【公報種別】特許法第１７条の２の規定による補正の掲載
【部門区分】第６部門第１区分
【発行日】令和3年7月26日(2021.7.26)

【公表番号】特表2020-522721(P2020-522721A)
【公表日】令和2年7月30日(2020.7.30)
【年通号数】公開・登録公報2020-030
【出願番号】特願2020-518127(P2020-518127)
【国際特許分類】
Ｇ０１Ｎ　1/30　(2006.01)
Ｇ０１Ｎ　33/48　(2006.01)
Ｇ０１Ｎ　33/53　(2006.01)
【ＦＩ】
Ｇ０１Ｎ　1/30
Ｇ０１Ｎ　33/48　Ｐ
Ｇ０１Ｎ　33/53　Ｙ

【手続補正書】
【提出日】令和3年5月14日(2021.5.14)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
蛍光顕微鏡用の動物組織を調製する方法であって、前記方法が、以下の工程:
a)脱灰用溶液で固定動物組織を任意選択で脱灰する工程と、
b)ヘム除去用溶液で前記固定動物組織を任意選択で脱色する工程と、
c)前記固定動物組織における標的分子を、前記標的分子に結合することが可能な蛍光色素含有標識剤を含む標識溶液で標識して、前記蛍光色素含有標識剤で標識された固定動物組織を取得する工程であって、前記標識剤が、100kDa以下の分子量を有し、
前記固定動物組織が、工程c)における前記標的分子の前記標識の前に透過処理溶液で処理され、前記透過処理溶液及び前記標識溶液が、異なる溶液であるか、
又は、前記固定動物組織が、工程c)における前記標的分子の前記標識の間に透過処理溶液で処理され、前記透過処理溶液及び前記標識溶液が、同一の溶液である、工程と、
d)前記蛍光色素含有標識剤で標識された前記固定動物組織を、有機溶媒を含む透明化溶液で透明化して、蛍光顕微鏡用の前記動物組織を取得する工程と
を含む、方法。
【請求項２】
(i)前記方法が、工程a)を含む;
(ii)工程a)において、前記脱灰用溶液が、EDTA及び$NaHCO_3$を含む溶液、ギ酸を含む溶液、HNO_3を含む溶液、若しくはHClを含む溶液から選択される;
(iii)前記固定動物組織が、4wt%のパラホルムアルデヒド及び任意選択でヘパリンを含む固定溶液によって固定することにより取得可能である;
(iv)前記方法が、工程b)を含む;
(v)工程b)が、前記固定動物組織に、前記ヘム除去用溶液を灌流させることにより実施される;
(vi)前記ヘム除去用溶液が、ヘムキレート溶液である;
(vii)工程b)において、前記ヘム除去用溶液が、ヘムの除去に適するアミノアルコール及

び任意選択で界面活性剤を含む；並びに/又は
(viii)前記ヘム除去用溶液が、界面活性剤を含み、前記界面活性剤が、イオン性界面活性剤、好ましくはドデシル硫酸ナトリウム若しくはデオキシコレート、非イオン性界面活性剤、好ましくは4-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェニル-ポリエチレングリコール、t-オクチルフェノキシポリエトキシエタノール、ポリエチレングリコールtert-オクチルフェニルエーテル若しくはポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート、双性イオン性界面活性剤、好ましくは3-[(3-コールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホネート水和物、カオトロピック界面活性剤、好ましくは尿素、若しくはこれらの組合せである、
請求項1に記載の方法。
【請求項３】
前記アミノアルコールが、N,N,N',N'-テトラキス(2-ヒドロキシプロピル)エチレンジアミン、N-ブチルジエタノールアミン、N-メチルジエタノールアミン、4-(2-ヒドロキシエチル)モルホリン、N-エチルジエタノールアミン、2-(ジイソプロピルアミノ)エタノール、4-メチルモルホリンN-オキシド又は1-(2-ヒドロキシエチル)ピペリジンであり、好ましくは、前記ヘム除去用溶液が、好ましくは0.1MのPBS中における、以下の試薬：25wt%の尿素、25wt%のN,N,N',N'-テトラキス(2-ヒドロキシプロピル)エチレンジアミン、0.1MのPBS中の15wt%のトリトンX-100、の1:2又は1:3希釈物である、請求項2に記載の方法。
【請求項４】
(i)工程b)において、前記ヘム除去用溶液が、ヘムを酸化するための酸化試薬を含み、好ましくは、ヘムを酸化するための前記酸化試薬が、過酸化ベンジル、3-クロロペルオキシ安息香酸若しくはモノペルオキシフタル酸マグネシウム六水和物から選択される；
(ii)前記蛍光色素含有標識剤が、60kDa以下、50kDa以下、40kDa以下、30kDa以下、若しくは20kDa以下の分子量を有する；
(iii)前記蛍光色素が、赤外若しくは赤色蛍光を発することが可能である；
(iv)前記蛍光色素が、近赤外若しくは遠赤色蛍光を発することが可能である；
(v)前記蛍光色素の最大発光が、480nmよりも大きい、500nmよりも大きい、550nmよりも大きい、590nmよりも大きい、600nmよりも大きい、640nmよりも大きい、若しくは700nmよりも大きい波長で生じる、若しくは、前記蛍光色素の最大発光が、640nm～700nmの波長範囲で生じる；
(vi)前記蛍光色素の最大発光が、1000nmよりも小さい、900nmよりも小さい、若しくは800nmよりも小さい波長で生じる；
(vii)前記蛍光色素含有標識剤が、前記蛍光色素と複合体形成した抗体断片であり、前記抗体断片が、前記標的分子に結合することが可能である；
(viii)前記蛍光色素含有標識剤が、前記蛍光色素と複合体形成したナノボディであり、前記ナノボディが、前記標的分子に結合することが可能である；
(ix)工程c)が、前記固定動物組織に、前記蛍光色素含有標識剤を含む前記標識溶液を灌流させることにより実施される；
(x)前記蛍光色素含有標識剤が、蛍光染料であり、前記蛍光染料が、前記標的分子に結合することが可能である；
(xi)前記蛍光色素含有標識剤が、蛍光染料であり、前記蛍光染料が、ニッスル、ヨウ化プロピジウム、メトキシ-x04、酢酸クレシルバイオレット、ピロニンY、チアジンレッド、レクチン、Dil、Atto染料、及びTo-pro3である；
(xii)前記有機溶媒が、前記動物の組織の屈折率から5%以下で偏向する屈折率を有する；
(xiii)前記有機溶媒を含む前記透明化溶液が、前記動物の組織の屈折率から2%以下で偏向する屈折率を有する；
(xiv)前記有機溶媒を含む前記透明化溶液が、1.500～1.600の屈折率、若しくは1.520～1.580の屈折率を有する；
(xv)前記有機溶媒が、ベンジルアルコール、安息香酸ベンジル、ジベンジルエーテル、エチル3-フェニル-2-プロペノエート、アリル3-フェニルアクリレート、PEG (Mn=200-1000)

、PEGDA (Mn=200-1000)、PEGMA (Mn=200-1000)、1-フェニルナフタレン及び/若しくはジフェニルエーテルを含む；
(xvi)前記有機溶媒を含む前記透明化溶液が、抗酸化剤を更に含み、好ましくは、前記抗酸化剤が、好ましくは前記透明化溶液中に0.4vol%の量で存在する、DL-アルファ-トコフェロールである；
(xvii)前記有機溶媒を含む前記透明化溶液が、4:8:3から10:20:3までの体積比のベンジルアルコール、安息香酸ベンジル及びジフェニルエーテル、並びに前記抗酸化剤からなり、好ましくは、前記抗酸化剤が、好ましくは前記透明化溶液中に0.4vol%の量で存在する、DL-アルファ-トコフェロールである；
(xviii)工程d)が、前記蛍光色素含有標識剤で標識された前記固定動物組織に、前記有機溶媒を含む前記透明化溶液を灌流させることにより実施され、好ましくは、
a)前記蛍光色素含有標識剤で標識された前記固定動物組織に、前記有機溶媒を含む前記透明化溶液を少なくとも6時間灌流させる；及び/若しくは
b)工程d)が、前記透明化溶液による灌流の前に、0vol%～100vol%のさらなる有機溶媒を含む脱水溶液の勾配を上昇させた灌流を更に含み、好ましくは、0vol%～100vol%の前記さらなる有機溶媒を含む脱水溶液の前記勾配を上昇させた前記灌流の後に、別の有機溶媒を含む脱脂溶液により灌流し、好ましくは、前記さらなる有機溶媒が、tert-ブタノール、テトラヒドロフラン(THF)、メタノール、エタノール若しくは1,4-ジオキサンであり、前記勾配を上昇させた前記灌流が、前記さらなる有機溶媒の融解温度を超える温度で実施される、及び/若しくは、前記別の有機溶媒が、ジクロロメタン(dichoromethane)、クロロホルム、メタノール、ヘキサン、ブタノール、酢酸エチル、tert-ブチルメチルエーテルであり、前記別の有機溶媒による前記灌流が、前記別の有機溶媒の融解温度を超える温度で実施される；
(xix)前記標識溶液及び前記透過処理溶液及び前記透明化溶液が、加圧することにより、好ましくはポンプで加圧することにより能動的に送達される；
(xx)前記標識溶液による前記標的分子の前記標識及び前記透過処理溶液による前記処理が、80mmHgよりも高い、好ましくは150mmHgよりも高い圧力で灌流することにより実施される；
(xxi)前記標識溶液による前記標的分子の前記標識及び前記透過処理溶液による前記処理が、220～240mmHgの圧力、好ましくは230mmHgの圧力で灌流することにより実施される；
(xxii)固定及び脱色した動物組織が、工程c)における前記標的分子の前記標識の前に透過処理溶液により処理され、前記透過処理溶液及び前記標識溶液が、異なる溶液であり、好ましくは、前記透過処理溶液が、xviii)b)に規定される脱水溶液若しくはxviii)b)に規定される脱脂溶液である、若しくは、前記透過処理溶液が、酢酸を含む、若しくは、前記透過処理溶液が、塩酸グアニジン及び/若しくは酢酸ナトリウムを含む；
(xxiii)前記固定動物組織が、工程c)における前記標的分子の前記標識の間に透過処理溶液で処理され、前記透過処理溶液及び前記標識溶液が、同一の溶液である；
(xxiv)工程b)が、80mmHgよりも高い、好ましくは150mmHgよりも高い圧力で、前記ヘム除去用溶液を前記固定動物組織に灌流させることにより実施される；並びに/又は
(xxv)工程b)が、220～240mmHgの圧力、好ましくは230mmHgの圧力で、前記ヘム除去用溶液を前記固定動物組織に灌流させることにより実施される、
請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５】
工程d)における灌流が、80mmHgよりも高い、好ましくは150mmHgよりも高い圧力で実施される、又は、工程d)における灌流が、220～240mmHgの圧力、好ましくは230mmHgの圧力で実施される、請求項4(xviii)～請求項4(xxv)のいずれか１つに記載の方法。
【請求項６】
(i)前記動物組織が、哺乳動物由来である；
(ii)前記動物組織が、非ヒト哺乳動物若しくはヒト由来である；
(iii)前記動物組織が、齧歯動物由来である；

(iv)前記動物組織が、マウス由来である；及び/又は
(v)前記動物組織が、マウス全体である、
請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７】
前記動物組織が、ブタ脳又はヒト脳である、請求項1～6(ii)のいずれか１つに記載の方法。
【請求項８】
前記動物組織が、器官全体又はその一部である、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法又は請求項4に記載の方法であって、前記請求項4に記載の方法は、(i)～(xx)のいずれか１つに記載の方法である、方法。
【請求項９】
(i)工程c)において前記標識剤で標識される前記標的分子が、前記固定動物組織の細胞に存在する構造、好ましくはタンパク質、脂質、DNA又はRNA、より好ましくは前記固定動物組織の細胞に存在するタンパク質である；
(ii)前記動物組織が、がんを含み、工程c)において前記標識剤で標識される前記標的分子が、前記がんの細胞に存在する構造、好ましくはタンパク質、脂質、DNA又はRNA、より好ましくは前記がんの細胞に存在するタンパク質である；
(iii)前記動物組織が、がん転移を含み、工程c)において前記標識剤で標識される前記標的分子が、前記がんの細胞に存在する構造、好ましくはタンパク質、脂質、DNA又はRNA、より好ましくは前記がんの細胞に存在するタンパク質である；
(iv)前記動物が、バイオ医薬で処理されており、前記動物組織が、前記バイオ医薬を含み、前記バイオ医薬が、工程c)において前記標識剤で標識される前記標的分子であるか、又は前記バイオ医薬が、in vitroでさらなる蛍光色素で標識されているか、又は前記バイオ医薬が、蛍光それ自体であり、好ましくは、前記バイオ医薬が、低分子、治療タンパク質、又は
治療抗体である；
(v)前記方法が、ヒト又は動物の体の手術又は療法による治療方法でもなく、ヒト又は動物の体に対して実施される診断方法でもない；
(vi)前記方法が、ex vivoでの方法である；
(vii)工程d)において取得される蛍光顕微鏡用の前記動物組織が、工程b)において使用される前記固定動物組織よりも体積が小さく、工程d)において取得される蛍光顕微鏡用の前記動物組織が、好ましくは、工程b)において使用される前記固定動物組織よりも体積が40%～75%小さい、請求項1～8のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０】
請求項1～9のいずれか一項に記載の蛍光顕微鏡用の動物組織を調製する方法により取得可能な動物組織であって、前記動物組織が、前記蛍光色素含有標識剤で標識される前記標的分子を含み、好ましくは、
(i)前記動物組織が、齧歯動物全体、好ましくはマウス全体である；
(ii)前記動物組織が、器官全体若しくはその一部、好ましくは哺乳動物器官全体である；又は
(iii)前記動物組織が、2×2×2cmのサイズの組織塊である、及び/又は
前記動物組織において、前記標的分子が、前記蛍光色素含有標識剤で標識され、すべての標的分子が、光シート蛍光顕微鏡により解析する場合、前記動物組織におけるその位置に無関係に単一セル解像度で検出可能である、動物組織。
【請求項１１】
請求項10に記載の動物組織の解析方法であって、前記解析方法が、請求項1～9のいずれか一項に記載の方法を含み、i)前記組織を蛍光顕微鏡により解析して、前記動物組織における前記蛍光色素の蛍光を検出する工程を更に含み、好ましくは、
(i)前記方法が、ii)前記蛍光色素の検出した蛍光を可視化して、前記動物組織の画像、好ましくは3次元画像を取得する工程を更に含み、前記画像が、好ましくは、前記動物組

織全体にわたって単一セル解像度を有する画像である；並びに/又は
(ii)前記動物組織が、20cm以下の厚さ、好ましくは10cm以下の厚さ、より好ましくは5cm以下の厚さである；
(iii)前記動物組織が、2cm以下の厚さであり、好ましくは1.5～2cmの厚さである；
(iv)前記蛍光顕微鏡が、光シート蛍光顕微鏡、落射蛍光顕微鏡、多光子顕微鏡及び共焦点蛍光顕微鏡からなる群から選択される；
(v)前記蛍光顕微鏡が、光シート蛍光顕微鏡である；並びに/又は
(vi)前記方法が、工程i)の後に、iii)目的の組織領域を切断する工程、iv)切断した目的の組織領域を再水和する工程、及びv)前記切断した目的の組織領域を更に解析する工程を更に含み、好ましくは、
(a)工程v)において、前記切断した目的の組織領域が、抗体に基づく免疫染色により、若しくは、好ましくはRNAseqによる遺伝子プロファイリングである、遺伝子プロファイリングにより、若しくは、好ましくは質量分析によるプロテオミクスである、プロテオミクスにより更に解析される；並びに/若しくは
(b)前記切断した目的の組織領域が、転移、好ましくは腫瘍細胞200個未満のサイズを有する転移、より好ましくは腫瘍細胞100個未満のサイズを有する転移、更により好ましくは腫瘍細胞75個未満のサイズを有する転移、更により好ましくは腫瘍細胞50個未満のサイズを有する転移、及び更により好ましくは腫瘍細胞25個未満のサイズを有する転移を含む、
解析方法。
【請求項１２】
転移の検出方法であって、前記方法が、請求項11に記載の動物組織の解析方法を含み、前記動物組織が、がん転移を含み、前記標識剤で標識される前記標的分子が、前記がんの細胞に存在する構造、好ましくはタンパク質であり、好ましくは、
前記転移の検出方法が、前記動物組織全体にわたって単一セル解像度で前記動物組織における転移を検出するための方法である、検出方法。
【請求項１３】
バイオ医薬の体内分布の解析方法であって、前記方法が、請求項11に記載の動物組織の解析方法を含み、前記動物が、請求項9(iv)に規定されたようにバイオ医薬で処理されており、前記動物組織が、前記バイオ医薬を含み、前記バイオ医薬が、前記標識剤で標識される前記標的分子であり、好ましくは、
(i)前記バイオ医薬が、治療タンパク質である；
(ii)前記バイオ医薬が、治療抗体である；又は
(iii)前記バイオ医薬が、ナノ粒子である、
解析方法。
【請求項１４】
ナノ粒子の体内分布の解析方法であって、前記方法が、請求項11に記載の動物組織の解析方法を含み、前記動物が、ナノ粒子で処理されており、前記動物組織が、前記ナノ粒子を含み、前記ナノ粒子が、前記標識剤で標識される前記標的分子であり、及び/又は蛍光色素複合体形成ナノ粒子若しくは蛍光それ自体であるナノ粒子から選択され、好ましくは、前記ナノ粒子が、薬物を担持するか又は薬物である、解析方法。
【請求項１５】
神経変性、神経炎症又は髄膜リンパ管の試験方法であって、前記方法が、請求項11に記載の動物組織の解析方法を含み、前記動物組織が、
(i)ニューロン（好ましくは、
(a)前記動物組織における前記ニューロンが、好ましくは蛍光タンパク質の発現により、蛍光標識されている；及び/又は
(b)神経変性の試験方法が、神経軸索の小疱形成の解析を含む）；
(ii)ニューロン（好ましくは、
(a)前記動物組織における免疫細胞が、好ましくは蛍光タンパク質の発現により、蛍

光標識されている；並びに/又は
(b)神経炎症の試験方法が、蛍光標識した免疫細胞のシグナル強度及び/若しくは細胞数を解析することにより免疫細胞の活性化を試験することを含む）；
(iii)インタクトなマウスの頭部（好ましくは、
(a)前記髄膜リンパ管が、好ましくはマーカータンパク質により若しくはオボアルブミンのようなトレーサーにより、蛍光標識される；及び/又は
(b)前記髄膜リンパ管が、前記標的分子を含む）
を含む、試験方法。