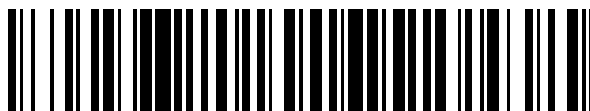


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 549 170**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/53** (2006.01)

**G01N 1/28** (2006.01)

**G01N 33/48** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.02.2011** **E 11739816 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.08.2015** **EP 2533049**

54 Título: **Solución de pretratamiento para la tinción inmunohistoquímica y solución condensada de la misma**

30 Prioridad:

**05.02.2010 JP 2010024784**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**23.10.2015**

73 Titular/es:

**NICHIREI BIOSCIENCES INC. (100.0%)  
19-20, Tsukiji 6-chome Chuo-ku  
Tokyo 104-8402, JP**

72 Inventor/es:

**KASAMATSU, TOSHIYUKI**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 549 170 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Solución de pretratamiento para la tinción inmunohistoquímica y solución condensada de la misma

- 5 La presente invención se refiere a una solución de pretratamiento y a una solución concentrada de la misma para la tinción inmunohistoquímica, solución que permite llevar a cabo la tinción inmunohistoquímica en un breve tiempo y con menos mano de obra, incluyendo la tinción inmunohistoquímica: la elución en un medio de inclusión que contiene parafina de un portaobjetos de vidrio con una muestra de tejido como un antígeno incluido en el medio; la recuperación del antígeno; el lavado; la reacción con un anticuerpo y la tinción. En particular, la presente invención
- 10 se refiere a una solución de pretratamiento y a una solución concentrada de la misma para la tinción inmunohistoquímica, solución que vale tanto para eluir un medio de inclusión que contiene parafina para la tinción inmunohistoquímica de un portaobjetos de vidrio con una muestra de tejido incluida en el medio como para recuperar la antigenicidad, lo que permite la suficiente intensidad de la tinción en la tinción inmunohistoquímica subsiguiente y que mantiene el medio de inclusión incluido dispersado en la misma, incluso después de su primer
- 15 uso y que se puede utilizar tres o más veces.

- En patología, el pretratamiento de desparafinización y recuperación del antígeno para la tinción inmunohistoquímica de un portaobjetos de vidrio con una muestra de tejido por lo general incluye, como se describe en la publicación no de patente 1: la primera etapa de desparafinización pasando un corte de tejido incluido en parafina fijado en formol a
- 20 través de un capa de disolvente orgánico, tal como xileno, benceno o tolueno, tres veces durante tres minutos cada uno; la segunda etapa de rehidratación del portaobjetos de vidrio y la muestra de tejido haciéndoles pasar a través de una solución anfifílica, tal como etanol, cuatro veces durante tres minutos cada una; y la tercera etapa de recuperación del antígeno de la muestra de tejido rehidratada mediante tratamiento térmico de la muestra de tejido rehidratada sumergida en una solución de recuperación del antígeno, tal como un tampón de citrato o una solución de Tris-EDTA.
- 25

- Los disolventes orgánicos utilizados en la primera etapa del pretratamiento, tal como xileno, benceno, o tolueno, son altamente tóxicos y volátiles, lo que requiere un equipo de salida de gases, tal como un tubo de aspiración, lo que afecta negativamente al ambiente en el que trabajan los técnicos.
- 30

- Como sustituto de los disolventes orgánicos que están asociados a tantas desventajas, hay comercializados agentes de desparafinización altamente seguros, tales como Hemo-De (nombre comercial, fabricado por FALMA), un disolvente orgánico extraído y purificado a partir de cáscaras de cítricos, Clear-Plus y Hemo-Clear (ambos nombres comerciales, fabricados por FALMA) que utilizan hidrocarburos alifáticos (alcanos) y Tissue Clear (nombre comercial, fabricado por SAKURA FINETEK JAPAN CO., LTD.).
- 35

- En lugar de utilizar los agentes de desparafinización altamente seguros, son deseables métodos más convenientes en los que los tres pasos del tratamiento previo se realizan simultáneamente en una sola solución, habiéndose hecho ya algunas propuestas.
- 40

- Por ejemplo, la Publicación de Patente 1 propone un proceso de pretratamiento en el que la desparafinización y la recuperación del antígeno se realizan simultáneamente por calentamiento, a una temperatura mayor que el punto de fusión de la parafina, una muestra de tejido incluidas en una solución que contiene un disolvente orgánico solubilizador de parafina seleccionado de hidrocarburo aromático, un terpeno, o un hidrocarburo isoparafínico, un
- 45 disolvente orgánico polar, un componente antigénico a recuperar y un tensioactivo. La Publicación de Patente 1 también divulga que, para la eliminación del agente tensioactivo residual en una etapa de lavado tras el proceso de pretratamiento, la solución de lavado puede contener ciclodextrina, la cual se une al agente tensioactivo.

- Por otra parte, la Publicación de Patente 1 divulga en el Ejemplo 7 que, cuando se utiliza consecutivamente la solución mencionada anteriormente en el pretratamiento, la parafina residual eluida en la solución después del pretratamiento se adhiere al siguiente portaobjetos, de modo que esta solución no es adecuada para uso consecutivo.
- 50

- Además, cuando se prepara una solución de la composición divulgada en la Publicación de Patente 1 para tener un pH alcalino, en la tinción inmunohistoquímica que sigue al pretratamiento, el portaobjetos de vidrio con la muestra de tejido adherida al mismo tiende a repeler el reactivo de tinción en las porciones que no contienen muestra de tejido, dando como resultado una tinción desigual.
- 55

- Las Publicaciones de Patente 2 y 3 divulgan que la desparafinización y la recuperación del antígeno pueden efectuarse simultáneamente usando una solución que contiene diversos tampones, tensioactivos, etilenglicol y similares, de la misma manera como en el proceso de tratamiento previo divulgado en la Publicación de Patente 1.
- 60

- Sin embargo, en estas publicaciones, el uso consecutivo de la solución de pretratamiento no se pretende que sea similar a la solución de la Publicación de Patente 1 y no hay descripción de una tecnología, tal como para la dispersión de la parafina eluida en la solución, o similares. Por lo tanto, es probable que las soluciones de pretratamiento divulgadas en estas publicaciones, cuando se utilizan consecutivamente, también tengan los mismos
- 65

problemas que los de la Publicación de Patente 1.

A propósito, algunas soluciones de pretratamiento para la tinción inmunohistoquímica que efectúan la desparafinización y la recuperación del antígeno simultáneamente ya están en el mercado, tales como las divulgadas en las publicaciones de patente anteriores, incluyendo Trilogy (nombre comercial, fabricado por Cell Marque Corporation) para un solo uso, o la Target Retrieval Solution pH 9 (3-in-1) (nombre comercial, fabricado por DAKO) para su uso tres veces consecutivas a la semana.

Las composiciones de estos productos comerciales no son conocidas, pero no contienen ciclodextrina. Además, en todos estos productos, la parafina hidrófoba eluida en la solución de pretratamiento durante el uso a menudo flota en la superficie de la solución.

Dicha parafina insoluble en la superficie de la solución se adhiere a un portaobjetos de vidrio con una muestra de tejido cuando se extrae de la solución, de modo que se requieren más etapas de lavado antes de la tinción posterior, lo que complica la operación. En caso contrario, la parafina insoluble afecta negativamente a la tinción inmunohistoquímica posterior. Además, cuando la tinción se lleva a cabo en un sistema de tinción inmunohistoquímica automático, la parafina insoluble puede afectar negativamente a la tinción.

#### Publicaciones de patente

Publicación de Patente 1: JP-2001-505297-A  
Publicación de Patente 2: JP-2003-526086-A  
Publicación de Patente 3: US-6649368-B1

#### Publicaciones no de Patente

La Publicación no de Patente 1: "Koso Koutai Hou" (Immunoenzymatictechnique), Revised 4th Edition, Watanabe y Nakane, Kakusai Kikaku (2002)

El documento US 2005/118725 describe reactivos para su uso en un entorno automatizado para acondicionamiento celular de muestras biológicas. El documento US 2005/118725 también describe reactivos para su uso en un entorno automatizado para la eliminación o ataque ácido de medios de inclusión.

Es un objetivo de la presente invención proporcionar una solución de pretratamiento para tinción inmunohistoquímica que sirva en la tinción inmunohistoquímica tanto para eluir un medio de inclusión que contiene parafina de un portaobjetos de vidrio con una muestra de tejido en forma de un corte de tejido en rodajas adherido al portaobjetos e incluido en el medio como para recuperar la antigenicidad de la muestra de tejido, que permite la intensidad suficiente de la tinción en la tinción inmunohistoquímica posterior, lo que mantiene el medio de inclusión eluido dispersado en la misma, incluso después de su primer uso, que es utilizable tres o más veces consecutivas y que es perfectamente seguro.

Es otro objetivo de la presente invención proporcionar una solución de pretratamiento para la tinción inmunohistoquímica que resuelva los problemas anteriores, y que, tras la tinción posterior a la elución de un medio de inclusión que contiene parafina de un portaobjetos de vidrio con una muestra de tejido en la forma de un corte de tejido en rodajas adherido al portaobjetos e incluido en el medio y la recuperación del antígeno de la muestra de tejido, inhiba la repulsión de un reactivo de tinción de la parte del portaobjetos de vidrio sin la muestra de tejido para de ese modo prevenir la tinción desigual.

Es otro objetivo de la presente invención proporcionar una solución de pretratamiento concentrada para la tinción inmunohistoquímica que pueda prepararse fácilmente en la solución de pretratamiento para la tinción inmunohistoquímica logrando los objetivos anteriores. Los presentes inventores han realizado investigaciones intensivas para alcanzar los objetivos anteriores. En primer lugar, se investigaron soluciones de pretratamiento para tinción inmunohistoquímica sin disolventes orgánicos convencionales con problemas de seguridad, tales como xileno, benceno o tolueno, y que se componen principalmente de agua como forma respetuosa con el medio ambiente y otros factores. En este sentido, se han realizado investigaciones en diversos tensioactivos como un componente de la solución de pretratamiento que tiene tanto los efectos de eluir suficientemente un medio de inclusión que contiene parafina de un portaobjetos de vidrio con una muestra de tejido incluida en el medio como de inhibir la flotación del medio incluido eluido en la superficie de la solución para dispersar el medio en la solución, para permitir el uso consecutivo de la solución de pretratamiento.

Como resultado, se observó que los dos efectos mencionados anteriormente no se pueden obtener de forma simultánea con un único agente tensioactivo, que los dos efectos pueden ser logrados en cierta medida con el uso de dos tensioactivos particulares, pero que si la solución de pretratamiento se alcaliniza y se utiliza tres veces consecutivas o más, es probable que el reactivo de tinción sea repelido en la porción de un portaobjetos de vidrio sin muestra, lo que da como resultado la tinción desigual en la etapa de tinción posterior al uso de la solución de pretratamiento utilizada consecutivamente.

A continuación, se buscaron los componentes que resolvían tales problemas para combinar los dos tensioactivos particulares con diversos compuestos poliméricos.

Además, con el fin de confirmar la capacidad de elución simultánea del medio de inclusión y la recuperación del antígeno en una única solución y el pequeño efecto sobre la intensidad de la tinción en la etapa de tinción, se investigaron varias combinaciones de los componentes para resolver los problemas anteriores en combinación con agentes de recuperación del antígeno convencionales.

Además, las investigaciones también se hicieron con ciclodextrina y derivados de la misma, que no habían sido utilizados en una solución de pretratamiento para la tinción inmunohistoquímica, pero que se describieron en la Publicación de Patente 1 como capaces de eliminar agentes tensioactivos residuales cuando estén contenidos en una solución de lavado usada después de la solución de pretratamiento .

Como resultado, se observó a través de experimentos que, cuando la ciclodextrina o un derivado de la misma se añade en 2 % en masa a una solución de pretratamiento junto con los dos tensioactivos particulares mencionados anteriormente y un agente de recuperación del antígeno, la acción de los tensioactivos per se inhibía posiblemente debido a la unión con los tensioactivos como se divulga en la Publicación de Patente 1, la dispersabilidad se deterioró notablemente y recurrió el problema de la parafina insoluble, el cual debería haber sido resuelto. Además, la intensidad de la tinción en la tinción se redujo significativamente y el efecto esperado no se pudo lograr. Sin embargo, inesperadamente, se confirmó que la ciclodextrina o un derivado de la misma en un contenido particular podría prevenir la inhibición de la acción de los agentes tensioactivos, podría inhibir el deterioro de la intensidad de la tinción en la tinción y podría resolver diversos problemas mencionados anteriormente.

Se observó además que cuando se añade una solución anfifílica a la composición mencionada anteriormente, la intensidad de la tinción aumentaba aún más y el efecto de la inhibición de la repulsión de un reactivo de tinción, que por otro lado es el que se produce cuando una solución de pretratamiento es alcalina, se ha mejorado aún más.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona una solución de pretratamiento para la tinción inmunohistoquímica para eluir un medio de inclusión que contiene parafina de un portaobjetos de vidrio con una muestra de tejido incluida en dicho medio y para recuperar la antigenicidad de dicha muestra de tejido, siendo utilizable dicha solución de pretratamiento tres o más veces, comprendiendo dicha solución de pretratamiento un agente de recuperación del antígeno, que permite la recuperación de la antigenicidad por tratamiento térmico, un primer tensioactivo no iónico, un segundo tensioactivo no iónico y ciclodextrina o un derivado de la misma, siendo el resto no inferior a menos del 80 % en masa de agua, en el que un contenido de dicho agente de recuperación del antígeno es tal que un pH de dicha solución de pretratamiento es de 5,0 a 10,0, en el que dichos primer y segundo tensioactivos no iónicos son un tensioactivo no iónico polioxietilen alquil fenil éter y un tensioactivo no iónico polioxietilen sorbitán y en el que un contenido de dicha ciclodextrina o un derivado de la misma es 0,01 a 1,0 % en masa y en el que dicha solución de pretratamiento opcionalmente contiene una solución anfifílica.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona también un concentrado de una solución de pretratamiento para la tinción inmunohistoquímica para eluir un medio de inclusión que contiene parafina de un portaobjetos de vidrio con una muestra de tejido incluida en dicho medio y para recuperar la antigenicidad de dicha muestra de tejido, comprendiendo dicho concentrado de solución de pretratamiento:

- un agente de recuperación del antígeno, que permite la recuperación de la antigenicidad por tratamiento térmico,
- un primer tensioactivo no iónico,
- un segundo tensioactivo no iónico, y
- ciclodextrina o un derivado de la misma,
- siendo el resto agua, pero que comprende menos de 80 % en masa de agua
- en el que dichos primer y segundo tensioactivos no iónicos son un tensioactivo no iónico polioxietilen alquil fenil éter y un tensioactivo no iónico polioxietilen sorbitán
- en el que dicho concentrado de solución de pretratamiento es para uso como solución de pretratamiento para la tinción inmunohistoquímica a un pH predeterminado mediante la adición de una cantidad predeterminada de agua a la misma, siendo dicho pH predeterminado de 5,0 a 7,0.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona además el concentrado de solución de pretratamiento mencionada arriba para la tinción inmunohistoquímica, en el que dicho concentrado de solución de pretratamiento se suministra en parte solo.

De acuerdo con la presente invención, también se proporciona un concentrado de solución de pretratamiento de dos partes para la tinción inmunohistoquímica, consistiendo dicho concentrado de solución de pretratamiento de dos partes en

- una primera parte de concentrado de solución y
- una segunda parte de concentrado de solución,
- en el que dicha primera parte de concentrado de solución comprende un agente de recuperación del antígeno,

que permite la recuperación de la antigenicidad por tratamiento térmico, en el que dicha segunda parte de concentrado de solución comprende un tensioactivo no iónico polioxietilén alquil fenil éter y un tensioactivo no iónico polioxietilén sorbitán y ciclodextrina o un derivado de la misma, en el que dicha primera parte de concentrado de solución y dicha segunda parte de concentrado de solución se mezclan con una cantidad predeterminada de agua para preparar una solución de pretratamiento que tiene un pH de 8,0 a 10,0 antes de su uso.

La solución de pretratamiento para la tinción inmunohistoquímica de acuerdo con la presente invención contiene el agente de recuperación del antígeno, los dos tensioactivos particulares y el contenido particular de ciclodextrina o un derivado de la misma y no menos de 80 % en masa de agua hasta el total. Por lo tanto la solución actúa tanto como para eluir un medio de inclusión que contiene parafina usado en la tinción inmunohistoquímica de un portaobjetos de vidrio con una muestra de tejido incluida en el medio como para recuperar la antigenicidad de la muestra de tejido; permite la intensidad de la tinción suficiente en la tinción inmunohistoquímica subsiguiente; mantiene el medio de inclusión eluido dispersado en la misma incluso después del primer uso para prevenir que la parafina se insolubilice sobre la superficie de la solución después de su uso; y se puede usar tres o más veces consecutivas. Además, la presente solución de pretratamiento, al estar libre de disolventes orgánicos tales como xileno, es excelentemente segura y ventajosa para el medio ambiente. Además, incluso cuando se produce una solución alcalina, la solución de pretratamiento para la tinción inmunohistoquímica de acuerdo con la presente invención sigue inhibiendo la repulsión de un reactivo de tinción.

Por lo tanto, mediante el uso de la solución de pretratamiento para la tinción inmunohistoquímica de acuerdo con la presente invención, la tinción inmunohistoquímica puede llevarse a cabo en poco tiempo con menos trabajo.

La solución de pretratamiento para la tinción inmunohistoquímica de acuerdo con la presente invención, cuando contiene además una solución anfifílica, permite una intensidad de la tinción aún mayor y proporciona todavía un efecto de inhibición aún mejor de repulsión de un reactivo de tinción.

El concentrado de la solución de pretratamiento para la tinción inmunohistoquímica de acuerdo con la presente invención, que contiene menos agua que la solución de pretratamiento para la tinción inmunohistoquímica de acuerdo con la presente invención, puede utilizarse fácilmente como la solución de pretratamiento para la tinción inmunohistoquímica a un pH predeterminado mediante la adición de una cantidad predeterminada de agua durante su uso.

La presente invención se explicará ahora en detalle.

La solución de pretratamiento para la tinción inmunohistoquímica y un concentrado de solución de la misma de acuerdo con la presente invención son para la llamada tinción inmunohistoquímica, en la que una sustancia específica (antígeno) presente en los tejidos o células normales o tumorales de los organismos vivos se detecta sobre la base de una reacción antígeno-anticuerpo específica para el diagnóstico patológico.

Las muestras de tejido para ser sometidas a tinción inmunohistoquímica normalmente están fijadas con formol, alcohol y similares e incluidas en un medio de inclusión que contiene parafina para el almacenamiento a largo plazo. Dicho bloque incluido en parafina fijado en formol se corta y se adhiere a un portaobjetos para microscopio para tinción inmunohistoquímica. Dependiendo de la clase del antígeno primario a ser utilizado, antes de la tinción inmunohistoquímica, es necesario llevar a cabo la desparafinización y la recuperación del antígeno.

Los procedimientos generales para la desparafinización y la recuperación del antígeno incluyen tres etapas, es decir, la desparafinización, por ejemplo, una muestra de tejido fijada con formol incluida en parafina, como se mencionó anteriormente, con un disolvente orgánico, tal como xileno, benceno o tolueno; la rehidratación de la muestra del tejido desparafinado con una solución anfifílica, tal como etanol y la recuperación de los antígenos presentes en la muestra de tejido rehidratada. Después de estas etapas, la tinción inmunohistoquímica se lleva a cabo incluyendo el lavado y la tinción.

La presente invención permite la realización simultánea del pretratamiento de tres etapas en una única solución, es decir, la solución de pretratamiento para la tinción inmunohistoquímica. Hasta ahora se han propuesto y comercializado soluciones de pretratamiento utilizadas de esta forma, pero la mayoría de ellas son de un solo uso y pocas de ellas pueden ser usadas tres o más veces consecutivas, por ejemplo, de tres a cuatro veces consecutivas. La presente invención proporciona una solución de pretratamiento de este tipo y un concentrado de solución de la misma que se puede usar tres veces o más, preferiblemente tres a cinco veces.

La solución de pretratamiento de acuerdo con la presente invención no contiene menos de 80 % en masa, preferiblemente no menos de 85 % en masa, más preferiblemente no menos de 90 % en masa de agua, está libre de disolventes orgánicos usados generalmente con los consiguientes problemas de seguridad, tales como xileno y contiene un agente de recuperación del antígeno, dos tensioactivos no iónicos particulares y ciclodextrina o un derivado de la misma. El agua es preferiblemente agua desionizada. Aquí, este contenido de agua incluye cualquier contenido de humedad de otros componentes.

El agente de recuperación del antígeno no está particularmente limitado con tal de que sea convencional y permita la recuperación de la antigenicidad por tratamiento térmico y se pueda seleccionar adecuadamente de aquellos capaces de ajustar el pH dependiendo del tejido a tratar. Ejemplos del agente de recuperación del antígeno pueden incluir varias soluciones tampón tales como tampones citrato, tampones Tris, tampones SSC, y éstos se pueden

mezclar con un agente quelante tal como EDTA.

El contenido del agente de recuperación del antígeno puede decidirse adecuadamente dependiendo del tejido a tratar de modo que el pH de la solución de pretratamiento de la presente invención esté en el intervalo de 5,0 a 10,0, preferiblemente de 6,0 a 9,0.

Los dos tensioactivos particulares son polioxietilen (abreviado en lo sucesivo como POE) alquil fenil éter y el tensioactivo no iónico POE sorbitán.

En la solución de pretratamiento de acuerdo con la presente invención, el tensioactivo no iónico POE alquil fenil éter interviene principalmente en la desparafinización y puede ser preferiblemente, por ejemplo, al menos uno de NP-40, Triton X-100, Triton X-114, o IGEAL CA-630.

El contenido del tensioactivo no iónico POE alquil fenil éter puede decidirse adecuadamente teniendo en cuenta la función principal mencionada anteriormente y, por lo general, es de 0,01 a 1,0 % en masa, preferiblemente de 0,01 a 0,5 % en masa, más preferiblemente de 0,05 a 0,3 % en masa. Con un contenido demasiado bajo del tensioactivo no iónico POE alquil fenil éter, el efecto de desparafinización puede ser pequeño, mientras que con un contenido demasiado alto, puede ser difícil mantener una temperatura predeterminada durante el calentamiento para la recuperación del antígeno como se discutirá más adelante.

En la solución de pretratamiento de acuerdo con la presente invención, el tensioactivo no iónico POE sorbitán interviene principalmente en la función de mantener la parafina eluida dispersada en la misma durante tres o más veces de uso, a través de la interacción con ciclodextrina o un derivado de la misma, lo que se discutirá más adelante. El tensioactivo no iónico de POE sorbitán puede ser preferiblemente al menos uno de Tween 20, Tween 40 o Tween 80.

El contenido de tensioactivo no iónico POE sorbitán puede ser adecuadamente seleccionado teniendo en cuenta la función principal anteriormente mencionada y es generalmente de 0,3 a 3,0 % en masa, preferiblemente de 0,5 a 1,5 % en masa, más preferiblemente de 0,5 a 1,0 % en masa. Con un contenido demasiado bajo del tensioactivo no iónico POE sorbitán puede deteriorarse la dispersabilidad de la parafina en un uso consecutivo, mientras que con un contenido demasiado alto, puede ser difícil mantener una temperatura predeterminada en el calentamiento para la recuperación del antígeno, lo que se discutirá más adelante.

En la solución de pretratamiento de acuerdo con la presente invención, la ciclodextrina o un derivado de la misma interviene principalmente en la inhibición de la repulsión de un agente de tinción de un portaobjetos de vidrio en la siguiente etapa de tinción después del pretratamiento y también en el mantenimiento de la parafina eluida dispersada en el pretratamiento. La ciclodextrina o un derivado de la misma pueden ser al menos una de  $\alpha$ -ciclodextrina,  $\beta$ -ciclodextrina y  $\gamma$ -ciclodextrina, que son productos naturales, y sus derivados, en particular, con una mejor solubilidad en agua con la adición de un grupo hidroxilo y similares. Los ejemplos preferidos pueden incluir hidroxialquil ciclodextrinas, tales como hidroxialquil- $\alpha$ -ciclodextrina, hidroxialquil- $\beta$ -ciclodextrina e hidroxialquil- $\gamma$ -ciclodextrina, siendo la hidroxialquil- $\beta$ -ciclodextrina particularmente preferida. El alquilo puede ser, por ejemplo, etilo o propilo.

El contenido de ciclodextrina o un derivado de la misma es de 0,01 a 1,0 % en masa, preferiblemente de 0,05 a 0,5 % en masa, más preferiblemente de 0,05 a 0,3 % en masa. Con un contenido de ciclodextrina o un derivado de la misma de menos de 0,01 % en masa, no se puede conseguir el efecto de la inhibición de la repulsión de un reactivo de tinción de un portaobjetos de vidrio. Por otra parte, con un contenido de más de 1,0 % en masa, el efecto antes mencionado de mantener la parafina eluida dispersa en la solución de pretratamiento, se ve afectada negativamente, y se inhibe el efecto de los tensioactivos. Además, la recuperación del antígeno se inhibe y no se puede lograr suficiente intensidad de la tinción. Por lo tanto, hay que controlar el límite superior del contenido de ciclodextrina o un derivado de la misma, ya que se puede inhibir el efecto deseado de la presente invención.

La solución de pretratamiento de acuerdo con la presente invención puede contener opcionalmente otros componentes además de los componentes esenciales mencionados anteriormente, con el fin de mejorar los efectos deseados o presentar otros efectos sin inhibir los efectos deseados de la presente invención.

Como tales otros componentes, puede estar preferiblemente contenida una solución anfifílica principalmente para permitir una mayor intensidad de la tinción en la tinción tras el pretratamiento, y para mejorar aún más el efecto de inhibición de la repulsión de un reactivo de tinción de un portaobjetos de vidrio mediante la combinación con la ciclodextrina o un derivado de la misma.

La solución anfifílica no está particularmente limitada, siempre y cuando se pueda esperar la mejora de los efectos

anteriores, y puede ser preferiblemente, por ejemplo, al menos uno de etilenglicol, propilenglicol o 1,3-butilenglicol. Entre éstos, el etilenglicol es particularmente ventajoso para el uso tres o más veces consecutivas, ya que, además de la mejora de los efectos anteriores, tiene el efecto de inhibir la re-adhesión de la parafina eluida y dispersada en la solución de pretratamiento a un portaobjetos de vidrio.

5 El contenido de la solución anfifílica, dado el caso, en la solución de pretratamiento de acuerdo con la presente invención puede decidirse adecuadamente teniendo en cuenta su efecto y, por lo general, puede ser habitualmente de 1,0 a 5,0 % en masa, preferiblemente de 2,0 a 4,0 % en masa. Con un contenido demasiado bajo de la solución anfifílica, no se puede conseguir la mejora esperada en los efectos, mientras que con un contenido demasiado alto, el efecto de la inhibición de la parafina insoluble, que es uno de los efectos de la solución de pretratamiento de la presente invención, puede ser adversamente inhibida.

15 Se pueden incluir además otros componentes, que no sea la solución anfifílica, al menos uno de conservantes y desinfectantes, tales como azida sódica, timerosal, gentamicina, ProClin (nombre comercial, fabricado por SUPELCO), p-hidroxibenzoatos (parabenos), cloruro de benzalconio y cloruro de cetilpiridinio. El contenido de tales otros componentes se puede seleccionar adecuadamente teniendo en cuenta sus funciones, siempre y cuando no se inhiban los efectos de la presente invención.

20 El concentrado de solución de pretratamiento para la tinción inmunohistoquímica de acuerdo con la presente invención es para la preparación de la solución de pretratamiento de la presente invención anteriormente mencionada, contiene menos agua que la solución de pretratamiento de la presente invención y es para uso a un pH predeterminado añadiendo una cantidad predeterminada de agua a la misma durante el uso.

25 El nivel de concentración se puede seleccionar adecuadamente y, por lo general, puede ser de 5 a 20 veces, preferiblemente 5 a 10 veces.

El concentrado de solución de pretratamiento para la tinción inmunohistoquímica de acuerdo con la presente invención, cuando el pH predeterminado es de 5,0 a 7,0, se suministra en una parte para mejorar la estabilidad de almacenamiento.

30 Por otra parte, cuando el pH predeterminado es 8,0 a 10,0, el concentrado de solución de pretratamiento se suministra en dos partes y está compuesto del primer concentrado de solución que contiene el agente de recuperación del antígeno y, opcionalmente, un conservante, y el segundo concentrado de solución que contiene el tensioactivo no iónico polioxietilen alquil fenil éter, el tensioactivo no iónico polioxietilen sorbitán, ciclodextrina o un derivado de la misma y opcionalmente una solución anfifílica y un tampón.

40 El concentrado de solución de pretratamiento para la tinción inmunohistoquímica de acuerdo con la presente invención, suministrado en forma de una sola o dos partes, se puede preparar en la solución de pretratamiento de la presente invención mediante la mezcla con una cantidad predeterminada de agua, tal como agua desionizada, para establecerlo en un pH predeterminado, siendo dicho pH predeterminado de 5,0 a 7,0 cuando se prepara a partir del concentrado de solución de pretratamiento de una parte y siendo dicho pH predeterminado de 8,0 a 10,0 cuando se prepara a partir del concentrado de la solución de pretratamiento de dos partes.

45 La solución de pretratamiento de acuerdo con la presente invención se puede utilizar ya sea en un proceso manual o en aparato automatizado. En particular, es conveniente y se prefiere el uso de un aparato automatizado con control de temperatura o un sistema de tinción inmunohistoquímica.

50 El pretratamiento para la tinción inmunohistoquímica utilizando la solución de pretratamiento de la presente invención puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante la introducción de una muestra, tal como un portaobjetos de vidrio con tejido incluido en un medio de inclusión que contiene parafina a tratar, en la solución de pretratamiento de la presente invención, cuya temperatura se regula por lo general de 20 a 70 °C, preferentemente, a una temperatura no más baja que el punto fusión del medio de inclusión, tal como parafina y agitando el sistema una pluralidad de veces, para promover la desparafinización. En este punto, por lo general, se debe confirmar la eliminación de la parafina.

55 A continuación, la temperatura de la solución de pretratamiento se eleva para promover la recuperación del antígeno, con presurización opcional para acortar el tiempo de reacción. La temperatura es generalmente de 80 a 130 °C, preferiblemente de 90 a 120 °C y el tiempo de mantenimiento a tales temperaturas es generalmente de 1 a 70 minutos, preferiblemente de aproximadamente 5 a 60 minutos.

60 Después del tratamiento a una temperatura elevada, la temperatura de la solución de pretratamiento se baja de nuevo hasta aproximadamente 20 a 70 °C, y el sistema se agita, para completar así el pretratamiento.

65 La solución de pretratamiento de acuerdo con la presente invención se puede usar tres o más, generalmente de tres a cinco, preferiblemente de tres a cuatro veces consecutivas, por lo que el pretratamiento de la siguiente muestra de tejido puede llevarse a cabo de manera similar con una solución de pretratamiento usada, y si la solución está

diseñada para su uso en cinco ocasiones, se pueden obtener resultados de tinción similares al primer y quinto pretratamiento.

El portaobjetos de vidrio pretratado se puede someter a tinción inmunohistoquímica mediante la realización de la etapa de lavado posterior y la etapa de tinción inmunohistoquímica a través de métodos convencionales.

La presente invención se explicará con más detalle con referencia a los Ejemplos, Ejemplos de Control y Ejemplos Comparativos, que no limitan la presente invención.

En los siguientes ejemplos, las evaluaciones se realizaron de la siguiente manera:

Artículo de evaluación (1): Se analizó si es posible o no la desparafinización y la recuperación del antígeno simultánea en una única solución de pretratamiento.

Las evaluaciones se indicaban como "S" para los que es posible y "N" para los que no sea posible.

Artículo de evaluación (2): La observación visual de parafina insoluble en la superficie de la solución después de la desparafinización y recuperación del antígeno con la solución de pretratamiento.

Las evaluaciones se indicaban como 5 puntos para aquellos sin espuma, 4 puntos para los que tienen una ligera espuma, 3 puntos por los que tienen pequeñas masas de espuma, 2 puntos para los que tienen pequeñas y grandes masas de espuma mezcladas y 1 punto para aquellos con grandes masas de espuma (los resultados se muestran como un promedio de tres veces de uso).

Artículo de evaluación (3): La observación visual de la repulsión del reactivo para tinción inmunohistoquímica en el portaobjetos de vidrio.

Las evaluaciones se indicaban como 5 puntos para aquellos en los que no hay repulsión, 4 puntos para los que tienen unas pocas partes de repulsión mínima, 3 puntos para los que tienen muchas partes de repulsión mínima, 2 puntos para los que tienen partes de repulsión mínima y grande mezcladas y 1 punto para los que tienen grandes partes de repulsión o problemas graves.

Artículo de evaluación (4): Intensidad de la tinción observada con microscopio óptico

Las evaluaciones se indicaban como 2 puntos para aquellos con mayor intensidad en comparación con los Ejemplos de control 1 a 3, 1 punto para aquellos con intensidad ligeramente mayor en comparación con Ejemplos de control 1 a 3, 0 puntos para aquellos con intensidad comparable a la de los Ejemplos de control 1 a 3, -1 puntos para aquellos con una intensidad ligeramente menor comparada con los Ejemplos de control 1 a 3 y -2 puntos para aquellos con menor intensidad en comparación con los Ejemplos de control 1 a 3.

Artículo de evaluación (5): Espesor del tejido después de la desparafinización y la recuperación del antígeno con una solución de pretratamiento (cuanto más fino es el tejido, más parafina y similares presentes en el interior de la muestra de tejido han sido suficientemente eluidos).

Las evaluaciones se indicaban como 5 puntos para aquellos con espesor comparable al de los Ejemplos de control 1 a 3, 4 puntos aquellos algo más gruesos en comparación con los Ejemplos de control 1 a 3, 3 puntos para aquellos ligeramente más gruesos en comparación con los Ejemplos de control 1 a 3, 2 puntos para aquellos más gruesos en comparación con los Ejemplos de control 1 a 3 y 1 punto para aquellos significativamente más gruesos en comparación con los Ejemplos de control 1 a 3.

Artículo de evaluación (6): Se evaluó si son posibles o no tres veces consecutivas de uso de la solución de pretratamiento a la vista de los Artículos de evaluación (1) a (5).

Las evaluaciones se indicaban como "S" para los que sea posible y "N" para los que no sea posible.

Ejemplos de control 1 a 3 (la desparafinización, la rehidratación y la recuperación del antígeno se realizaron por separado como se hace convencionalmente).

A) Pretratamiento

<Desparafinización y Rehidratación>

Se seccionó tejido tonsilar fijado en formol e incluido en parafina a un grosor de 3  $\mu$ m, se colocó sobre un portaobjetos de vidrio recubierto (recubrimiento MAS, fabricado por Matsunami GLASS IND., LTD.) y se secó a 37 °C durante 18 horas. El portaobjetos se desparafinizó colocándolo en posición vertical durante tres minutos en una capa de xileno tres veces y a continuación se rehidrató colocándolo en posición vertical durante tres minutos en una capa de etanol cuatro veces. Después de la colocación en vertical final en la capa de etanol, el portaobjetos se lavó en un tampón de fosfato a pH 7,6 tres veces durante tres minutos cada uno.

<Recuperación del antígeno>

El portaobjetos de vidrio rehidratado y lavado se colocó en un recipiente resistente al calor lleno de un tampón citrato pH 6,0 (Ejemplo de control 1), un tampón citrato pH 7,0 (Ejemplo de control 2) o un tampón Tris-HCl pH 9,0 que contiene EDTA (Ejemplo de control 3), en el que ninguno de los tampones contenía tensioactivos. Cada recipiente resistente al calor se colocó en un autoclave de sobremesa (fabricado por ALP CO., LTD.) y se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 20 minutos. Después de la esterilización en autoclave, cada recipiente resistente al calor se sacó y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 20 minutos para recuperar la antigenicidad.

(B) Lavado

Después de permanecer durante 20 minutos, el portaobjetos de vidrio se transfirió a un tampón fosfato de pH 7,6 y se lavó en posición vertical durante cinco minutos tres veces.

(C) Tinción inmunohistoquímica

(1) Tinción inmunohistoquímica manual

Un portaobjetos de vidrio sometido a la etapa de lavado (B) se colocó en una solución de peróxido de hidrógeno al 3%/metanol, se agitó ligeramente y se dejó reposar durante 10 minutos. A continuación el portaobjetos se transfirió a un tampón fosfato de pH 7,6 y se lavó durante cinco minutos en posición vertical tres veces.

Se extrajo la humedad del portaobjetos de vidrio resultante y se dibujó un círculo con PAP PEN (fabricado por DAIDO SANGYO CO., LTD.) alrededor de la muestra de tejido. A continuación, se añadió gota a gota al portaobjetos de vidrio como anticuerpo primario, anticuerpo monoclonal de conejo CD3 (SP7) (nombre comercial, fabricado por NICHIREI BIOSCIENCES INC.) y se hizo reaccionar a 25 °C durante 60 minutos. Una vez finalizada la reacción, el portaobjetos se transfirió a un tampón fosfato de pH 7,6 y se lavó en posición vertical durante cinco minutos tres veces.

A continuación, se extrajo la humedad del portaobjetos de vidrio lavado y se añadió gota a gota al portaobjetos Histofine Simple Stain MAX-PO (MULTI) (nombre comercial, fabricado por NICHIREI BIOSCIENCES INC.) como un anticuerpo secundario y se hizo reaccionar a 25 °C durante 30 minutos. Después de finalizada la reacción, el portaobjetos se transfirió a un tampón fosfato de pH 7,6 y se lavó en posición vertical durante cinco minutos tres veces.

Después del lavado, se añadió gota a gota al portaobjetos la solución de DAB preparada utilizando el kit de sustrato DAB (nombre comercial, fabricado por NICHIREI BIOSCIENCES INC.) como sustrato cromogénico del portaobjetos de vidrio desprovisto de humedad y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante cinco minutos. El portaobjetos se lavó en agua corriente durante cinco minutos, se eliminó la humedad, se hizo reaccionar con hematoxilina de Mayer durante 30 segundos para el desarrollo de color y se lavó en agua corriente durante cinco minutos.

A continuación se eliminó la humedad y el portaobjetos fue sometido a deshidratación y enjuagado pasando a través de la capa de etanol tres veces, tres minutos en posición vertical en una capa de etanol una vez, paso a través de una capa de xileno una vez y en posición vertical durante cinco minutos en una capa de xileno dos veces y a continuación se montó en un medio de montaje no acuoso (fabricado por NICHIREI BIOSCIENCES INC.).

(2) Tinción inmunohistoquímica en un sistema de tinción inmunohistoquímica automático

El portaobjetos de vidrio sometido a la etapa de lavado (B) se colocó en una gradilla de un sistema de tinción inmunohistoquímica automático, HISTOSTAINER (nombre comercial, fabricado por NICHIREI BIOSCIENCES INC.) (denominado en lo sucesivo HISTOSTAINER). El tejido se cubrió con un tampón fosfato de pH 7,6, con el objeto de evitar su secado. El conjunto de portaobjetos del aparato se lavó en PBS para HISTOSTAINER y se secó al aire. Se añadió gota a gota al portaobjetos del aparato una solución de peróxido de hidrógeno al tres por ciento (fabricada por NICHIREI BIOSCIENCES INC.) y se hizo reaccionar durante cinco minutos.

Una vez terminada la reacción, el portaobjetos se lavó en PBS para HISTOSTAINER y se secó al aire. Se añadió gota a gota al portaobjetos anticuerpo monoclonal de conejo CD3 (SP7) (para HISTOSTAINER) (nombre comercial, fabricado por NICHIREI BIOSCIENCES INC.) como anticuerpo primario y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Una vez terminada la reacción, el portaobjetos se lavó dos veces en PBS para HISTOSTAINER. Después de secado al aire, se añadió gota a gota al portaobjetos HISTOFINE SIMPLE STAIN MAX-PO (MULTI) (para HISTOSTAINER) (nombre comercial, fabricado por NICHIREI BIOSCIENCES INC.) como anticuerpo secundario y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Una vez terminada la reacción, el portaobjetos se lavó dos veces en PBS para HISTOSTAINER.

A continuación, se añadió gota a gota al portaobjetos una solución DAB como sustrato cromógeno preparado usando el kit de sustrato DAB (para HISTOSTAINER) (nombre comercial, fabricado por NICHIREI BIOSCIENCES INC.) y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Una vez terminada la reacción, el portaobjetos se lavó una vez en PBS para HISTOSTAINER y se enjuagó una vez en agua. El portaobjeto teñido se extrajo y se lavó en agua corriente durante cinco minutos. Después de eso, se eliminó la humedad y se hizo actuar la hematoxilina de Mayer sobre el portaobjetos durante 30 segundos, seguido por lavado en agua corriente durante cinco minutos.

A continuación se eliminó la humedad y el portaobjetos fue sometido a deshidratación y enjuagado pasando a través de una capa de etanol tres veces, tres minutos en posición vertical en una capa de etanol una vez, paso a través de

una capa de xileno una vez y en posición vertical durante cinco minutos en una capa de xileno dos veces y a continuación se montó en un medio de montaje no acuoso (fabricado por NICHIREI BIOSCIENCES INC.).

**Ejemplo 1: Preparación de la solución de pretratamiento, a pH 9,0, sin solución anfifílica**

Se preparó un concentrado de solución de diez veces de un tampón Tris-HCl que contiene EDTA y se filtró a través de un filtro de 0,22 µm, tampón con el cual, cuando el concentrado de solución de pretratamiento a preparar a continuación se diluía diez veces, el pH de la solución de pretratamiento resultante podría ser 9,0. Al concentrado de solución diez veces así obtenido se añadieron Triton X-100 a una concentración final de 0,1 % en masa y Tween 20 a una concentración final de 1,0 % en masa, ambos tensioactivos no iónicos e hidroxipropil-β-ciclodextrina a una concentración final de 0,1 % en masa, para preparar así un concentrado de solución de pretratamiento.

La solución de concentrado de pretratamiento así preparada se diluyó diez veces con agua desionizada para obtener una solución de pretratamiento.

(A) Pretratamiento

<Desparafinización y Recuperación del antígeno>

La solución de pretratamiento preparada anteriormente se colocó en un sistema automático de temperatura controlada, PTModule (nombre comercial, fabricado por THERMO FISHER SCIENTIFIC K. K.) (a partir de ahora abreviado como PTModule) y se calentó a 65 °C.

Por otro lado, el tejido tonsilar incluido en parafina fijado con formol se seccionó a un grosor de 3 µm, se colocó sobre un portaobjetos de vidrio recubierto (recubrimiento MAS, fabricado por MATSUNAMI GLASS IND IND., LTD.) y se secó a 37 °C durante 18 horas. El portaobjetos se colocó en una gradilla de un sistema de tinción inmunohistoquímica automático, HISTOSTAINER.

Cuando la temperatura de la solución en el PTModule alcanzó 65 °C, se abrió la tapa y la gradilla de portaobjetos en la cual se había colocado el portaobjetos, se colocó en la solución y se agitó varias veces. La gradilla se extrajo de la solución para confirmar que no quedaba parafina en el portaobjetos y a continuación se colocó en el PTModule y la tapa se cerró. El portaobjetos se trató térmicamente en el PTModule de acuerdo con un programa preestablecido (la temperatura de la solución se elevó de 65 °C hasta 100 °C, se mantuvo a 100 °C durante 40 minutos y se redujo hasta 65 °C).

(B) Lavado

Una vez terminado el tratamiento térmico, el portaobjetos colocado en la gradilla de portaobjetos, se agitó ligeramente, a continuación, se transfirió a un tampón fosfato de pH 7,6 que contenía 0,05 % en masa de Tween 20 y se dejó reposar durante cinco minutos. Se hicieron observaciones visuales para descartar cualquier parafina residual en la muestra de tejido o en el portaobjetos (si se observa parafina residual que no pudo ser eliminada por lavado) y cualquier parafina insoluble sobre la superficie de la solución después de la solución de pretratamiento se dejó enfriar a la temperatura ambiental después del pretratamiento.

(C) Tinción inmunohistoquímica en un sistema de tinción inmunohistoquímica automático

El portaobjetos de vidrio colocado en la gradilla para HISTOSTAINER y sometido a la etapa de lavado (B) se colocó en HISTOSTAINER tal cual, se lavó en PBS para HISTOSTAINER y se secó al aire. Se añadió gota a gota al portaobjetos una solución de peróxido de hidrógeno al tres por ciento (fabricada por NICHIREI BIOSCIENCES INC.) y se hizo reaccionar durante cinco minutos.

Una vez terminada la reacción, el portaobjetos se lavó en PBS para HISTOSTAINER y se secó al aire. Se añadió gota a gota al portaobjetos anticuerpo monoclonal de conejo CD3 (SP7) (para HISTOSTAINER) (nombre comercial, fabricado por NICHIREI BIOSCIENCES INC.) como anticuerpo primario y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Una vez terminada la reacción, el portaobjetos se lavó dos veces en PBS para HISTOSTAINER. Después de secado al aire, se añadió gota a gota al portaobjetos HISTOFINE SIMPLE STAIN MAX-PO (MULTI) (para HISTOSTAINER) (nombre comercial, fabricado por NICHIREI BIOSCIENCES INC.) como anticuerpo secundario y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Una vez terminada la reacción, el portaobjetos se lavó dos veces en PBS para HISTOSTAINER.

A continuación, se añadió gota a gota al portaobjetos una solución DAB como sustrato cromógeno preparado usando el kit de sustrato DAB (para HISTOSTAINER) (nombre comercial, fabricado por NICHIREI BIOSCIENCES INC.) y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Una vez terminada la reacción, el portaobjetos se lavó una vez en PBS para HISTOSTAINER y se enjuagó una vez en agua. El portaobjetos teñido se extrajo y se lavó en agua corriente durante cinco minutos. Después de eso, se eliminó la humedad y se hizo actuar la hematoxilina de Mayer sobre el portaobjetos durante 30 segundos, seguido por lavado en agua corriente durante

cinco minutos.

A continuación se eliminó la humedad y el portaobjetos fue sometido a deshidratación y enjuagado pasando a través de una capa de etanol tres veces, tres minutos en posición vertical en una capa de etanol una vez, paso a través de una capa de xileno una vez y en posición vertical durante cinco minutos en una capa de xileno dos veces y a continuación se montó en un medio de montaje no acuoso (fabricado por NICHIREI BIOSCIENCES INC.

Los pasos (A) a (C) anteriores se repitieron tres veces sin cambiar la solución de pretratamiento. Los resultados de las evaluaciones mencionadas anteriormente la tercera vez se muestran en la Tabla 1 junto con los resultados de los Ejemplos de control 1 a 3, que fueron los resultados de un tratamiento.

#### **Ejemplo 2: Preparación de una solución de pretratamiento, a pH 9,0, que contiene solución anfifílica**

Se preparó un concentrado de solución de diez veces de un tampón Tris-HCl que contiene EDTA y se filtró a través de un filtro de 0,22  $\mu$ m, tampón con el cual, cuando el concentrado de solución de pretratamiento a preparar a continuación se diluía diez veces, el pH de la solución de pretratamiento resultante podría ser 9,0. Al concentrado de solución diez veces así obtenido se añadieron Triton X-100 a una concentración final de 0,1 % en masa y Tween 20 a una concentración final de 1,0 % en masa, ambos tensioactivos no iónicos e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina a una concentración final de 0,1 % en masa y etilenglicol a una concentración final de 3,0 % en masa, para preparar así un concentrado de solución de pretratamiento.

El concentrado de la solución de pretratamiento así preparado se diluyó diez veces con agua desionizada para obtener una solución de pretratamiento.

A continuación, se llevaron a cabo las etapas (A) a (C) y las evaluaciones se realizaron de la misma manera que en el Ejemplo 1, excepto que la solución de pretratamiento fue reemplazada con la obtenida anteriormente. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

A propósito, las evaluaciones también se hicieron de la misma manera que en el Ejemplo 2 con  $\alpha$ -ciclodextrina,  $\beta$ -ciclodextrina o  $\gamma$ -ciclodextrina en lugar de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, para obtener resultados similares. Se observó que la hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina era la más preferida en vista de la facilidad de manejo, ya que la  $\alpha$ -ciclodextrina y la  $\beta$ -ciclodextrina no eran solubles a temperatura ambiente y sus efectos no fueron exhibidos hasta que se disolvió tras el tratamiento térmico.

#### **Ejemplo 3: Preparación de la solución de pretratamiento, a pH 6,0, sin solución de anfifílica**

Se preparó un concentrado de solución de diez veces de un tampón citrato y se filtró a través de un filtro de 0,22  $\mu$ m, tampón con el cual, cuando el concentrado de solución de pretratamiento a preparar a continuación se diluía diez veces, el pH de la solución de pretratamiento resultante podría ser 6,0. Al concentrado de solución diez veces así obtenido se añadieron Triton X-100 a una concentración final de 0,1 % en masa y Tween 20 a una concentración final de 1,0 % en masa, ambos tensioactivos no iónicos, hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina a una concentración final de 0,1 % en masa y etilenglicol, a una concentración final de 3,0 % en masa, para preparar así un concentrado de solución de pretratamiento.

El concentrado de la solución de pretratamiento así preparado se diluyó diez veces con agua desionizada para obtener una solución de pretratamiento.

A continuación, se llevaron a cabo las etapas (A) a (C) y las evaluaciones se realizaron de la misma manera que en el Ejemplo 1, excepto que la solución de pretratamiento fue reemplazada con la obtenida anteriormente. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

#### **Ejemplo 4: Preparación de la solución de pretratamiento, a pH 6,0, que contiene solución anfifílica**

Se preparó un concentrado de solución de diez veces de un tampón citrato y se filtró a través de un filtro de 0,22  $\mu$ m, tampón con el cual, cuando el concentrado de solución de pretratamiento a preparar a continuación se diluía diez veces, el pH de la solución de pretratamiento resultante podría ser 6,0. Al concentrado de solución diez veces así obtenido se añadieron Triton X-100 a una concentración final de 0,1 % en masa y Tween 20 a una concentración final de 1,0 % en masa, ambos tensioactivos no iónicos, hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina a una concentración final de 0,1 % en masa y etilenglicol, a una concentración final de 3,0 % en masa, para preparar así un concentrado de solución de pretratamiento.

El concentrado de la solución de pretratamiento así preparado se diluyó diez veces con agua desionizada para obtener una solución de pretratamiento.

A continuación, se llevaron a cabo las etapas (A) a (C) y las evaluaciones se realizaron de la misma manera que en el Ejemplo 1, excepto que la solución de pretratamiento fue reemplazada con la obtenida anteriormente. Los

resultados se muestran en la Tabla 1.

**Ejemplo 5:** Preparación de la solución de pretratamiento, a pH 7,0, sin solución anfifílica

- 5 Se preparó un concentrado de solución de diez veces de un tampón citrato que contiene hidróxido sódico y se filtró a través de un filtro de 0,22 µm, tampón con el cual, cuando el concentrado de solución de pretratamiento a preparar a continuación se diluía diez veces, el pH de la solución de pretratamiento resultante podría ser 7,0. Al concentrado de solución diez veces así obtenido se añadieron Triton X-100 a una concentración final de 0,1 % en masa y Tween 20 a una concentración final de 1,0 % en masa, ambos tensioactivos no iónicos, hidroxipropil-β-ciclodextrina a una  
10 concentración final de 0,1 % en masa y etilenglicol, a una concentración final de 3,0 % en masa, para preparar así un concentrado de solución de pretratamiento.

El concentrado de la solución de pretratamiento así preparado se diluyó diez veces con agua desionizada para obtener una solución de pretratamiento.

- 15 A continuación, se llevaron a cabo las etapas (A) a (C) y las evaluaciones se realizaron de la misma manera que en el Ejemplo 1, excepto que la solución de pretratamiento fue reemplazada con la obtenida anteriormente. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

20 **Ejemplo 6:** Preparación de la solución de pretratamiento, a pH 7,0, que contiene solución anfifílica

- Se preparó un concentrado de solución de diez veces de un tampón citrato que contiene hidróxido sódico y se filtró a través de un filtro de 0,22 µm, tampón con el cual, cuando el concentrado de solución de pretratamiento a preparar a continuación se diluía diez veces, el pH de la solución de pretratamiento resultante podría ser 7,0. Al concentrado de  
25 solución diez veces así obtenido se añadieron Triton X-100 a una concentración final de 0,1 % en masa y Tween 20 a una concentración final de 1,0 % en masa, ambos tensioactivos no iónicos, hidroxipropil-β-ciclodextrina a una concentración final de 0,1 % en masa y etilenglicol, a una concentración final de 3,0 % en masa, para preparar así un concentrado de solución de pretratamiento.

- 30 El concentrado de la solución de pretratamiento así preparado se diluyó diez veces con agua desionizada para obtener una solución de pretratamiento.

- A continuación, se llevaron a cabo las etapas (A) a (C) y las evaluaciones se realizaron de la misma manera que en el Ejemplo 1, excepto que la solución de pretratamiento fue reemplazada con la obtenida anteriormente. Los  
35 resultados se muestran en la Tabla 1.

**Ejemplo comparativo 1:** Preparación de la solución de pretratamiento, a pH 9,0, sin solución anfifílica y ciclodextrina

- 40 Se preparó un concentrado de solución de diez veces de un tampón Tris-HCl que contiene EDTA y se filtró a través de un filtro de 0,22 µm, tampón con el cual, cuando el concentrado de solución de pretratamiento a preparar a continuación se diluía diez veces, el pH de la solución de pretratamiento resultante podría ser 9,0. Al concentrado de solución diez veces así obtenido se añadieron Triton X-100 a una concentración final de 0,1 % en masa y Tween 20 a una concentración final de 1,0 % en masa, ambos tensioactivos no iónicos, para preparar así un concentrado de  
45 solución de pretratamiento.

El concentrado de la solución de pretratamiento así preparado se diluyó diez veces con agua desionizada para obtener una solución de pretratamiento.

- 50 A continuación, se llevaron a cabo las etapas (A) a (C) y las evaluaciones se realizaron de la misma manera que en el Ejemplo 1, excepto que la solución de pretratamiento fue reemplazada con la obtenida anteriormente. A propósito, la solución de pretratamiento del Ejemplo comparativo 1 no pudo usarse consecutivamente, de modo que los resultados del segundo uso se muestran en la Tabla 1.

55 **Ejemplo comparativo 2:** Preparación de la solución de pretratamiento, a pH 9,0, sin ciclodextrina

- Se preparó un concentrado de solución de diez veces de un tampón Tris-HCl que contiene EDTA y se filtró a través de un filtro de 0,22 µm, tampón con el cual, cuando el concentrado de solución de pretratamiento a preparar a continuación se diluía diez veces, el pH de la solución de pretratamiento resultante podría ser 9,0. Al concentrado de  
60 solución diez veces así obtenido se añadieron Triton X-100 a una concentración final de 0,1 % en masa y Tween 20 a una concentración final de 1,0 % en masa, ambos tensioactivos no iónicos, y etilenglicol a una concentración final de 3,0 % en masa, para preparar así un concentrado de solución de pretratamiento.

- El concentrado de la solución de pretratamiento así preparado se diluyó diez veces con agua desionizada para  
65 obtener una solución de pretratamiento.

A continuación, se llevaron a cabo las etapas (A) a (C) y las evaluaciones se realizaron de la misma manera que en el Ejemplo 1, excepto que la solución de pretratamiento fue reemplazada con la obtenida anteriormente.

**Ejemplos comparativos 3 y 4: Preparación de la solución de pretratamiento, a pH 9,0, sin ciclodextrina**

Las soluciones de pretratamiento se prepararon de la misma manera que en el Ejemplo comparativo 2, excepto que el etilenglicol se sustituyó por propilenglicol (Ejemplo comparativo 3) o 1,3-butilenglicol (Ejemplo comparativo 4) y se llevaron a cabo las etapas (A) a (C) y las evaluaciones se realizaron de la misma manera que en el Ejemplo 1.

Tabla 1

|                       | Artículo de evaluación (1) | Artículo de evaluación (2) | Artículo de evaluación (3) | Artículo de evaluación (4) | Artículo de evaluación (5) | Artículo de evaluación (6) |
|-----------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Ejemplo de control 1  | -                          | -                          | 5 puntos                   | 0 punto                    | 5 puntos                   | -                          |
| Ejemplo de control 2  | -                          | -                          | 5 puntos                   | 0 punto                    | 5 puntos                   | -                          |
| Ejemplo de control 3  | -                          | -                          | 5 puntos                   | 0 punto                    | 5 puntos                   | -                          |
| Ejemplo 1             | S                          | 5 puntos                   | 4 puntos                   | 0 punto                    | 4 puntos                   | S                          |
| Ejemplo 2             | S                          | 4,5 puntos                 | 4 puntos                   | 2 puntos                   | 4 puntos                   | S                          |
| Ejemplo 3             | S                          | 4,5 puntos                 | 5 puntos                   | 0 punto                    | 4 puntos                   | S                          |
| Ejemplo 4             | S                          | 4,5 puntos                 | 5 puntos                   | 2 puntos                   | 4 puntos                   | S                          |
| Ejemplo 5             | S                          | 4,5 puntos                 | 5 puntos                   | 0 punto                    | 4 puntos                   | S                          |
| Ejemplo 6             | S                          | 4,5 puntos                 | 5 puntos                   | 2 puntos                   | 4 puntos                   | S                          |
| Ejemplo comparativo 1 | S                          | 5 puntos                   | 1 punto                    | 0 punto                    | 4 puntos                   | N                          |
| Ejemplo comparativo 2 | S                          | 4,5 puntos                 | 2 puntos                   | 2 puntos                   | 4 puntos                   | N                          |
| Ejemplo comparativo 3 | S                          | 4 puntos                   | 2 puntos                   | 0 punto                    | 4 puntos                   | N                          |
| Ejemplo comparativo 4 | S                          | 4 puntos                   | 2 puntos                   | 1 punto                    | 4 puntos                   | N                          |

Los resultados mostrados en la Tabla 1 demuestran que las soluciones de pretratamiento de los Ejemplos comparativos 1 a 4 sin ciclodextrina no podían utilizarse de forma consecutiva en vista de que los portaobjetos repelían el reactivo de tinción (Artículo de evaluación (3)). Con las soluciones de pretratamiento de los Ejemplos comparativos 2 a 4 que contienen una solución anfifílica, la repulsión se resolvió ligeramente en comparación con el Ejemplo comparativo 1, pero las soluciones de pretratamiento no tenían propiedades para soportar el uso de tres o más veces consecutivas. Por el contrario, las soluciones de pretratamiento de los ejemplos se podían utilizar tres veces consecutivas. En particular, se observa que, con una solución anfifílica, la intensidad de la tinción (Artículo de evaluación (4)) tendía a mejorar más.

A propósito, se confirmó que, en el Ejemplo 2, cuando Triton X-100 se sustituía por NP-40, Triton X-114 o IGEAL CA-630 y Tween 20 fue reemplazado con Tween 40 o Tween 80, se lograron efectos similares.

**Ejemplo comparativo de referencia 1: Preparación de la solución de pretratamiento, a pH 9,0, examen con un tensioactivo no iónico**

Se preparó un concentrado de solución de diez veces de un tampón Tris-HCl que contiene EDTA y se filtró a través de un filtro de 0,22 µm, tampón con el cual, cuando el concentrado de solución de pretratamiento a preparar a continuación se diluía diez veces, el pH de la solución de pretratamiento resultante podría ser 9,0. Al concentrado de solución diez veces así obtenido se añadió cada uno de los tensioactivos no iónicos mostrados en la Tabla 2 a una concentración final de 0,1 % en masa, para preparar así un concentrado de solución de pretratamiento.

Cada uno de los concentrados de la solución de pretratamiento así preparados se diluyó diez veces con agua desionizada para obtener una solución de pretratamiento.

A continuación, se llevaron a cabo las etapas (A) a (C) una vez y se realizaron evaluaciones con respecto a los Artículos de evaluación (1) a (4) de la misma manera que en el Ejemplo 1, excepto que la solución de pretratamiento fue reemplazada con las obtenidas anteriormente. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

| Tipo de agente tensioactivo | Artículo de evaluación (1) | Artículo de evaluación (2) | Artículo de evaluación (3) | Artículo de evaluación (4) |
|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Triton X-100                | S                          | 1 punto                    | 2 puntos                   | 0 punto                    |
| NP-40                       | S                          | 1 punto                    | 2 puntos                   | 0 punto                    |
| Triton X-114                | S                          | 1 punto                    | 2 puntos                   | 0 punto                    |
| Tween 20                    | N                          | 4 puntos                   | 1 punto                    | -1 Punto                   |
| Tween 40                    | N                          | 4 puntos                   | 1 punto                    | -1 Punto                   |
| Tween 80                    | N                          | 4 puntos                   | 1 punto                    | -1 Punto                   |

Los resultados mostrados en la Tabla 2 demuestran que el uso consecutivo no se puede realizar con un solo agente tensioactivo.

5

Ejemplo comparativo de referencia 2: Preparación de la solución de pretratamiento, a pH 9,0, examen con dos tensioactivos no iónicos

Se preparó un concentrado de solución de diez veces de un tampón Tris-HCl que contiene EDTA y se filtró a través de un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$ , tampón con el cual, cuando el concentrado de solución de pretratamiento a preparar a continuación se diluía diez veces, el pH de la solución de pretratamiento resultante podría ser 9,0. Al concentrado de solución diez veces así obtenido se añadió Triton X-100 a una concentración final de 0,1 % en masa y Tween 20 a cada una de las concentraciones finales mostradas en la Tabla 2, ambos tensioactivos no iónicos, para preparar así un concentrado de solución de pretratamiento.

15

Cada uno de los concentrados de la solución de pretratamiento así preparados se diluyó diez veces con agua desionizada para obtener una solución de pretratamiento.

A continuación, se llevaron a cabo las etapas (A) a (C) dos veces y se realizaron evaluaciones con respecto a los Artículos de evaluación (1) a (4) de la misma manera que en el Ejemplo 1, excepto que la solución de pretratamiento fue reemplazada con las obtenidas anteriormente. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

20

Tabla 3

| Concentración final de Tween 20 | Artículo de evaluación (1) | Artículo de evaluación (2) | Artículo de evaluación (3) | Artículo de evaluación (4) | Artículo de evaluación (5) |
|---------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 0,1 % en masa                   | S                          | 2 puntos                   | 1 punto                    | 0 punto                    | 3 puntos                   |
| 0,3 % en masa                   | S                          | 3 puntos                   | 1 punto                    | 0 punto                    | 3 puntos                   |
| 0,5 % en masa                   | S                          | 4 puntos                   | 1 punto                    | 0 punto                    | 4 puntos                   |
| 1,0 % en masa                   | S                          | 5 puntos                   | 1 punto                    | 0 punto                    | 4 puntos                   |
| 2,0 % en masa                   | S                          | 5 puntos                   | 1 punto                    | 0 punto                    | 4 puntos                   |
| 3,0 % en masa                   | S                          | 5 puntos                   | 1 punto                    | 0 punto                    | 4 puntos                   |

Los resultados mostrados en la Tabla 3 demuestran que el uso consecutivo no se puede realizar incluso con los dos tensioactivos particulares.

25

Ejemplos 7 a 10 y Ejemplos comparativos 5 y 6: examen del contenido de ciclodextrina

Se prepararon las soluciones de pretratamiento y las evaluaciones se realizaron de la misma manera que en el Ejemplo 2, excepto que la concentración final de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina de 0,1 % en masa se cambió a la concentración final de 0,01 % en masa (Ejemplo 7), 0,05 % en masa (Ejemplo 8), 0,5 % en masa (Ejemplo 9), 1,0 % en masa (Ejemplo 10), 2,0 % en masa (Ejemplo comparativo 5) o 15,0 % en masa (Ejemplo comparativo 6). Los resultados se muestran en la Tabla 4 junto con los del Ejemplo 2.

30

Tabla 4

|                       | Concentración final de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina | Artículo de evaluación (1) | Artículo de evaluación (2) | Artículo de evaluación (3) | Artículo de evaluación (4) | Artículo de evaluación (5) | Artículo de evaluación (6) |
|-----------------------|--------------------------------------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Ejemplo 2             | 0,1 % en masa                                                | S                          | 4,5 puntos                 | 4 puntos                   | 2 puntos                   | 4 puntos                   | S                          |
| Ejemplo 7             | 0,01 % en masa                                               | S                          | 4 puntos                   | 3 puntos                   | 2 puntos                   | 4 puntos                   | S                          |
| Ejemplo 8             | 0,05 % en masa                                               | S                          | 4 puntos                   | 3,5 puntos                 | 2 puntos                   | 4 puntos                   | S                          |
| Ejemplo 9             | 0,5 % en masa                                                | S                          | 4 puntos                   | 4 puntos                   | 1 punto                    | 4 puntos                   | S                          |
| Ejemplo 10            | 1,0 % en masa                                                | S                          | 3,5 puntos                 | 4,5 puntos                 | 0 punto                    | 4 puntos                   | S                          |
| Ejemplo comparativo 5 | 2,0 % en masa                                                | S                          | 2,5 puntos                 | 4,8 puntos                 | -1 punto                   | 4 puntos                   | N                          |
| Ejemplo comparativo 6 | 15,0 % en masa                                               | S                          | 2 puntos                   | 5 puntos                   | -1 punto                   | 4 puntos                   | N                          |

Los resultados mostrados en la Tabla 4 demuestran que si el contenido de ciclodextrina, incluso si está contenida, está fuera del intervalo particular, no se puede obtener el efecto de realizar el uso consecutivo.

**Ejemplo 11:** Ejemplo de concentrado de solución de pretratamiento suministrado en dos partes

Se preparó la solución A compuesta de un concentrado de solución de diez veces de un tampón Tris-HCl 500 mM que contiene EDTA 100 mM, tampón con el cual, cuando el concentrado de solución de pretratamiento a preparar a continuación se diluía diez veces, el pH de la solución de pretratamiento resultante podría ser 9,0 y con 0,01 % en masa de azida sódica como conservante.

Por otro lado, se preparó la solución B compuesta de un tampón citrato 1 mM, 1 % en masa de Triton X-100 y 10 % en masa de Tween 20, ambos tensioactivos no iónicos, 1 % en masa de hidroxipropil-β-ciclodextrina y 30 % en masa de etilenglicol.

Las soluciones A y B se mezclaron con agua desionizada en una proporción de 1:1:8 para preparar una solución de tratamiento previo a pH 9,0.

Las evaluaciones de la solución de pretratamiento obtenida se hicieron de la misma manera que en el Ejemplo 2. Se observaron resultados similares a los del Ejemplo 2 con respecto a todos los Artículos de evaluación.

Ejemplo comparativo de referencia 3: Examen con polisacáridos, polímeros de hidratos de carbono o polímeros de alto peso molecular en lugar de ciclodextrina

Las soluciones de pretratamiento se prepararon de la misma manera que en el Ejemplo 1, excepto que la hidroxipropil-β-ciclodextrina fue reemplazada con diversos polisacáridos, polímeros de carbohidratos o polímeros de alto peso molecular mostrados en la Tabla 5.

Las soluciones de pretratamiento así obtenidas se evaluaron con respecto a los Artículos de evaluación (1) a (3) y (6) de la misma manera que en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5

| Lugar n del polímero de hidroxipropil-β-ciclodextrina                                     | Artículo de evaluación (1) | Artículo de evaluación (2) | Artículo de evaluación (3) | Artículo de evaluación (6) |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Dextrano (Pm. 35.000-45.000) (1 % en masa)                                                | N                          | 1 punto                    | 1 punto                    | N                          |
| Dextrano (Pm. 400.000-500.000) (1 % en masa)                                              | N                          | 1 punto                    | 1 punto                    | N                          |
| Dextrano (Pm. 2.000.000) (1 % en masa)                                                    | S                          | 2 puntos                   | 3 puntos                   | N                          |
| Dextrina (Pm. 5.000.000-20.000.000) (1 % en masa)                                         | S                          | 1 punto                    | 3 puntos                   | N                          |
| D-sorbitol (1 % en masa)                                                                  | N                          | 1 punto                    | 2 puntos                   | N                          |
| Trehalosa (1 % en masa)                                                                   | N                          | 1 punto                    | 2 puntos                   | N                          |
| PVP (Pm. 58.000) (1 % en masa)                                                            | S                          | 4 puntos                   | 2 puntos                   | N                          |
| PVP (Pm. 58.000) (5 % en masa)                                                            | S                          | 4 puntos                   | 2 puntos                   | N                          |
| PVP (Pm. 34000) (1 % en masa)                                                             | S                          | 4 puntos                   | 2 puntos                   | N                          |
| PVP (Pm. 130.000) (1 % en masa)                                                           | S                          | 3 puntos                   | 1 punto                    | N                          |
| PVP/VA (Pm. 58.000) (1 % en masa)                                                         | S                          | 4 puntos                   | 2 puntos                   | N                          |
| PVP/VA (Pm. 58000) (3 % en masa)                                                          | S                          | 4 puntos                   | 2 puntos                   | N                          |
| PVP/VA (Pm. 58.000) (5 % en masa)                                                         | S                          | 4 puntos                   | 2 puntos                   | N                          |
| PVP: polivinilpirrolidona<br>PVP/VA: copolímero de polivinilpirrolidona-acetato de vinilo |                            |                            |                            |                            |

Los resultados mostrados en la Tabla 5 demuestran que, entre las dextrinas que tienen azúcares lineales, cuando aquellos que tienen pesos moleculares relativamente bajos, un monosacárido tal como sorbitol, o un disacárido tal como trehalosa está contenido en la solución de pretratamiento, la desparafinización no podía llevarse a cabo y debía efectuarse de otra manera. Se supone que los efectos de Tween 20 o Tritón X-100 fueron inhibidos por estos componentes. Por otro lado, se observó que los dextranos que tienen pesos moleculares elevados emitían olor cuando se calentaban.

La PVP y sus copolímeros se utilizan como excipientes de fármacos para la dispersión de sustancias insolubles en

agua. Previendo dicho efecto, se examinaron algunas PVP y los resultados mostrados en la Tabla 5 anterior indican que se obtuvieron buenos resultados con respecto a la parafina insoluble (Artículo de evaluación (2)), pero no se lograron los resultados suficientes para el uso consecutivo, con respecto a la repulsión del reactivo de tinción de los portaobjetos (Artículo de evaluación (3)). También se observó que la PVP de un peso molecular más alto tenía una viscosidad más alta y, por lo tanto, era incómoda de usar.

5

## REIVINDICACIONES

1. Una solución de pretratamiento para la tinción inmunohistoquímica para eluir un medio de inclusión que contiene parafina de un portaobjetos de vidrio con una muestra de tejido incluida en dicho medio y para recuperar la antigenicidad de dicha muestra de tejido, siendo dicha solución de pretratamiento utilizable tres o más veces, comprendiendo dicha solución de pretratamiento:
  - un agente de recuperación de antígeno, que permite la recuperación de la antigenicidad por tratamiento térmico,
  - un primer tensioactivo no iónico,
  - un segundo tensioactivo no iónico, y
  - ciclodextrina o un derivado de la misma,
  - siendo el resto no menos del 80 % en masa de agua
  - en el que un contenido de dicho agente de recuperación de antígeno es tal que un pH de dicha solución de pretratamiento es 5,0 a 10,0,
  - en el que dichos primer y segundo tensioactivos no iónicos son un tensioactivo no iónico polioxietilen alquil fenil éter y un tensioactivo no iónico polioxietilen sorbitán y
  - en el que un contenido de dicha ciclodextrina o un derivado de la misma es del 0,01 al 1,0 % en masa.
2. La solución de pretratamiento para la tinción inmunohistoquímica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que un contenido de dicho tensioactivo no iónico polioxietilen alquil fenil éter es del 0,01 al 1,0 % en masa y un contenido de dicho tensioactivo no iónico polioxietilen sorbitán es del 0,3 al 3,0 % en masa.
3. La solución de pretratamiento para la tinción inmunohistoquímica de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, que comprende además una solución anfifílica.
4. La solución de pretratamiento para la tinción inmunohistoquímica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicho agente de recuperación de antígeno se selecciona de un tampón citrato, un tampón citrato mezclado con un agente quelante, un tampón SSC, un tampón SSC mezclado con un agente quelante o tampones Tris mezclados con un agente quelante.
5. La solución de pretratamiento para la tinción inmunohistoquímica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicho tensioactivo no iónico polioxietilen alquil fenil éter es al menos uno de NP-40, Triton X-100, Triton X-114 o IGEPAL CA-630 y dicho tensioactivo no iónico polioxietilen sorbitán es al menos uno de Tween 20, Tween 40 o Tween 80.
6. La solución de pretratamiento para la tinción inmunohistoquímica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que dicha ciclodextrina o un derivado de la misma es al menos una de  $\alpha$ -ciclodextrina,  $\beta$ -ciclodextrina,  $\gamma$ -ciclodextrina, hidroxialquil- $\alpha$ -ciclodextrina, hidroxialquil- $\beta$ -ciclodextrina e hidroxialquil- $\gamma$ -ciclodextrina.
7. La solución de pretratamiento para la tinción inmunohistoquímica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en donde dicha solución anfifílica es al menos una de etilenglicol, propilenglicol o 1,3-butilenglicol.
8. Un concentrado de una solución de pretratamiento para la tinción inmunohistoquímica para eluir un medio de inclusión que contiene parafina de un portaobjetos de vidrio con una muestra de tejido incluida en dicho medio y para recuperar la antigenicidad de dicha muestra de tejido, comprendiendo dicho concentrado de solución de pretratamiento:
  - un agente de recuperación del antígeno, que permite la recuperación de la antigenicidad por tratamiento térmico,
  - un primer tensioactivo no iónico,
  - un segundo tensioactivo no iónico, y
  - ciclodextrina o un derivado de la misma,
  - siendo el resto agua, pero comprendiendo no menos del 80 % en masa de agua
  - en el que dichos primer y segundo tensioactivos no iónicos son un tensioactivo no iónico polioxietilen alquil fenil éter y un tensioactivo no iónico polioxietilen sorbitán en donde dicho concentrado de solución de pretratamiento es para uso como solución de pretratamiento para la tinción inmunohistoquímica a un pH predeterminado mediante la adición de una cantidad predeterminada de agua a la misma, siendo dicho pH predeterminado de 5,0 a 7,0.
9. Un concentrado de acuerdo con la reivindicación 8, en el que un contenido de dicho tensioactivo no iónico polioxietilen alquil fenil éter es del 0,1 al 10,0 % en masa, y un contenido de dicho tensioactivo no iónico polioxietilen sorbitán es del 3,0 al 30,0 % en masa y un contenido de dicha ciclodextrina o un derivado de la misma es del 0,1 al 10,0 % en masa.
10. Un concentrado de acuerdo con las reivindicaciones 8 o 9 para la tinción inmunohistoquímica, que comprende

además una solución anfifílica.

- 5 11. Un concentrado de acuerdo con la reivindicación 10 para la tinción inmunohistoquímica, en el que dicha solución anfifílica es al menos una de etilenglicol, propilenglicol o 1,3-butilenglicol.
- 10 12. Un concentrado de solución de pretratamiento de dos partes para la tinción inmunohistoquímica, consistiendo dicha solución de pretratamiento de dos partes en una primera parte de concentrado de solución y una segunda parte de concentrado de solución,
- 15 en donde dicha primera parte de concentrado de solución comprende un agente de recuperación de antígeno, que permite la recuperación de la antigenicidad por tratamiento térmico, en donde dicha segunda parte de concentrado de solución comprende un tensioactivo no iónico polioxietilen alquil fenil éter, un tensioactivo no iónico polioxietilen sorbitán y ciclodextrina o un derivado de la misma,
- 20 en donde dicha primera parte de concentrado de solución y dicha segunda parte de concentrado de solución están mezcladas con una cantidad predeterminada de agua para preparar una solución de pretratamiento que tiene un pH de 8,0 a 10,0 antes de su uso.
13. Un concentrado de acuerdo con la reivindicación 12, en el que dicha segunda parte de concentrado de solución comprende además una solución anfifílica.
- 25 14. Un concentrado de acuerdo con la reivindicación 13, en el que dicha solución anfifílica es al menos una de etilenglicol, propilenglicol o 1,3-butilenglicol.
15. Un concentrado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en el que un contenido de dicho tensioactivo no iónico polioxietilen alquil fenil éter es del 0,1 al 10,0 % en masa, y un contenido de dicho tensioactivo no iónico polioxietilen sorbitán es del 3,0 al 30,0 % en masa y un contenido de dicha ciclodextrina o un derivado de la misma es del 0,1 al 10,0 % en masa.