

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6524597号
(P6524597)

(45) 発行日 令和1年6月5日(2019.6.5)

(24) 登録日 令和1年5月17日(2019.5.17)

(51) Int.Cl.		F I	
A 6 1 K 35/12	(2015.01)	A 6 1 K 35/12	
A 6 1 L 27/36	(2006.01)	A 6 1 L 27/36	1 0 0
A 6 1 K 35/32	(2015.01)	A 6 1 K 35/32	
A 6 1 K 35/36	(2015.01)	A 6 1 K 35/36	
A 6 1 K 35/38	(2015.01)	A 6 1 K 35/38	

請求項の数 16 (全 15 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-527404 (P2016-527404)	(73) 特許権者	504154148
(86) (22) 出願日	平成26年11月4日 (2014.11.4)		ライフセル コーポレーション
(65) 公表番号	特表2016-536315 (P2016-536315A)		LifeCell Corporation
(43) 公表日	平成28年11月24日 (2016.11.24)		n
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/063796		アメリカ合衆国 ニュージャージー州 O
(87) 国際公開番号	W02015/066668		7940 マディソン ヒラルダ ファー
(87) 国際公開日	平成27年5月7日 (2015.5.7)		ムス 5
審査請求日	平成29年11月1日 (2017.11.1)	(74) 代理人	110001302
(31) 優先権主張番号	61/899,647		特許業務法人北青山インターナショナル
(32) 優先日	平成25年11月4日 (2013.11.4)	(72) 発明者	ク, ホイ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 ニュージャージー州 O
			8536, プレインスボロ, デイジーコート 10

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 α-ガラクトースを除去する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ガラクトース - 1, 3 - ガラクトース部分を含有する、少なくとも1つのコラーゲン含有組織マトリックスを選択するステップと；

前記組織からガラクトース - 1, 3 - ガラクトース部分を除去するのに十分な条件下で、前記少なくとも1つの組織マトリックスをアルカラーゼまたはプロメラインから選択される少なくとも1つのタンパク質分解酵素と接触させるステップと

を含んでなることを特徴とする、組織製品を調製する方法。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の方法において、前記少なくとも1つのコラーゲン含有組織マトリックスが、細胞組織内に含有されており、方法が、前記細胞組織を脱細胞化するステップをさらに含んでなることを特徴とする方法。

【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載の方法において、前記組織マトリックスが、完全に脱細胞化されていることを特徴とする方法。

【請求項 4】

請求項 1 乃至 3 の何れか一項に記載の方法において、 - ガラクトースが、実質的にまたは完全に前記コラーゲン含有組織マトリックスから除去されることを特徴とする方法。

【請求項 5】

請求項 1 乃至 4 の何れか一項に記載の方法において、前記タンパク質分解酵素が、アル

10

20

カラーゼであることを特徴とする方法。

【請求項 6】

請求項 1 乃至 5 の何れか一項に記載の方法において、前記タンパク質分解酵素が、少なくとも 1 つの組織マトリックスに損害を与えることなく、ガラクトース - 1 , 3 - ガラクトース部分を除去することを特徴とする方法。

【請求項 7】

請求項 1 乃至 6 の何れか一項に記載の方法において、アッセイを実施して、ガラクトース - 1 , 3 - ガラクトース部分が、前記少なくとも 1 つのコラーゲン含有組織マトリックスから除去されたかどうかを判定するステップをさらに含んでなることを特徴とする方法。

10

【請求項 8】

請求項 1 乃至 7 の何れか一項に記載の方法において、前記タンパク質分解酵素が、アルカラーゼであり、前記アルカラーゼが、約 0 . 5 時間から約 2 4 時間に及ぶ時間にわたり、約 0 . 0 0 0 1 % から約 0 . 1 % に及ぶ濃度で使用されることを特徴とする方法。

【請求項 9】

請求項 1 乃至 7 の何れか一項に記載の方法において、前記タンパク質分解酵素が、プロメラインであり、前記プロメラインが、約 1 時間から約 2 4 時間に及ぶ時間にわたり、約 1 0 単位 / リットルから約 2 0 0 単位 / リットルに及ぶ濃度で使用されることを特徴とする方法。

【請求項 1 0】

請求項 1 乃至 8 の何れか一項に記載の方法において、前記組織を - ガラクトシダーゼに接触させるステップをさらに含んでなることを特徴とする方法。

20

【請求項 1 1】

請求項 1 乃至 1 0 の何れか一項に記載の方法において、前記少なくとも 1 つのコラーゲン含有組織マトリックスが、骨、皮膚、脂肪組織真皮、腸管、膀胱、腱、靭帯、筋肉、筋膜、血管、神経性、血管、肝臓、心臓、肺、腎臓、および軟骨組織の少なくとも 1 つに由来する組織マトリックスを含んでなることを特徴とする方法。

【請求項 1 2】

請求項 1 乃至 1 1 の何れか一項に記載の方法において、前記少なくとも 1 つのコラーゲン含有組織マトリックスが、ブタ組織マトリックスであることを特徴とする方法。

30

【請求項 1 3】

請求項 1 に記載の方法において、前記少なくとも 1 つのコラーゲン含有組織マトリックスが、ブタ無細胞皮膚組織マトリックスからなることを特徴とする方法。

【請求項 1 4】

請求項 1 乃至 1 3 の何れか一項に記載の方法において、1 つまたは複数の生存能力があり組織適合性の細胞を前記組織製品に添加するステップをさらに含んでなることを特徴とする方法。

【請求項 1 5】

必要とする対象を治療するための医薬品の製造における、請求項 1 乃至 1 4 の何れか一項に記載の方法によって調製された組織製品の使用。

40

【請求項 1 6】

組織欠陥を治療するための装置の製造における、請求項 1 乃至 1 4 の何れか一項に記載の方法によって調製された組織製品の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本出願は、米国特許法第 1 1 9 条の下に、参照によってその内容全体を援用する、2 0 1 3 年 1 1 月 3 日に出願された、米国仮特許出願第 6 1 / 8 9 9 , 6 4 7 号明細書の優先権を主張する。

【0 0 0 2】

50

本開示は、一般に、ガラクトース - 1, 3 - ガラクトースエピトープの一部または全部を欠く、組織マトリックスを調製して使用方法に関する。

【0003】

様々な組織由来製品が使用されて、病的なまたは損傷を受けた組織および臓器が修復、再生、回復、または別の様式で治療される。このような製品は、無処理組織移植片および/または部分的にまたは完全に脱細胞化された組織を含み得る。これらの組織製品は、レシピエントから(すなわち自家移植片)、同一生物種の別のメンバーから(すなわち同種移植片)、または異なる生物種から(すなわち異種移植片)採取された組織をはじめとする、様々なドナー源から提供され得る。

【0004】

自家移植片および同種移植片は、ドナー組織内の生物種特異的タンパク質の発現に起因する拒絶反応の可能性を軽減させてもよい一方で、これらのドナー源は、非実用的であったり、または外科的使用の時点で十分な材料を提供できないこともある。

【0005】

したがって、代案の異種移植片供給源が、探し求められることもある。異種移植の1つの問題は、ドナーが、レシピエントによって発現されない酵素またはその他のタンパク質を組織内に発現して、拒絶反応の可能性を高めるかもしれないことである。例えば、末端二糖ガラクトース - 1, 3 ガラクトース(「 - gal」)の形成を触媒する酵素UDP - ガラクトースである、 - D - ガラクトシル - 1, 4 - N - アセチル - D - グルコサミニド - 1, 3 - ガラクトシル - トランスフェラーゼ(「 - 1, 3 ガラクトシルトランスフェラーゼ」または「 GT」)を発現しない動物(例えば、ヒトまたはその他の霊長類)は、免疫応答増大と、組織移植片内の細胞表面に - gal エピトープを発現する動物(例えば、ブタまたはその他の非霊長類哺乳類)由来の異種移植片の超急性拒絶反応を示し得る。

【0006】

組織製品からの - gal エピトープの排除は、組成物に対する免疫応答を低減させてもよい。U. Galili et al., J. Biol. Chem. 263: 17755 (1988)。したがって、 - gal エピトープを発現しないレシピエント(例えばヒト)への移植が意図されるドナー組織から、 - gal エピトープを除去する方法が必要である。

【0007】

したがって、様々な実施形態において、脱細胞化組織から - gal を除去する方法が開示される。方法は、ガラクトース - 1, 3 - ガラクトース部分を含む、少なくとも1つのコラーゲン含有組織マトリックスを選択するステップと; 組織からガラクトース - 1, 3 - ガラクトース部分を除去するのに十分な条件下で、少なくとも1つの組織マトリックスを少なくとも1つのタンパク質分解酵素に接触させるステップとを含んでなり得る。

【0008】

酵素は、アルカラゼ、プロメライン、ディスパーゼ、またはトリプシンを含み得る。そして方法は、アッセイを実施して、ガラクトース - 1, 3 - ガラクトース部分が、少なくともコラーゲン含有組織マトリックスから除去されたかどうかを判定するステップをさらに含んでなり得る。

【0009】

製造される組織製品を使用する方法もまた、提供される。さらに、組織製品を使用する治療法、または開示される方法によって製造される組織製品が提供される。酵素的に処理された組織製品が、さらに提供される。組織製品は、野生型ブタコラーゲン含有組織から調製される無細胞組織マトリックスを含み得て、コラーゲン含有組織は、特異的にガラクトース - 1, 3 - ガラクトース部分を対象としないプロテアーゼを使用して、酵素的に処理されて、組織から実質的に全てのガラクトース - 1, 3 - ガラクトース部分が除去されている。いくつかの実施形態では、組織マトリックスは、 - ガラクトースを産生す

10

20

30

40

50

る非霊長類動物に由来して、組織マトリックスは、さらに処理されて、コラーゲン含有組織マトリックスから - ガラクトースが実質的にまたは完全に除去されている。

【 0 0 1 0 】

少なくとも1つのコラーゲン含有組織マトリックスは、細胞組織内に含有され得て、方法は、細胞組織を脱細胞化するステップをさらに含んでなり得る。いくつかの実施形態では、組織マトリックスは、完全に脱細胞化され；組織マトリックスは、無細胞マトリックスを含んでなり得る。

【 0 0 1 1 】

いくつかの実施形態では、タンパク質分解酵素は、少なくとも1つの組織マトリックスを損傷することなく、ガラクトース - 1 , 3 - ガラクトース部分を除去する。

10

【 0 0 1 2 】

いくつかの実施形態では、アッセイは、ガラクトース - 1 , 3 - ガラクトース部分を濃度測定するステップを含んでなる。アッセイは、組織化学的アッセイまたは免疫測定法を含んでなり得る。

【 0 0 1 3 】

プロテアーゼは、アルカラーゼおよびトリプシンの少なくとも1を含み得て、プロテアーゼは、約0.5時間から約24時間に及ぶ時間にわたり、約0.0001%から約0.1%に及ぶ濃度で使用される。プロテアーゼとしてはまた、プロメラインおよびディスパーゼの少なくとも1つも挙げられ、プロテアーゼは、約1時間から約24時間に及ぶ時間にわたり、約10単位/リットルから約200単位/リットルに及ぶ濃度で使用される。

20

【 0 0 1 4 】

少なくとも1つのコラーゲン含有組織マトリックスは、骨、皮膚、脂肪組織、真皮、腸管、膀胱、腱、靭帯、筋肉、筋膜、血管、神経性、血管、肝臓、心臓、肺、腎臓、および軟骨組織の少なくとも1つに由来する組織マトリックスを含んでなり得る。組織は、1つまたは複数の異なる動物または組織源から得られ得る。少なくとも1つのコラーゲン含有組織マトリックスは、ブタ無細胞皮膚組織マトリックスなどのブタ組織マトリックスであり得る。

【 0 0 1 5 】

方法は、哺乳類幹細胞をはじめとする哺乳類細胞などの組織製品に、1つまたは複数の生存能力があり組織適合性の細胞を添加するステップをさらに含んでなり得る。

30

【 0 0 1 6 】

いくつかの実施形態では、抗炎症剤、鎮痛剤、細胞成長因子、血管新生因子、分化因子、サイトカイン、ホルモン、およびケモカインから選択される少なくとも1つの追加的な要素が、組織製品に添加される。少なくとも1つの追加的な要素は、発現ベクター内に含有される核酸配列によってコードされ得て、それは生存能力があり組織適合性である、1つまたは複数の細胞内に含有されてもよい。

【 0 0 1 7 】

方法は、少なくとも1つのコラーゲン含有組織マトリックスを処理して、汚染微生物数を低下させるステップをさらに含んでなり得る。少なくとも1つのコラーゲン含有組織マトリックスを処理して、汚染微生物数を低下させるステップは、組織製品を照射するステップを含んでなり得る。

40

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 8 】

【 図 1 】 図 1 A は、実施例 1 の方法に従って、 - ガラクトシダーゼ処理なしの未処理ブタ無細胞真皮を用いた、 - g a l 部分の免疫組織化学染色の結果を図解する白黒線画である。図 1 B は、実施例 1 の方法に従って、 - ガラクトシダーゼ処理ありの未処理ブタ無細胞真皮を用いた、 - g a l 部分の免疫組織化学染色の結果を図解する白黒線画である。図 1 C は、実施例 1 の方法に従って、 - ガラクトシダーゼ処理なしのアルカラーゼ処理ブタ無細胞真皮を用いた、 - g a l 部分の免疫組織化学染色の結果を図解する白

50

黒画線画である。図1Dは、実施例1の方法に従って、 α -ガラクトシダーゼ処理ありのアルカラゼ処理ブタ無細胞真皮を用いた、 α -gal部分の免疫組織化学染色の結果を図解する白黒画線画である。図1Eは、実施例1の方法に従って、 α -ガラクトシダーゼ処理なしのプロメライン処理ブタ無細胞真皮を用いた、 α -gal部分の免疫組織化学染色の結果を図解する白黒画線画である。図1Fは、実施例1の方法に従って、 α -ガラクトシダーゼ処理ありのプロメライン処理ブタ無細胞真皮を用いた、 α -gal部分の免疫組織化学染色の結果を図解する白黒画線画である。図1Gは、実施例1の方法に従って、 α -ガラクトシダーゼ処理なしのトリプシン(trypsin)処理ブタ無細胞真皮を用いた、 α -gal部分の免疫組織化学染色の結果を図解する白黒画線画である。図1Hは、実施例1の方法に従って、 α -ガラクトシダーゼ処理ありのトリプシン(trypsin)処理ブタ無細胞真皮を用いた、 α -gal部分の免疫組織化学染色の結果を図解する白黒画線画である。

10

【図2】図2は、未処理対照としての無細胞皮膚マトリックス内に、そして様々な酵素で処置された無細胞皮膚マトリックス内に、残留する α -gal百分率の、阻害ELISA測定結果を例示する。

【発明を実施するための形態】

【0019】

ここで、本開示に従った特定の代表的実施形態を詳細に参照するが、その特定例は添付図面で例示される。

【0020】

20

本明細書で使用されるセクション見出しは、整理することのみを目的として、記載される対象を制限すると解釈されるものではない。特許、特許出願、論文、書籍、および専門書をはじめとするが、これに限定されるものではない本出願で言及される全ての文献、または文献の部分は、あらゆる目的のために、明示的にその内容全体を参照によって本明細書に援用する。参照によって援用する文献および特許または特許出願が、明細書に含まれる本発明と矛盾する限りでは、明細書があらゆる矛盾する情報に優先する。

【0021】

本出願では、単数形の使用は、特に断りのない限り複数形を含む。また本出願では、「または」の使用は、特に断りのない限り「および/または」を意味する。さらに、「含む(including)」という用語、ならびに「含む(includes)」および「含まれる(included)」などのその他の形態の使用は、制限的でない。本明細書に記載されるあらゆる範囲は、両端と、および両端の間の任意の値とを含むものと理解される。

30

【0022】

本明細書で開示されるのは、一部または全部の α -galエピトープを除去することで、ヒトまたは非ヒト霊長類に移植した際に、低下した免疫原性を有する組織製品を調製する方法である。様々なヒトまたはその他の動物組織および様々な方法を使用して、組織製品が調製され得る。例えば、組成物は、ブタ組織を選択し；任意選択的に組織を脱細胞化して、コラーゲン含有組織マトリックスを作成し；例えば、 α -gal部分の所望の量を除去するのに十分な時間および濃度で、組織をアルカラゼ、プロメライン、トリプシン、および/またはディスパーゼなどの1つまたは複数のプロテアーゼに曝露することで調製され得る。いくつかの実施形態では、プロテアーゼへの曝露に続いて、 α -gal部分の除去が、測定および/または確認され得る。特定の実施形態では、酵素は、 α -ガラクトシダーゼでない、すなわち、 α -ガラクトース切断に対して特異的でない酵素を含み得る。

40

【0023】

様々な実施形態で、組織製品は、無処理組織、部分的または完全に脱細胞化された組織マトリックス、および/または1つまたは複数の細胞が接種された脱細胞化組織を含んでなり得る。いくつかの実施形態では、 α -galエピトープの一部または全部の除去は、例えば、直接測定、およびプロテアーゼ処理組織製品のサンプル表面の α -gal濃度と

50

、未処理組織の濃度との比較によって確認され得る。いくつかの実施形態では、除去は、プロテアーゼ処理組織内の免疫および/または炎症応答と、未処理組織の応答との比較によって確認され得る。

【0024】

本明細書の用法では、「組織マトリックス」という用語は、天然に存在する組織に見られるコラーゲンおよびタンパク質網状組織の形状および配向と同様の形状および配向を有する、繊維の網状組織を形成する、三次元のコラーゲンおよびタンパク質構造を指す。天然に存在する組織からの細胞が除去されて、無細胞組織マトリックスが提供され得る。

【0025】

様々な実施形態に従って、本明細書で提供される材料と方法を使用して、生体適合性の移植片である組織製品（例えば生体適合性組織移植片）が製造され得る。本明細書の用法では、「生体適合性」移植片は、周囲組織から移植組織製品中への天然細胞の移動および増殖を支持する能力、および/または実質的免疫応答を誘発することなく移植される能力を有するものである。本明細書の用法では、「天然細胞」および「天然組織」という用語は、組織製品の移植に先だって、レシピエント臓器または組織内に存在する細胞または組織、または移植後に宿主動物によって産生される細胞または組織を意味する。生体適合性移植片は、組織再生、修復、治癒、または治療に必要な天然細胞活動を支持してもよく、このような細胞活動を妨げる実質的免疫応答を引き起こしてはならない。本明細書の用法では、「実質的免疫応答」は、部分的なまたは完全な組織再生、修復、治癒、または治療を妨げるものである。

【0026】

特定の実施形態では、本明細書で考察される方法に従って製造される組織製品が使用されて、（例えば、外傷、外科手術、萎縮症、および/または長期摩耗および変性などの）様々な疾患および/または構造障害のために、損傷を受けまたは欠失した天然組織が再生、修復、置換、回復、増強、強化、および/または治療され得る。特定の実施形態では、本開示の組成物はまた、美容の目的で使用され、天然組織の外観や感触が、修復または改変され得る。本明細書で考察される方法を使用して製造される組織製品は、低下した炎症性応答またはその他の応答を有し得て、したがって（例えば、組織製品上の - g a l などの異種エピトープに対する免疫応答に起因する）移植片拒絶反応の可能性を低下させてもよい。例えば、 - g a l 部分を実質的に含まない組織製品が組織移植片として使用され、それによって移植片に対する拒絶反応または炎症性免疫応答のリスクが低下され得る。

【0027】

- 1, 3 - ガラクトースエピトープの除去

様々な実施形態では、 - g a l エピトープは、所望の量の - g a l エピトープを除去するのに十分な濃度で十分な時間にわたり、組織製品をアルカラゼ、プロメライン、トリプシン、またはディスパーゼなどのプロテアーゼに曝露させることで、移植に先だって組織製品から除去され得る。いくつかの実施形態では、プロテアーゼ酵素は、組織の細胞外マトリックスに対する障害を最小化させながら、 - g a l を除去するその能力について選択される。いくつかの実施形態では、本明細書の方法を使用して、組織の細胞外マトリックスを損傷することなく、 - g a l が除去される。

【0028】

様々な実施形態では、酵素、酵素濃度、および処理時間もまた選択されて、その他の機械的または生物学的特性が制御される。例えば、酵素および処理条件が選択されて、同時係属の米国特許出願第 1 3 / 4 5 7 , 7 9 1 号明細書および米国特許出願第 1 4 / 0 1 9 , 2 7 4 号明細書に記載されるような、望ましい機械的または生物学的特性のある組織製品が製造されてもよい。

【0029】

様々な実施形態では、本明細書で開示される方法を使用して、組織製品が移植に続いて実質的免疫応答を誘発しないように、十分な量の - g a l 部分が除去され得る。いくつ

10

20

30

40

50

かの実施形態では、本明細書で開示される方法を使用して、組織製品上の実質的に全て（例えば、少なくとも約 95、96、97、98、99、99.5、99.9、または 99.99%、または 100%、またはその間の任意の百分率）の *-gal* エピトープが除去され得る。いくつかの実施形態では、組織製品が、移植に続いて、未処理組織の応答と比較して、炎症または免疫応答の少なくとも約 10、20、30、40、50、60、70、80、90、または 100%（またはその間の任意の百分率）の低下を有するように、十分な割合の *-gal* エピトープが除去される。いくつかの実施形態では、組織製品が、未処理組織の応答と比較して、炎症または免疫応答の少なくとも約 2、3、4、5 倍以上の低下を有するように、*-gal* エピトープの十分な割合が除去される。

【0030】

本明細書で開示される組織製品は、*-gal* エピトープの除去に続いて移植に適する、動物（例えば、ブタまたはその他の非霊長類哺乳類）からの任意の組織を含んでなり得る。1つまたは複数の異なる動物からの組織が、組織製品中で使用され得る。組織は、数ある組織源中で、例えば、筋膜、心膜組織、硬膜、脂肪組織、臍帯組織、胎盤組織、心臓弁組織、靭帯組織、腱組織、動脈組織、静脈組織、神経結合組織、膀胱組織、尿管組織、皮膚、皮膚組織、心臓組織、肺組織、肝臓組織、および腸管組織の1つまたは複数であり得る。いくつかの実施形態では、組織が、脱細胞化前に天然組織に見られる細胞外マトリックススキャフォールドの少なくとも一部を保持しさえすれば、組織は、無細胞組織、部分的脱細胞化組織、および/または外来性細胞で再生息された脱細胞化組織であり得る。脱細胞化組織が使用される場合、それは、*-gal* エピトープ除去処理の前、それと同時、後に脱細胞化処理され得る。

【0031】

いくつかの実施形態では、組織製品中の組織は、ドナー組織源から採取することで提供される。いくつかの実施形態では、採取組織は、宿主部位への組織製品移植後に、周囲の天然組織からの細胞が、その中で移動および増殖し得る、多孔性細胞外スキャフォールド構造を提供する。いくつかの実施形態では、組織は、部分的にまたは完全に脱細胞化される。代案としては、任意のその他の適切な脱細胞化組織マトリックスを使用してもよい。例えば、数種の生物学的スキャフォールド材料が、Badylak et al. によって記載され、本開示の方法を使用して、これらの材料のいずれか、または任意のその他の類似材料を使用して、組織製品が製造され得る。その内容全体を参照によって本明細書に

【0032】

様々な実施形態では、*-gal* エピトープは、所望の割合のエピトープを除去するのに十分な時間にわたり十分な濃度で、アルカラーゼ、プロメライン、トリプシン、またはディスパーゼなどのプロテアーゼ酵素への曝露によって、組織製品中の組織から除去され得る。例えば、組織サンプルは、約 0.0001% から約 0.1%（例えば、約 0.0001、0.0002、0.0003、0.0004、0.0005、0.0006、0.0007、0.0008、0.0009、0.001、0.005、0.01、0.05、または 0.1%、またはその間のあらゆる百分率）に及ぶアルカラーゼおよび/またはトリプシン濃度に曝露させ得る。いくつかの実施形態では、組織は、約 0.5 時間から約 24 時間（例えば、約 0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、6、7、8、9、10、15、20、または 24 時間、またはその間の任意の時間）に及ぶ時間にわたり、約 0.0001% ~ 約 0.1% のアルカラーゼおよび/またはトリプシンに曝露させ得る。いくつかの実施形態では、より高い濃度の酵素がより短いインキュベーション時間と対にされ、またはより低い濃度がより長いインキュベーション時間と対にされる。いくつかの実施形態では、アルカラーゼおよび/またはトリプシンへの曝露は、約 15 から 40 に及ぶ温度で起こり得る。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 3 】

別の実施例では、組織サンプルは、約 1 0 単位 / リットルから約 2 0 0 単位 / リットル（例えば、約 1 0、1 5、2 0、2 5、5 0、7 5、1 0 0、1 2 5、1 5 0、1 7 5、または 2 0 0 単位 / リットル、またはその間の任意の濃度）に及ぶ濃度で、プロメラインおよび / またはディスパーゼに曝露させ得る。いくつかの実施形態では、組織は、約 1 時間から約 2 4 時間（例えば、約 1、1 . 5、2、2 . 5、3、3 . 5、4、4 . 5、6、7、8、9、1 0、1 5、2 0、または 2 4 時間、またはその間の任意の時間）に及ぶ時間にわたり、約 1 0 単位 / リットルから約 2 0 0 単位 / リットルのプロメラインおよび / またはディスパーゼに曝露させ得る。いくつかの実施形態では、より高い濃度の酵素がより短い培養時間と対にされ、より低い濃度がより長い培養時間と対にされる。いくつかの実施形態では、プロメラインおよび / またはディスパーゼへの曝露は、約 1 5 から 4 0 に及ぶ温度で起こり得る。

10

【 0 0 3 4 】

様々な実施形態では、組織をアルカラゼ、プロメライン、トリプシン、およびディスパーゼの 1 つまたは複数に曝露させることで、*-gal* エピトープを除去する利点は、これらの酵素がまた、例えば、所望の可撓度および / または柔軟度を示す組織を提供するなど、組織の機械的特性を改変するのに役立つことである（異種移植片によって置き換えられた天然ヒト組織の柔軟性および可撓性など）。したがってこれらの酵素の使用は、そのように所望されれば（*is so desired*）、*-gal* を除去して、組織製品の機械的特性を改変させる、別々の処理ステップに対する必要性を回避し、または低下させてもよい。これは、組織製品調製の処理時間を短縮し、および / または処理および後続の洗浄手順における、組織障害リスクを低減してもよい。いくつかの実施形態では、アルカラゼ、プロメライン、トリプシン、および / またはディスパーゼの 1 つまたは複数への曝露の濃度および / または持続期間は、*-gal* エピトープが実質的に除去されて、所望の可撓度および / または柔軟度を有する組織製品が生成されるように選択される。

20

【 0 0 3 5 】

特定の実施形態では、アルカラゼ、プロメライン、トリプシン、および / またはディスパーゼの 1 つまたは複数に曝露された組織は、1 つまたは複数の追加的な酵素的または化学的処理に曝露されて、*-gal* エピトープまたは例えば、常態ではレシピエント動物によって発現されず、したがって移植組織製品の免疫応答および / または拒絶反応につながる可能性がある、その他の抗原などのその他の有害な抗原がさらに除去され得る。例えば、特定の実施形態では、組織が *-*ガラクトシダーゼによって処理されて、*-*ガラクトース（*-gal*）部分がさらに除去され得る。その他の実施形態では、十分な抗原の除去が達成されれば、任意の適切な *-*ガラクトシダーゼ濃度および緩衝液が使用され得る。さらに、組織を処理して、*-*1, 3 - ガラクトース部分を低下させまたは除去する特定の代表的な方法が、その内容全体を参照によって本明細書に援用する、*Xu et al., Tissue Engineering, Vol. 15, 1-13 (2009)* に記載される。

30

【 0 0 3 6 】

処理された組織内の *-gal* の存在または不在は、いくつかの方法で評価され得る。例えば、様々な実施形態では、免疫組織化学染色法、または E L I S A アッセイなどの免疫測定法が使用され得る。このような染色は、例えば、抗体特異的 *-gal* を組織サンプルに結合させるステップと、（例えば、1 つまたは複数の追加的な抗体を使用して、酵素を抗体に結合させることで）レポーター分子の形成を引き起こすステップとを含み得る。

40

【 0 0 3 7 】

脱細胞化組織製品

様々な実施形態では、組織製品は、組織をアルカラゼ、プロメライン、トリプシン、および / またはディスパーゼなどの 1 つまたは複数のプロテアーゼ酵素に曝露させること

50

で、 α -gal エピトープが除去された、 α -gal エピトープを発現する非霊長類哺乳類からの無処理または脱細胞化組織を含んでなり得る。いくつかの実施形態では、組織は、部分的にまたは完全に脱細胞化され得るが、移植組織製品周囲の組織から天然細胞がその中に移動して増殖し得る、細胞外マトリックスの少なくともいくつかの構成要素を保持し、それによって天然組織の修復、再生、治癒、または治療の速度または全体的なレベルを高める。脱細胞化は、組織をアルカラーゼ、プロメライン、トリプシン、および/またはディスパーゼなどの1つまたは複数のプロテアーゼ酵素に曝露する前に、それと同時に、および/または後に行い得る。一実施形態では、脱細胞化は、1つまたは複数のプロテアーゼへの曝露後に実施される。

【0038】

いくつかの実施形態では、組織製品は、脱細胞化および引き続き移植に適する任意の組織に由来し得る。代表的組織としては、骨、皮膚、脂肪組織、真皮、腸管、膀胱、腱、靭帯、筋肉、筋膜、神経性組織、容器、肝臓、心臓、肺、腎臓、軟骨、および/または任意のその他の適切な組織が挙げられるが、これに限定されるものではない。特定の実施形態では、組織製品は、脱細胞化軟部組織を含み得る。例えば、組織製品は、部分的にまたは完全に脱細胞化された真皮を含み得る。その他の実施形態では、組織製品は、部分的にまたは完全に脱細胞化された小腸粘膜下組織を含んでなり得る。

【0039】

組織を脱細胞化する代表的方法は、その内容全体を参照によって本明細書に援用する、米国特許第6,933,326号明細書および米国特許出願第2010/0272782号明細書で開示される。様々な実施形態では、部分的にまたは完全に脱細胞化された組織マトリックスの製造に伴う一般的ステップは、ドナー源から組織を採取するステップと、生物学および構造的機能を維持する条件下で、細胞を除去するステップとを含む。特定の実施形態では、採取組織が洗浄されて、あらゆる残留抗凍結剤および/またはその他の汚染物質が除去され得る。洗浄に使用される溶液は、任意の生理学的適合性溶液であり得る。適切な洗浄溶液の例としては、蒸留水、リン酸緩衝食塩水(PBS)、または任意のその他の生体適合性食塩水が挙げられる。

【0040】

特定の実施形態では、脱細胞化工程は、細胞除去の前に、その最中に、または後に、生化学的および構造的劣化を避けるように、採取組織を安定化する化学的処理を含む。様々な実施形態では、安定化溶液は、浸透圧、低酸素性、自己分解、および/またはタンパク質分解を停止させて妨げ；微生物汚染を防ぎ；および/または例えば、平滑筋構成要素(例えば血管)を含有する組織の脱細胞化中に起こり得る、機械的障害を低下させる。安定化溶液は、適切な緩衝液、1つまたは複数の抗酸化剤、1つまたは複数の膨張剤、1つまたは複数の抗生物質、1つまたは複数のプロテアーゼ阻害剤、および/または1つまたは複数の平滑筋弛緩薬を含有してもよい。

【0041】

様々な実施形態では、次に、組織を脱細胞化溶液に入れて、細胞外マトリックスの生物学および/または構造的完全性を損傷することなく、細胞外マトリックスから、一部または全部の生存細胞(例えば、上皮細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、および線維芽細胞など)を除去する。脱細胞化溶液は、適切な緩衝液、塩、抗生物質、1つまたは複数の洗剤(例えば、TRITON X-100(商標)、ドデシル硫酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウム、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノ-オレアートなど)、1つまたは複数の架橋防止剤、1つまたは複数のプロテアーゼ阻害剤、および/または1つまたは複数の酵素を含有してもよい。

【0042】

特定の実施形態では、脱細胞化は、常態ではそれに組織製品が由来する組織内に存在する、全ての細胞を完全にまたは実質的に除去する。本明細書の用法では、「全ての細胞を実質的に含まない」とは、脱細胞化に先だって、常態では組織の無細胞マトリックス内で増殖する細胞の20%、10%、5%、1%、0.1%、0.01%、0.001%、ま

10

20

30

40

50

たは0.0001%（またはその間の任意の百分率）未満を含有する組織製品を意味する。

【0043】

本明細書で開示されるような組織製品は、無細胞組織マトリックスを有する部分的にまたは完全に脱細胞化された組織、および/または脱細胞化されていない無処理組織を含んでなる、1つまたは複数の要素を含んでなり得る。一実施形態では、組織製品は、無細胞皮膚組織マトリックスを有する要素を含んでなる。特定の実施形態では、脱細胞化組織は、筋膜、心膜組織、硬膜、臍帯組織、胎盤組織、心臓弁組織、靭帯組織、腱組織、動脈組織、静脈組織、神経結合組織、膀胱組織、尿管組織、皮膚、皮膚組織、心臓組織、肺組織、肝臓組織、および腸管組織の1つまたは複数から選択される。

10

【0044】

特定の実施形態では、組織製品中の組織の脱細胞化後、無細胞組織マトリックス内に、任意選択的に、組織適合性/生存細胞が接種されてもよい。いくつかの実施形態では、組織適合性生存細胞は、移植に先だって標準生体外細胞共培養技術によって、または移植に続いて生体内再増殖によって、マトリックスに添加されてもよい。生体内再増殖は、周囲組織から組織マトリックス内に天然細胞が移動することで、またはレシピエントからまたは別のドナーから得られた組織適合性細胞を組織マトリックスを原位置注入または注射することで、起こり得る。胚性幹細胞および/または成体幹細胞などの幹細胞をはじめとする、様々な細胞型が使用され得る。それらが移植される患者に対して組織適合性である任意のその他の生存細胞もまた、使用され得る。いくつかの実施形態では、組織適合性細胞は、哺乳類細胞である。このような細胞は、天然組織の移動、増殖、および/または血管新生を促進し得る。特定の実施形態では、細胞は、移植の直前にまたは後に、組織マトリックスに直接装入され得る。

20

【0045】

いくつかの実施形態では、組織製品を処理して、汚染微生物数を低下させ得る（すなわち、組織上で成長する微生物数を低下させ得る）。いくつかの実施形態では、組織製品は、それが実質的に全ての汚染微生物数を欠くように（すなわち、組織製品が無菌または絶対無菌であるように）処理される。本明細書の用法では、「実質的に全ての汚染微生物数」とは、組織製品上で成長する微生物濃度が、汚染微生物数処理に先立つその成長の1%、0.1%、0.01%、0.001%、または0.0001%未満、またはその間の任意の百分率であることを意味する。適切な汚染微生物数低減法は、当業者に知られており、組織製品を放射線に曝露させるステップを含んでもよい。照射は、汚染微生物数を低下させ、または実質的に排除してもよい。照射の適切な形態は、線照射、eビーム照射、およびX線照射を含み得る。その他の照射方法は、その開示全体を参照によって本明細書に援用する、米国特許出願第2010/0272782号明細書に記載される。

30

【0046】

いくつかの実施形態では、1つまたは複数の追加的な薬剤が、組織製品に添加され得る。いくつかの実施形態では、追加的な薬剤は、抗炎症剤、鎮痛剤、または任意のその他の所望の治療薬または有益な薬剤を含んでなり得る。特定の実施形態では、追加的な薬剤は、少なくとも1つの追加的な増殖またはシグナル伝達因子（例えば、細胞増殖因子、血管新生因子、分化因子、サイトカイン、ホルモン、および/またはケモカインなど）を含んでなり得る。これらの追加的な薬剤は、天然組織の移動、増殖、および/または血管新生を促進し得る。いくつかの実施形態では、増殖またはシグナル伝達因子は、発現ベクター内に含有される核酸配列によってコードされる。好ましくは、発現ベクターは、任意選択的に組織製品に添加され得る、1つまたは複数の生存細胞内にある。本明細書の用法では、「発現ベクター」という用語は、細胞に取り込まれる能力があり、所望のタンパク質をコードする核酸配列を含有し、その他の必要な核酸配列（例えばプロモーター、エンハンサー、終止コドンなど）を含有して、細胞による少なくとも最低の所望タンパク質の発現を確実にする、任意の核酸コンストラクトを指す。

40

【0047】

50

上述の組織製品は、パッケージされ、冷凍、凍結乾燥、および/または脱水されて提供されてもよい。特定の実施形態では、パッケージされた組織製品は、絶対無菌である。例えば、キットは、水和、冷凍、凍結乾燥、および/または脱水組織製品と、組織製品の調製および/または使用のための取扱説明書とを含んでなり得る。

【実施例】

【0048】

以下の実施例は、例証のみを目的として、本開示をどのようにも制限するものではない。

【0049】

pADMの酵素処理

屠殺場からブタ皮膚が収集され、表皮および皮下脂肪を物理的に除去することで、開裂された。残る皮膚組織は、抗生物質溶液を使用して汚染除去された。汚染除去に続いて、組織は無菌条件下で処理された。

【0050】

皮膚組織は、特定の時間にわたり、酵素（プロメライン、アルカラーゼ、またはトリプシン）の1つによって処理された。アルカラーゼおよびトリプシンの双方で、使用された濃度は、0.1%~0.00039%の範囲であり、使用された処理時間は、1時間から一晩の範囲であった（恐らくは16~18時間）。使用された温度は、室温および37であった。プロメラインでは、使用された濃度は25単位/リットル~200単位/リットルの範囲であり、使用された処理は6時間から一晩の範囲であった（恐らくは16~18時間）。使用された温度は、室温および37であった。3つの酵素（アルカラーゼ、プロメライン、およびトリプシン）のそれぞれは、より低い濃度および/またはより短い処理時間でも、恐らくはなおも機能するであろうが、これらは未だに試験されていない。概して、濃度が低いほど、酵素が組織効果を及ぼすために、処理時間はより長くなくてはならない。37における処理もまた、より低い濃度および/またはより短い処理時間が使用され得るように、酵素処理の速度および/または活性を促進してもよい。

【0051】

次に組織は、洗剤で脱細胞化されて、生存細胞が除去され、細胞残骸および残留化学薬品は、PBS中の洗浄によって除去された。得られたブタ無細胞皮膚マトリックス（pADM）は、使用時まで周囲温度で保存された。

【0052】

- Gal検出手順

- galの存在は、一連の抗体および比色分析（colorimetric）検出試薬を使用して検出され得る。組織は、最初にスクロース溶液中で保存され、次に包埋剤（OCT）中に包埋されて、液体窒素中で凍結された。組織を含有する凍結ブロックは、次に、クリオスタットミクロトームを使用して薄い（ミクロン）切片に切断されて、顕微鏡スライド上に配置された。組織を含有するスライドは、非特異的結合を妨げる溶液でブロックされ、次に、-gal残基に特異的に結合するビオチン化抗体である一次抗体と共に、インキュベートされた。第1の抗体が洗い落とされた後、第2の抗体（西洋ワサビペルオキシダーゼ共役ストレプトアビジン）が、スライドに添加された。第2の抗体中のストレプトアビジンは、一次抗体中のビオチンと結合する。インキュベーション時間後、第2の抗体もまた洗い落とされて、その後、検出試薬（DAB）がスライドに添加された。DABは、西洋ワサビペルオキシダーゼの存在下で、スライド上に褐色色素を沈着させた。

【0053】

図1A~1Hは、以下の-gal部分の免疫組織化学染色を代表する白黒線画を含む：実施例1の方法に従った、未処理ブタ無細胞真皮（-galを除去する酵素の使用なし）（図1A）、それぞれ-galラクトシダーゼ処理ありまたはなしの、プロメライン処理（図1E~1F）、アルカラー処理（図1C~D）、およびトリプシン（trypsin）処理（図1G~H）ブタ無細胞真皮サンプル。示されるように、プロメライン、トリプシン、およびアルカラーゼ処理されたサンプルは、-gal部分の染色を示さない

10

20

30

40

50

。

【 0 0 5 4 】

阻害 E L I S A 定量分析

- G a l 含有量の定量的評価は、阻害 E L I S A アッセイを使用して判定された。様々な無細胞皮膚マトリックス (A D M) は、刻まれて、抗 - G a l 抗体と共にインキュベートされた。インキュベーション時間後、あらゆる非結合抗体を含有する上清は、- G a l 被覆 9 6 ウェルプレートに移された。引き続いてウェルプレートと結合する、上清中に存在する非結合抗体の量は、アルカリホスファターゼ共役二次抗体と、それに続く p - ニトロフェニルリン酸塩検出基質を使用して検出された。

【 0 0 5 5 】

高レベルの - G a l を含有する A D M は、全部ではないが、大部分の抗 - G a l 抗体を捕捉して、上清中には非常にわずかのみが残され、したがってウェルプレート上の読み取りは低かった。対照的に、低レベルの - G a l を含有する A D M は、存在する場合、低レベルの抗 - G a l 抗体のみを捕捉して、大部分の抗体は上清中に残される。したがって、これらのサンプルからの上清は、ウェルプレート上で非常に高い読み取りを生じた。

【 0 0 5 6 】

ウェルプレート読み取りは、陽性および陰性対照の双方について正規化された。 - G a l は、ヒト組織内には存在しないが、ブタ組織内には存在するので、ガラクトシダーゼ処理なしのヒト無細胞皮膚マトリックス (h A D M) およびブタ無細胞皮膚マトリックス (p A D M) が、それぞれ陰性対照および陽性対照として使用された。 - ガラクトシダーゼによる p A D M の処理は、 - G a l 含有量を未処理 p A D M のほぼ 3 0 % に低下させた。 - ガラクトシダーゼ不在下の p A D M 酵素 (アルカラゼまたはトリプシン) 処理は、 - G a l 含有量を - ガラクトシダーゼ処理と同等に、またはより低いレベルに低下させた (図 3) 。

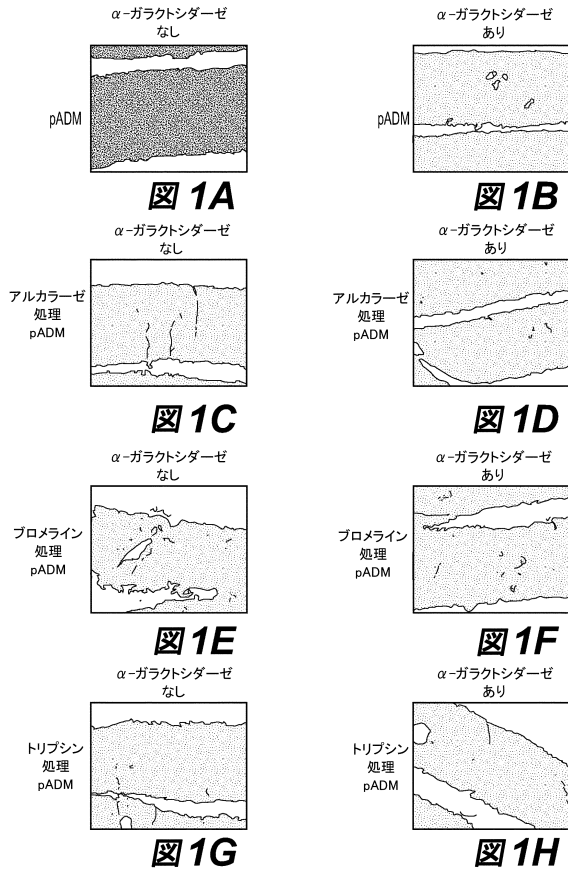
【 0 0 5 7 】

先行する実施例は、例証のみを意図し、本開示をどのようにも制限するものではない。開示される装置および方法のその他の実施形態は、本明細書で開示される装置および方法の仕様および実施の検討から、当業者には明らかであろう。

10

20

【 図 1 】



【 図 2 】

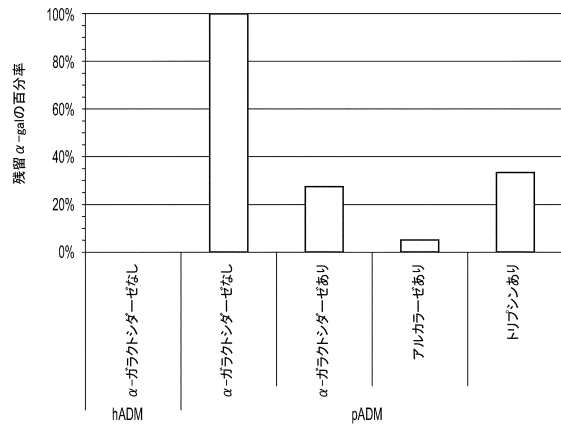


図 2

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	
A 6 1 K 35/34	(2015.01)	A 6 1 K	35/34
A 6 1 K 35/44	(2015.01)	A 6 1 K	35/44
A 6 1 K 35/30	(2015.01)	A 6 1 K	35/30
A 6 1 K 35/407	(2015.01)	A 6 1 K	35/407
A 6 1 K 35/42	(2015.01)	A 6 1 K	35/42
A 6 1 K 35/22	(2015.01)	A 6 1 K	35/22
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	A 6 1 L	27/36 1 1 0
G 0 1 N 33/48	(2006.01)	A 6 1 L	27/36 1 2 0
		A 6 1 L	27/36 4 0 0
		A 6 1 L	27/36 4 1 0
		G 0 1 N	33/53 V
		G 0 1 N	33/53 Y
		G 0 1 N	33/48 P
		G 0 1 N	33/48 A

- (72)発明者 ホワン, リ ティン
 アメリカ合衆国 ニュージャージー州 0 8 8 5 3, ブランチバーグ, オリーヴストリート 4 0
 5 ビー
- (72)発明者 ワン, ホア
 アメリカ合衆国 ニュージャージー州 0 8 5 4 0, プリンストン, ペニーロイヤルコート 5
- (72)発明者 オーウェンス, リック
 アメリカ合衆国 ニュージャージー州 0 8 8 8 6, スチュワーツヴィレ, モンロードライヴ 1
 1 2 7
- (72)発明者 バハラハ, ナサニエル
 アメリカ合衆国 ニュージャージー州 0 7 0 1 2, クリフトン, ルマープレイス 1 7

審査官 鈴木 理文

- (56)参考文献 特表2002-536109(JP, A)
 国際公開第2012/149253(WO, A1)
 米国特許出願公開第2013/0236439(US, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 3 5 / 1 2
 A 6 1 K 3 5 / 2 2
 A 6 1 K 3 5 / 3 0
 A 6 1 K 3 5 / 3 2
 A 6 1 K 3 5 / 3 4
 A 6 1 K 3 5 / 3 6
 A 6 1 K 3 5 / 3 8
 A 6 1 K 3 5 / 4 0 7
 A 6 1 K 3 5 / 4 2
 A 6 1 K 3 5 / 4 4
 A 6 1 L 2 7 / 3 6
 G 0 1 N 3 3 / 4 8
 G 0 1 N 3 3 / 5 3
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

专利名称(译)	去除α-半乳糖的方法		
公开(公告)号	JP6524597B2	公开(公告)日	2019-06-05
申请号	JP2016527404	申请日	2014-11-04
[标]申请(专利权)人(译)	生命细胞公司		
申请(专利权)人(译)	的LifeCell公司		
当前申请(专利权)人(译)	的LifeCell公司		
[标]发明人	クホイ ホワンリテイ ワンホア オーウェンスリック バハラハナサニエル		
发明人	ク,ホイ ホワン,リ ティン ワン,ホア オーウェンス,リック バハラハ,ナサニエル		
IPC分类号	A61K35/12 A61L27/36 A61K35/32 A61K35/36 A61K35/38 A61K35/34 A61K35/44 A61K35/30 A61K35/407 A61K35/42 A61K35/22 G01N33/53 G01N33/48		
CPC分类号	A61L27/3687 A61L27/3695 A61L2430/40 A61L27/24 A61L27/54 A61L27/58 A61L2300/412 A61L2430/34 G01N33/573		
FI分类号	A61K35/12 A61L27/36.100 A61K35/32 A61K35/36 A61K35/38 A61K35/34 A61K35/44 A61K35/30 A61K35/407 A61K35/42 A61K35/22 A61L27/36.110 A61L27/36.120 A61L27/36.400 A61L27/36.410 G01N33/53.V G01N33/53.Y G01N33/48.P G01N33/48.A		
优先权	61/899647 2013-11-04 US		
其他公开文献	JP2016536315A JP2016536315A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了缺乏所需比例的免疫原性表位的组织产品，例如半乳糖α-1,3半乳糖表位。还提供了制造和使用薄纸产品的方法。【选择图表】无

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 特 許 公 報 (B2)	(11) 特許番号 特許第6524597号 (P6524597)
(45) 発行日 令和1年6月5日 (2019. 6. 5)	(24) 登録日 令和1年5月17日 (2019. 5. 17)	
(51) Int. Cl. A 6 1 K 3 5 / 1 2 (2 0 1 5 . 0 1) A 6 1 L 2 7 / 3 6 (2 0 0 6 . 0 1) A 6 1 K 3 5 / 3 2 (2 0 1 5 . 0 1) A 6 1 K 3 5 / 3 6 (2 0 1 5 . 0 1) A 6 1 K 3 5 / 3 8 (2 0 1 5 . 0 1)	F 1 A 6 1 K 3 5 / 1 2 A 6 1 L 2 7 / 3 6 A 6 1 K 3 5 / 3 2 A 6 1 K 3 5 / 3 6 A 6 1 K 3 5 / 3 8	1 0 0
請求項の数 16 (全 15 頁) 最終頁に続く		
(21) 出願番号 (86) (22) 出願日 (65) 公表番号 (43) 公表日 (86) 国際出願番号 (87) 国際公開番号 (87) 国際公開日 審査請求日 (31) 優先権主張番号 (32) 優先日 (33) 優先権主張国	特願2016-527404 (P2016-527404) 平成26年11月4日 (2014. 11. 4) 特表2016-536315 (P2016-536315A) 平成28年11月24日 (2016. 11. 24) PCT/US2014/063796 W02015/066668 平成27年5月7日 (2015. 5. 7) 平成29年11月1日 (2017. 11. 1) 61/899, 647 平成25年11月4日 (2013. 11. 4) 米国 (US)	(73) 特許権者 504154148 ライフセル コーポレーション LifeCell Corporation アメリカ合衆国 ニュージャージー州 07940 マディソン ヒルズ ファーム 5 (74) 代理人 110001302 特許業務法人北青山インターナショナル ク, ホイ アメリカ合衆国 ニュージャージー州 08536, プレインスボロ, デイジー コート IO 最終頁に続く
(54) 【発明の名称】 α-ガラクトースを除去する方法		