirksamste ist, jedoch kann von anderen Tieren als vom Menschen stammendes Pepsin auch verwendet werden. Als Träger für das Immobilisieren werden Träger mit kleinerer Proteinadsorptionskapazität, wie

Sepharose (ein bekanntes Adsorbens, hergestellt von Pharmacia Fine Chemicals Co.), Agarose, Glasperlen usw., bevorzugt. Insbesondere wird an der inneren Fläche einer Filtermembrane eines künstlichen Dialysators immobilisiertes Pepsin bevorzugt oder eine Röhre, wie eine Nylonröhre, an die Pepsin direkt fixiert werden kann, kann für das Immobilisieren benützt werden. Für die Immobilisierung können bekannte Techniken angewendet werden.

Ein immobilisiertes Enzym, enthaltend ein an einen geeigneten Träger fixiertes pepsinartiges oder pepsinähnliches Enzym, kann auch verwendet werden, wobei das gereinigte pepsinähnliche Enzym erhalten wird, indem eine überstehende Flüssigkeit von homogenisierten Leukozyten eines Säugtieres durch eine mit 0,1 M Acetatpuffer (pH 5,3) äquilibrierte DEAE-Cellulosesäule geleitet wird, um das pepsinähnliche Enzym in der Säule zu adsorbieren, das Enzym mit dem gleichen Puffer, enthaltend 0,5 M Natriumchlorid, eluiert und das Eluat auf Sephadex G-100, das mit 0,9%-iger physiologischer Kochsalzlösung gequollen wurde, gelchromatographiert wird.

Beispielsweise kann nach der Methode von Seiffers et al (American Journal of Physiology, Vol. 206, Seite 1106, 1964) das immobilisierte Enzym, durch Durchleiten von Human-Urin durch eine DEAE-Cellulosesäule, die mit 0,1 M Acetatpuffer (pH 5,3) äquilibriert wurde, zum Adsorbieren des Pepsinogens an der Säule, und dann Eluieren des Pepsinogens mit dem gleichen Puffer, enthaltend 0,3 M Natriumchlorid, Konzentrieren des Eluates, weitere Reinigung des Konzentrates durch Gelchromatographie unter Verwendung von mit 0,9%-iger physiologischer Salzlösung gequollenem Sephadex G-100 und Kuppeln des gereinigten Produktes an Sepharose unter Verwendung von Cyanbromid, hergestellt werden, wobei immobilisiertes Pepsinogen erhalten wird, das nachfolgend unter sauren Bedingungen aktiviert wird.

Bei der Entfernung der Immunkomplexe aus dem Blut wird vorteilhaft ein sogenannter extrakorporaler Kreislauf angewendet, wobei das Blut eines an einer Immunkomplexkrankheit leidenden Patienten in einem extrakorporalen Kreislauf geführt und entweder das ganze Blut mit dem obengenannten immobilisierten Pepsin behandelt wird; oder nur das vom Blut durch einen Plasmaseparator getrennte Plasma mit dem vorhergenannten immobilisierten Pepsin behandelt und mit den abgetrennten Blutzellenbestandteilen rekombiniert wird, wobei das behandelte Blut in den Körper zurückgeführt wird. Die Behandlung mit dem immobilisierten Pepsin wird entweder durch Perfundieren des mit dem Plasmaseparator abgetrennten Plasmas durch eine mit an Sepharoseteilchen fixiertem Pepsin beladene Säule oder dergleichen oder durch Perfundieren von Blut oder Plasma durch eine hohle Röhre, welche an ihrer Innenfläche immobilisiertes Pepsin trägt, ausgeführt. Jedoch können auch andere Methoden Anwendung finden.

Für den extrakorporalen Blutkreislauf wird vorteilhaft ein Apparat mit einer Pumpe für den Blutausstoss, einem Plasmaseparator für die Abtrennung von Plasma von den Blutzellen und einer Kontrollvorrichtung für die Kontrolle der genannten Einrichtungen verwendet. Als solcher Apparat kann ein künstlicher Leberhilfsapparat von einem abgetrennten Plasmaperfusionstyp Verwendung finden (Noboru Inoue: Chiryogaku (Therapeutics), Vol. 5, Seite 477, 1980). Bei dieser Methode werden im allgemeinen 1 bis 100 mg, vorzugsweise 5 bis 50 mg, des immobilisierten Pepsins vorteilhaft für 100 ml Blut verwendet. Die Menge des immobilisierten Pepsins kann jedoch vorteilhaft nach dem Gehalt an Immunkomplex variiert werden. Die Erfindung wird nun im einzelnen anhand der Beispiele veranschaulicht.

Bester Weg zur Ausführung der Erfindung Beispiel 1

150 ml Sepharose 4B wurden mit destilliertem Wasser auf 300 ml aufgefüllt und der pH-Wert des erhaltenen Gemisches wurde mit einer 6 N Natriumhydroxidlösung auf 11,0 eingestellt. Der Mischung wurden dann 300 ml 2,5%iges Cyanbromid zugegeben und der pH-Wert des Gemisches wurde während 30 Minuten zwischen 11,0 und 11,5 gehalten, währenddem die Temperatur bei 16 °C gehalten wurde. Die Sepharose wurde mit destilliertem Wasser und mit einer 0,1 M Natriumbicarbonatlösung, die beide vorgängig auf 5 °C abgekühlt wurden, gewaschen, um das Cyanbromid zu entfernen. Die Sepharose wurde dann in 300 ml der gleichen Lösung suspendiert. Zu 300 ml der Suspension wurden 100 mg Humanurinalpepsinogen gegeben und das Gemisch wurde unter sanftem Rühren bei 5 °C während 16 Stunden zum immobilisierten Pepsinogen umgesetzt. Das immobilisierte Pepsinogen wurde bei einem pH-Wert von 2,0 während 10 Minuten in immobilisiertes Pepsin übergeführt (1 mg Pepsin pro ml Harz), von dem 100 ml in eine Glassäule (4 × 8 cm) gepackt wurden.

Heparinisiertes Plasma (100 ml) von Patienten mit rheumatoider Arthritis und von solchen mit systemischem Lupus erythematosus, in deren Blut Immunkomplexe nachgewiesen wurden, wurde durch eine immobilisierte Pepsinsäule, die vorher auf 37 °C erwärmt worden ist, mit einer Geschwindigkeit von 30 ml pro Stunde geleitet. Unter Verwendung von Human IgG Aggregaten als Standardsubstanz wurden die Mengen an Immunkomplex im Plasma vor und nach der Behandlung durch eine hemolytische Reaktion von Schaferythrozyten unter Verwendung von Meerschweinchenkomplexen nach der Methode von Fust et al (Atherosclerosis, Vol. 29, Seite 181, 1978) bestimmt. Weiterhin wurden die Mengen von Albumin und γ -Globulin im Plasma vor und nach der Behandlung durch Elektrophorese, unter Verwendung einer Celluloseacetatmembrane (Ikagaku-jikken Koza (Lectures on Experiments in Medical Chemistry), Vol. 5, Seite 201, 1973), bestimmt. In den Tabellen 1 und 2 werden die Resultate dieser Messungen dargestellt.

Tabelle 1

Krankheit	Plasma-Nr.	Immunkomplexgehalt (μ g/ml)	
		Vor der Behandlung	Nach der Behandlung
Rheumatoide Arthritis	1	184	63
	2	125	kleiner als 50
	3	134	kleiner als 50
Systemischer Lupus erythematosus	1	403	123
	2	253	71
	3	196	kleiner als 50

Tabelle 2

Krankheit	Plasma-Nr.	Albumin (g/dl)		γ -Globulin (g/dl)	
		Vor der Behandlung	Nach der Behandlung	vor der Behandlung	Nach der Behandlung
Rheumatoide Arthritis	1	4.3	4.3	0.8	0.8
	2	4.9	4.9	1.0	1.0
	3	5.0	5.0	1.2	1.2
Systemischer Lupus erythematosus	1	4.8	4.8	1.3	1.3
	2	5.0	5.0	1.3	1.3
	3	5.1	5.1	1.2	1.2

Nach Durchleiten des Plasmas durch die immobilisierte Pepsinsäule nahm der Gehalt an Immunkomplex im Plasma im Fall von beiden Krankheiten ab, währenddem normale Plasmaproteine keine Änderung erlitt.

Beispiel 2

500 mg aminopropylierte Glasperlen wurden in 10 ml Wasser suspendiert und der pH-Wert der Suspension wurde mit einer wässrigen 5 N Natriumhydroxidlösung auf 10 eingestellt. Zur Suspension wurden 15 ml einer Tetrahydrofuranlösung, enthaltend 1,5 g Cyanbromid, gegeben und der pH-Wert des Gemisches wurde während 10 Minuten unter Zugabe einer wässrigen 5 N Natriumhydroxidlösung in geeigneten Intervallen auf 10 gehalten. Die Glasperlen wurden durch Filtrieren gesammelt und mit einer 0,1 M Natriumbicarbonatlösung gewaschen. Die derart behandelten Glasperlen wurden einem gemischten Lösungsmittel, bestehend aus 25 ml einer wässrigen 0,1 M Natriumbicarbonatlösung und 25 ml Methanol, das 3 Mole Methyl-11-aminoundecanoat-hydrochlorid enthielt, suspendiert und die Suspension wurde über Nacht bei 4 °C und einem pH-Wert von 9 gehalten und umgesetzt. Die Glasperlen wurden durch Filtrieren gesammelt, mit Wasser und Methanol gewaschen und in 20 ml absolutem Methanol suspendiert. Zu der Suspension wurde 1 ml Hydrazinhydrat gegeben und das Gemisch wurde während 3 Stunden gerührt. Die Glasperlen wurden mit Methanol, 0,1 N Salzsäure und Wasser in der genannten Reihenfolge gewaschen. Dann wurden die Perlen in 20 ml 1 N Salzsäure suspendiert. Zu der Suspension wurden 280 mg Natriumnitrit gegeben und das Gemisch wurde unter Rühren bei 0 °C während 20 Minuten umgesetzt.

Nach Beendigung der Umsetzung wurden die Glasperlen mit einer kleinen Menge Wasser gewaschen und in 20 ml einer wässrigen 0,1 M Natriumbicarbonatlösung (pH 8) suspendiert. Schweinepepsinogen (50 mg) wurde zu der Suspension gegeben und darin gelöst und das Gemisch wurde unter Rühren bei 4 °C über Nacht umgesetzt. Das derart erhaltene immobilisierte Pepsinogen wurde während 10 Minuten bei einem pH-Wert von 2 zum immobilisierten Pepsin aktiviert, das dann in 10 ml einer 0,15 M physiologischen Kochsalzlösung suspendiert und in eine Glassäule (1 × 8 cm) gepackt wurde. Heparinisiertes Plasma (10 ml), enthaltend ein Immunkomplex von je einem an rheumatoider Arthritis bzw. an Lupus erythematosus leidenden Patienten, wurde durch diese Säule mit einer Geschwindigkeit von 3 ml pro Stunde geleitet. Der Immunkomplexgehalt des Plasmas und die Charakteristika anderer Plasmaproteine vor und nach der Behandlung wurden auf die gleiche Art wie in Beispiel 1 geprüft. Die Tabellen 3 und 4 zeigen die erhaltenen Resultate.

Nach Durchleiten des Plasmas durch die Säule mit dem immobilisierten Pepsin nahm der Immunkomplexgehalt im Plasma bei beiden Krankheiten ab, währenddem die normalen Plasmaproteine keine Änderung zeigten.

Tabelle 3

Krankheit	Plasma-Nr.	Immunkomplexgehalt (µg/ml)	
		Vor der Behandlung	Nach der Behandlung
Rheumatoide	1	193	58
Arthritis	2	167	65
	3	143	kleiner als 50
Systemischer	1	353	134
Lupus erythematosus	2	296	88
	3	199	kleiner als 50

4

Tabelle 4

Krankheit	Plasma-Nr.	Albumin (g/dl)		γ-Globulin (g/dl)	
		Vor der Behandlung	Nach der Behandlung	Vor der Behandlung	Nach der Behandlung
5 Rheumatoide	1	4.8	4.8	0.9	0.9
	2	4.7	4.7	1.0	1.0
10 Arthritis	3	5.0	5.0	1.0	1.0
	1	4.8	4.8	1.2	1.2
Systemischer Lupus erythematosus	2	5.1	5.1	1.2	1.2
	3	5.0	5.0	1.2	1.2

Beispiel 3

Eine Nylonröhre von 15 cm Länge (Innendurchmesser 3 mm) wurde in ein Wasserbad, das bei 35 °C gehalten wurde, eingetaucht. Der Innenraum der Röhre wurde mit 4,5 N Salzsäure gefüllt und die Röhre wurde während 15 Minuten der Reaktion unterworfen. Die Innenseite der Röhre wurde mit destilliertem Wasser und mit 0,2 M Natriumbicarbonatlösung (pH 9,4) gewaschen. Der Innenraum der Röhre wurde dann mit einer 5%-igen Glutaraldehydlösung, die in der vorherigen Lösung gelöst wurde, gefüllt und die Röhre wurde während 20 Minuten der Umsetzung unterworfen. Die Innenfläche der Röhre wurde mit 0,05 M Phosphatpuffer (pH 8,0) ausreichend gewaschen und 5 mg im Phosphatpuffer gelöstes Rattenuropepsinogen wurden mit einer Geschwindigkeit von 0,2 ml/min. während 2 Stunden zur Fixierung des Pepsinogens an der Innenfläche der Röhre durch letztere zirkuliert. Die Innenfläche der Röhre wurde dann durch Behandlung mit einer Salzsäurelösung vom pH 2 während 10 Minuten aktiviert, um das Pepsinogen in das immobilisierte Pepsin zu überführen.

Nach dem Verfahren von Suzuki et al (Folia Pharmacologica Japonica, Vol. 68, Seite 572, 1972) wurde Anti-Rattennieren-Kaninchenserum mit einer Dosierung von 5 ml/kg intravenös Gruppen von 6 männlichen Wistar-Stamm-Ratten zur Erzeugung von Nephritis injiziert. 21 Tage nach Erzeugung von Nephritis wurden zwei mit Heparin behandelte Injektionsnadeln in die juguläre Vene jeder Ratte eingeführt und befestigt, um durch Verbinden der zwei Injektionsnadeln mit der oben beschriebenen Röhre einen extrakorporalen Kreislauf herzustellen. Der Kreislauf wurde mit einer Geschwindigkeit von 2 ml pro Stunde während 4 Stunden aufrechterhalten. Als Kontrolle wurde eine Röhre ohne immobilisiertes Pepsin in der gleichen Weise eingesetzt. Die Gehalte an Immunkomplexen im Blut wurde nach dem extrakorporalen Kreislauf in der gleichen Weise wie in Beispiel 1 bestimmt. Tabelle 5 zeigt die Resultate.

Durch den Kreislauf des Blutes durch die Röhre, an deren Innenfläche immobilisiertes Pepsin fixiert war, wurde der Immunkomplexgehalt im Blut bemerkenswert vermindert.

Tabelle 5

	Immunkomplexgehalt (µg/ml)
65 Kontrollgruppe	283 ± 29
Immobilisierte Pepsingruppe	195 ± 11*

* p < 0,05

Beispiel 4

Ein Plasmaseparator vom Filtrationstyp mit hohlen Celluloseacetatfäden wurde in die kubitale Vene von 5 erwachsenen, mit Pentobarbital anästhesierten, Hunden eingesetzt (Körpergewicht: 10 bis 15 kg). Die gemäss Beispiel 1 hergestellte Säule mit immobilisiertem Pepsin wurde an einen heparinisierten Perfusionskreislauf für Plasma angeschlossen und das Plasma wurde in den Kreislauf mit einer kontrollierten Fliessgeschwindigkeit von 30 ml pro Stunde mittels einer Pumpe mit einstellbarer Fliessgeschwindigkeit (Perista pump Ato) eingeführt. Das Plasma, das durch die Säule mit dem immobilisierten Pepsin geführt wurde und die abgetrennten Blutzellenbestandteile wurden kombiniert und durch einen extrakorporalen Kreislauf, der mit der kubitalen Vene an der anderen Seite gebildet wurde, in den Körper zurückgeführt. 40 mg/kg eines löslichen Immunkomplexes (hergestellt aus Human IgG und anti-human IgG Kaninchen Antikörper im Verhältnis 4:1) wurden intravenös in die Femoralvene mit einer kontinuierlichen Infusionsspritze (Truth A – II Typ) während 3 Stunden intravenös injiziert. Als Kontrolle wurde eine Säule mit Sepharose ohne immobilisiertem Pepsin in der gleichen Weise verwendet. 3 Stunden nachdem der extrakorporale Kreislauf eingesetzt wurde, wurde der Gehalt des Immunkomplexes im Plasma auf die gleiche Weise wie in Beispiel 1 bestimmt. Die Resultate werden in Tabelle 6 dargestellt.

Nach Durchleiten des Plasmas durch die Säule mit dem immobilisierten Pepsin hat der Gehalt an Immunkomplex im Plasma merkbar abgenommen.

Tabelle 6

	Immunkomplexgehalt (µg/ml)
Kontrollgruppe	343 ± 27
Immobilisierte Pepsingruppe	105 ± 11**

** p < 0,01

Beispiel 5

100 mg von gastrischem Human-Pepsinogen wurden an die Innenfläche einer Filtermembrane eines künstlichen Dia-

lysators vom Hohlfasertyp (Dow-4 Cordis) unter der Verwendung von Cyanbromid fixiert und dann mit Salzsäure vom pH-Wert 2,0 während 10 Minuten aktiviert, um das Pepsinogen in immobilisiertes Pepsin zu überführen. In fünf Fällen wurden je 200 ml heparinisiertes Blut, enthaltend Immunkomplexe, durch einen künstlichen Dialysator mit einer Geschwindigkeit von 10 ml pro Minute im Kreislauf geführt. Als Kontrolle wurde ein künstlicher Dialysator ohne immobilisiertem Pepsin in der gleichen Weise verwendet. Nach 2 Stunden des Kreislaufes wurde das Plasma abgetrennt und der Gehalt an Immunkomplex wurde nach der Methode gemäss Beispiel 1 bestimmt. Die Resultate werden in Tabelle 7 dargestellt.

Nach Zirkulieren des Blutes durch das immobilisierte Pepsin war der Gehalt an Immunkomplex im Blut merklich vermindert.

Tabelle 7

	Immunkomplexgehalt (µg/ml)
Kontrollgruppe	203 ± 19
Immobilisierte Pepsingruppe	128 ± 17*

* p < 0,05

Wie in den vorangehenden Beispielen beschrieben, vermindert das erfindungsgemässe immobilisiertes Pepsin enthaltende Material den Gehalt an Immunkomplex im Blut, ohne die normalen Plasmaproteine in irgendeiner Weise zu beeinflussen. Folglich können Immunkomplexe aus dem Blut von Patienten mit einer Immunkomplexkrankheit ohne Schädigung der physiologischen Funktionen des Blutes durch Behandeln des Blutes oder des Plasmas des Patienten mit dem immobilisierten Pepsin, gefolgt von der Rückführung des behandelten Blutes oder Plasmas durch Perfusion in den Körper des Patienten, entfernt werden. Dies ist tatsächlich sehr wichtig, da es bedeutet, dass durch die Verwendung des immobilisierten Pepsins und des Verfahrens zur Entfernung von Immunkomplexen die gleichen Resultate erhalten werden können, als mit der Plasmaersatztherapie, ohne dass dabei Plasma ersetzt werden müsste.

45

50

55

60

65