

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 652 290**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.07.2013 PCT/JP2013/068889**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.01.2014 WO14010633**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.07.2013 E 13817636 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017 EP 2873975**

54 Título: **Composición de anticuerpos, kit para la preparación de la composición de anticuerpos y método de inmunotinción**

30 Prioridad:

10.07.2012 JP 2012155060

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

01.02.2018

73 Titular/es:

**RIKEN (100.0%)
2-1 Hirosawa
Wakou-shi, Saitama 351-0198, JP**

72 Inventor/es:

**MIYAWAKI, ATSUSHI y
HAMA, HIROSHI**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 652 290 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

Composición de anticuerpos, kit para la preparación de la composición de anticuerpos y método de inmunotinción

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a una composición de anticuerpos, un kit para la preparación de una composición de anticuerpos y un método de inmunotinción.

10 Antecedentes de la técnica

Los anticuerpos, en virtud de su capacidad de unirse específicamente a las dianas (antígenos) en las reacciones antígeno-anticuerpo, se utilizan en muchos campos, incluidos los productos farmacéuticos, los agentes de diagnóstico y los reactivos. Los anticuerpos como reactivos, en particular, se usan en muchos métodos experimentales que se extienden desde métodos de análisis cuantitativos (incluyendo análisis semicuantitativo) tales como un método de transferencia Western y un método ELISA hasta métodos de análisis cualitativos y semicuantitativos tales como inmunohistotinción. Las posibles estrategias para hacer un uso efectivo de los anticuerpos incluyen potenciar la reactividad de los anticuerpos o reducir el ruido de fondo causado por la adsorción no específica de anticuerpos.

Un método comúnmente usado para reducir el ruido de fondo causado por la adsorción no específica de anticuerpos es, por ejemplo, un método de bloqueo que usa un reactivo de bloqueo tal como leche desnatada (Bibliografía no de patente 1).

Mientras tanto, debido al desarrollo de técnicas microscópicas en los últimos años, la atención se ha centrado en la observación de una porción profunda de un sujeto en el análisis histológico.

Lista de bibliografía**30 [Bibliografía no de patente]**

Bibliografía no de patente 1
Lakoma et al. Development 138:5223-5234, 2011.

35 Sumario de la invención**Problema técnico**

En el análisis inmunohistoquímico, un objeto a observar, incluso su sección, inevitablemente tiene un grosor. En un caso en el que el objeto a observar tenga un gran espesor, la mejora en la propiedad de infiltración de anticuerpos permite la tinción biológica de una porción profunda de un sujeto, siendo así útil para el análisis de la estructura tridimensional.

La presente invención se ha logrado para resolver el problema anterior, y un objeto de la misma es proporcionar una composición de anticuerpos que incluye (i) un compuesto predeterminado que mejora la propiedad de infiltración de un anticuerpo con respecto a un material biológico tal como un tejido y (ii) un anticuerpo, uso de la composición de anticuerpos y otros.

Solución al problema

Para resolver el problema anterior, la presente invención proporciona cualquiera de los siguientes:

(1) Una composición de anticuerpos que incluye:

al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en urea y derivados de urea; y un anticuerpo,

el compuesto está contenido en la composición de anticuerpos a una concentración no menos de 0,1 M y menos de 1 M,

siendo la composición de anticuerpos una solución.

(2) Un kit para la preparación de una composición de anticuerpos, que incluye:

una solución que contiene al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en urea y

derivados de urea; y

un manual de instrucciones para el kit,

5 incluyendo el manual de instrucciones las siguientes instrucciones:

1) mezclar la solución y un anticuerpo para preparar una composición de anticuerpos; y

10 2) preparar la composición de anticuerpos de modo que la concentración final del compuesto en la composición de anticuerpos no sea menos de 0,1 M y sea menos de 1 M.

(3) Un método de inmunotinción que incluye:

15 una etapa de poner en contacto entre sí (i) una composición de anticuerpos como se expone en (1) en la que el anticuerpo es un anticuerpo para inmunotinción y (ii) un material biológico en contacto entre sí.

Efectos ventajosos de la invención

20 La presente invención puede proporcionar una nueva composición de anticuerpos que incluye (i) un compuesto predeterminado que mejora la propiedad de infiltración de un anticuerpo con respecto a un material biológico tal como un tejido y (ii) un anticuerpo, uso de la composición de anticuerpos y otros.

Breve descripción de los dibujos

25 **Figura 1**
La figura 1 es una vista que muestra el resultado de un ejemplo de acuerdo con la presente invención.

Figura 2
30 La figura 2 es una vista que muestra el resultado de otro ejemplo de acuerdo con la presente invención.

Fig. 3
La figura 3 es una vista que muestra el resultado de otro ejemplo adicional de acuerdo con la presente invención.

35 **Fig. 4**
La figura 4 es una vista que muestra el resultado de otro ejemplo adicional más de acuerdo con la presente invención.

Fig. 5
40 La figura 5 es una vista que muestra el resultado de otro ejemplo más de acuerdo con la presente invención.

Fig. 6
La figura 6 es una vista que muestra el resultado de incluso otro ejemplo más de acuerdo con la presente invención.

45 **Fig. 7**
La figura 7 es una vista que muestra el resultado de otro ejemplo adicional de acuerdo con la presente invención

Descripción de las realizaciones

50 Lo siguiente describirá una realización de la presente invención en detalle.

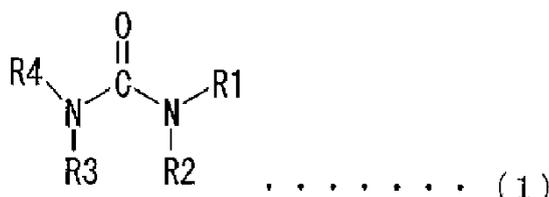
[1. Composición de anticuerpos]

55 Una composición de anticuerpos de acuerdo con la presente invención contiene (i) al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en urea y derivados de urea y (ii) un anticuerpo, estando el compuesto contenido en la composición de anticuerpos a una concentración de no menos de 0,1 M y menos de 1 M, siendo la composición de anticuerpos una solución.

(Derivado de urea)

60 Concretamente, el derivado de urea es, por ejemplo, cualquiera de varios tipos de ureína o compuestos expresados por la Fórmula (1) a continuación. Tenga en cuenta que los compuestos expresados por la Fórmula (1) incluyen parte de ureínas. La composición de anticuerpos de acuerdo con la presente invención solo necesita contener al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en urea y derivados de urea. Entre estos, la composición de anticuerpos contiene más preferiblemente urea

65



En un derivado de urea expresado por la Fórmula (1), cada uno de R1, R2, R3 y R4 es independientemente un átomo de hidrógeno (obsérvese que se excluye aquel en el que todos de R1 a R4 son átomos de hidrógeno, ya que corresponde a urea), un átomo de halógeno o un grupo hidrocarburo. Además, en un caso en el que el grupo hidrocarburo tiene una pluralidad de átomos de carbono, parte de los átomos de carbono puede reemplazarse por un heteroátomo tal como un átomo de nitrógeno, un átomo de oxígeno o un átomo de azufre. Los ejemplos del grupo hidrocarburo abarcan un grupo de hidrocarburo de cadena y un grupo de hidrocarburo cíclico.

Los ejemplos del grupo hidrocarburo de cadena abarcan un grupo alquilo de cadena, un grupo alqueno de cadena y un grupo alquino de cadena. El grupo de hidrocarburo de cadena puede tener cualquier número de átomos de carbono. Por ejemplo, el grupo hidrocarburo de cadena puede ser uno de cadena lineal o ramificada que tiene 6 o menos átomos de carbono, preferiblemente, un grupo alquilo que tiene de 1 a 3 átomos de carbono. El grupo de hidrocarburo de cadena puede tener un sustituyente tal como un átomo de halógeno. Los ejemplos del grupo alquilo de cadena abarcan un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo propilo, un grupo isopropilo, un grupo butilo, un grupo iso-butilo, un grupo sec-butilo, un grupo terc-butilo, un grupo hexilo y un grupo octilo.

El grupo hidrocarburo cíclico puede ser, por ejemplo, un grupo cicloalquilo o un grupo cicloalqueno. El grupo hidrocarburo cíclico puede tener un sustituyente tal como un átomo de halógeno. Los ejemplos del grupo cicloalquilo abarcan aquellos que tienen 3 o más y preferiblemente no más de 6 átomos de carbono, tales como un grupo ciclopropilo, un grupo ciclobutilo, un grupo ciclopentilo y un grupo ciclohexilo. Los ejemplos del grupo cicloalqueno abarcan aquellos que tienen 3 o más y preferiblemente no más de 6 átomos de carbono, tales como un grupo ciclohexenilo.

Los ejemplos del átomo de halógeno abarcan un átomo de flúor, un átomo de cloro, un átomo de bromo y un átomo de yodo.

Los siguientes 1) y 2) son más preferibles, ejemplos concretos de los derivados de urea expresados por la Fórmula 1:

1) Cualesquiera tres grupos seleccionados de R1 a R4 son átomos de hidrógeno, y el otro grupo es (i) un átomo de halógeno o (ii) un grupo hidrocarburo de cadena que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, más preferiblemente, el otro grupo es un grupo alquilo que tiene (i) de 1 a 3 átomos de carbono o (ii) 1 o 2 átomos de carbono.

2) Cualesquiera dos grupos seleccionados de R1 a R4 son átomos de hidrógeno, y cada uno de los otros dos grupos es independientemente (i) un átomo de halógeno o (ii) un grupo hidrocarburo de cadena que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, más preferiblemente, los otros dos los grupos son grupos alquilo que tienen cada uno (i) de 1 a 3 átomos de carbono o (ii) 1 o 2 átomos de carbono. Todavía más preferiblemente, uno de los dos grupos que son átomos de hidrógeno se selecciona de R1 y R2 y el otro de los dos grupos se selecciona de R3 y R4.

(Concentración del compuesto en la composición de anticuerpos)

En la composición de anticuerpos, al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en urea y derivados de urea está contenido en una concentración en un intervalo de no menos de 0,1 M a menos de 1 M. Una composición de anticuerpos que contiene el compuesto a una concentración de no menos de 1 M es desfavorable ya que puede disminuir la reactividad del anticuerpo contra el antígeno. En el caso en el que el compuesto contenido en la composición de anticuerpos es de dos o más tipos de compuestos, la concentración en el intervalo de no menos de 0,1 M a menos de 1 M se refiere a una concentración total de estos compuestos.

La concentración del compuesto en la composición de anticuerpos es preferiblemente no menos de 0,2 M y no más de 0,5 M, más preferiblemente no menos de 0,25 M y no más de 0,45 M, aún más preferiblemente no menos de 0,27 M y no más de 0,4 M, y particularmente preferiblemente no menos de 0,3 M y no más de 0,36 M.

(Anticuerpo)

El anticuerpo en la composición del anticuerpo no está limitado a ningún tipo específico.

El anticuerpo es, por ejemplo, un anticuerpo para la inmunotinción. En otra alternativa, el anticuerpo es una inmunoglobulina derivada de (a) un sobrenadante de cultivo de hibridoma, (b) ascitis, antisuero o plasma de un animal inmunizado intraesplenéticamente, o (c) un fluido seroso de un huevo de un ave. El uso de una composición

de anticuerpos de acuerdo con la presente invención es aplicable a cualquier uso que requiera mantener la reactividad antígeno-anticuerpo a la vez que mejora la propiedad de infiltración con respecto a los materiales biológicos objeto tales como tejidos. Específicamente, la composición de anticuerpos de acuerdo con la presente invención se usa para, por ejemplo, inmunotinción. De forma particularmente preferible, la composición de anticuerpos de acuerdo con la presente invención se usa para la inmunotinción que contiene un anticuerpo primario para la inmunotinción y, si es necesario, un anticuerpo de orden secundario o superior para la inmunotinción.

(Concentración del anticuerpo en la composición del anticuerpo)

La concentración del anticuerpo en la composición de anticuerpos no está particularmente limitada, pero preferiblemente no es menos de 0,05 µg/ml y no más de 100 µg/ml y más preferiblemente no menos de 4 µg/ml y no más de 40 µg/ml, desde el punto de vista de aumentar la propiedad de infiltración del anticuerpo a un material biológico tal como un tejido.

(Tensioactivo)

Una "composición de anticuerpos" de acuerdo con la presente invención puede contener un tensioactivo, si es necesario. El tensioactivo es preferiblemente un tensioactivo no iónico. Los ejemplos del tensioactivo no iónico abarcan: tensioactivos de ácido graso tales como monolaurato de polioxietilensorbitán, monopalmitato de polioxietilensorbitán, monoestearato de polioxietilensorbitán y monooleato de polioxietilensorbitán; tensioactivos de alcoholes superiores tales como poli(alcohol vinílico) y tensioactivos de alquilfenol tales como polioxietileno octilfenil éter. Específicamente, por ejemplo, el tensioactivo puede ser al menos uno seleccionado del grupo que consiste en: serie Triton X (marca registrada) tal como Triton X-100 y Triton X-140; Serie Tween (marca registrada) tal como Tween-20, Tween-40, Tween-60 y Tween-80; y NP-40 (nombre del producto). Como agente tensioactivo, se puede usar una mezcla de dos o más tipos, si es necesario.

La concentración del tensioactivo en la composición de anticuerpos no está particularmente limitada, pero preferiblemente no es menos de 0,025 % (p/v) y no más de 0,2 % (p/v), y más preferiblemente no menos de 0,05 % (p/v) y no más de 0,1 % (p/v), desde el punto de vista del aumento de la permeabilidad de la composición de anticuerpos a un material biológico objeto. Obsérvese que la unidad " % (p/v)" representa un porcentaje de un peso (p (gramo)) de un tensioactivo utilizado, con respecto a un volumen (v (mililitro)) de la "composición de anticuerpos". El mismo significado de esta unidad también se aplica a otros componentes que no sean el tensioactivo.

(Otros componentes)

La "composición de anticuerpos" de acuerdo con la presente invención puede contener un componente seleccionado de, por ejemplo, azúcares y alcoholes, si es necesario. Los ejemplos de azúcares abarcan: sacarosa, fructosa, sorbitol, trehalosa y ciclodextrina. La sacarosa está contenida a una concentración de, por ejemplo, no menos de 1 % (p/v) y no más de 5 % (p/v). La fructosa, el sorbitol y la trehalosa están contenidos cada uno a una concentración de, por ejemplo, no menos de 50 mg/ml y no más de 200 mg/ml. La ciclodextrina está contenida a una concentración de, por ejemplo, no menos de 50 mg/ml y no más de 150 mg/ml. Un alcohol, que se ejemplifica con glicerol, está contenido en una concentración de, por ejemplo, no menos de 1 % (p/v) y no más de 5 % (p/v).

(Disolvente)

Una "composición de anticuerpos" de acuerdo con la presente invención es una solución que contiene un disolvente en el que la urea o un derivado de urea es soluble. El disolvente no se limita a ningún tipo específico, siempre que la urea o un derivado de urea sea soluble en el disolvente. Preferiblemente, se usa agua como disolvente principal; de forma particularmente preferible, solo se usa agua como disolvente. Obsérvese que, en la presente invención, lo que se entiende por la expresión "el agua se utiliza como disolvente principal" es que un porcentaje volumétrico de agua para todos los disolventes utilizados es mayor que el de cualquier otro disolvente, y preferiblemente esa agua se usa en una cantidad que representa más del 50 % y no más del 100 % del volumen total de todos los solventes utilizados. Una "composición de anticuerpos" preparada usando agua como disolvente principal se puede referir como una "composición de anticuerpos" en forma de una solución acuosa.

Una "composición de anticuerpos" de acuerdo con la presente invención puede ser un tampón que contiene un anticuerpo y al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en urea y derivados de urea. Los ejemplos del tampón abarcan una solución de sal en equilibrio (por ejemplo, PBS y HBSS) que se tampona con fosfato y una solución de sal en equilibrio (TBS) que se tampona con hidrócloruro de tris. Una concentración (sinónimo del grado de dilución) del tampón no está particularmente limitada, pero preferiblemente no es menos de 0,05 veces y no más de 1,5 veces, más preferiblemente no menos de 0,1 veces y no más de 1 vez. El tampón puede interpretarse como un tipo de la solución acuosa anterior.

(Preparación de la composición de anticuerpos)

Una "composición de anticuerpos" de acuerdo con la presente invención se prepara añadiendo, a un disolvente, "urea y/o un derivado de urea (compuesto)", "anticuerpo" y "tensioactivo", etc. usados según sea necesario. El procedimiento de adición de los componentes constituyentes de la composición de anticuerpos no está limitado a

ninguno en particular. En un ejemplo, una solución de anticuerpos se mezcla con "urea y/o un derivado de urea (compuesto) y un componente(s) se usa según sea necesario, como "tensoactivo", "azúcar" y "alcohol", en las concentraciones finales como se describió anteriormente.

5 (Papel, etc. del compuesto en la composición de anticuerpos)

Una composición de anticuerpos que contiene al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en urea y derivados de urea a una concentración de no menos de 0,1 M y menos de 1 M aumenta la propiedad de infiltración del anticuerpo a un material biológico tal como un tejido. Es decir, la presente invención también se puede interpretar como cualquiera de los siguientes 1) y 2):

- 1) Un método para tratar un anticuerpo con una solución que contiene al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en urea y derivados de urea a una concentración de no menos de 0,1 M y menos de 1 M, aumentando así la propiedad de infiltración del anticuerpo a un material biológico tal como un tejido; y
- 15 2) Un uso de una solución que contiene al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en urea y derivados de urea a una concentración de no menos de 0,1 M y menos de 1 M, en el que tratar un anticuerpo con la solución aumenta la propiedad de infiltración del anticuerpo a un material biológico tal como un tejido. Obsérvese que la solución puede contener además el o los componentes descritos anteriormente, tal como un agente tensoactivo. Además, en los dos casos anteriores 1) y 2), la concentración del compuesto es preferiblemente no menos de 0,2 M y no más de 0,5 M, más preferiblemente no menos de 0,25 M y no más de 20 0,45 M, aún más preferiblemente no menos de 0,27 M y no más de 0,4 M, y particularmente preferiblemente no menos de 0,3 M y no más de 0,36 M.

[2. Kit para la preparación de una composición de anticuerpos]

25 Un kit para la preparación de una composición de anticuerpos de acuerdo con la presente invención incluye: una solución que contiene al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en urea y derivados de urea; y un manual de instrucciones para el kit, y el manual de instrucciones incluye las siguientes instrucciones:

- 30 1) mezclar la solución y un anticuerpo para preparar una composición de anticuerpos; y
- 2) preparar la composición de anticuerpos de modo que la concentración final del compuesto en la composición de anticuerpos no sea menos de 0,1 M y sea menos de 1 M.

Tenga en cuenta que el disolvente, el anticuerpo y el derivado de la urea, que constituyen la solución, se refieren a los mismos descritos anteriormente en la Sección [1. Composición del anticuerpo]. La solución está contenida, por ejemplo, en un contenedor de solución equipado con tapa o en una bolsa de almacenamiento de solución.

40 Además, el manual de instrucciones para el kit es un registro del método de preparación de la composición de anticuerpos como se describió anteriormente en la Sección (Preparación de la composición de anticuerpos). El manual de instrucciones puede imprimirse, por ejemplo, en un medio de grabación como una hoja de papel o puede grabarse electrónicamente en un medio de grabación electrónico, como un disquete, un disco compacto (CD), un MD o una memoria flash.

45 En un aspecto, la solución contiene un tensoactivo de tal manera que una concentración final del tensoactivo contenido en la composición de anticuerpos no es menos de 0,025 % (p/v) y no más de 0,2 % (p/v) y más preferiblemente no menos de 0,05 % (p/v) y no más de 0,1 % (p/v). Tenga en cuenta que el tensoactivo se refiere a la misma como se describe anteriormente en la Sección [1. Composición de anticuerpos].

50 Si es necesario, la solución puede contener otros componentes, como azúcar y alcohol, como se describió anteriormente en la Sección [1. Composición de anticuerpos].

55 En cuanto a los componentes contenidos en la solución, sus concentraciones se mantienen sustancialmente tal como están o se diluyen en la preparación de una composición de anticuerpos mezclando el anticuerpo con la solución. Si las concentraciones iniciales de los componentes contenidos en la solución se especifican en el kit, es posible usar el kit de tal manera que las concentraciones finales de los componentes en la composición de anticuerpos se ajusten a los valores predeterminados como se describió anteriormente.

60 En un caso en el que la solución contiene una pluralidad de componentes que incluyen al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en urea y derivados de urea, un tensoactivo, un azúcar y un alcohol, la solución solo necesita contener estos componentes en una proporción que es idéntica a una proporción de concentraciones finales de estos componentes en la composición del anticuerpo. Los ejemplos de la solución que contienen una pluralidad de componentes abarcan la siguiente solución:

65 <Solución 1>

La concentración de urea o un derivado de urea no es menos de 0,1 M y es menos de 1 M,
La concentración de un tensioactivo no es menos de 0,05 % (p/v) y no más de 0,1 % (p/v), y
Un disolvente es PBS.

5 Un kit para la preparación de una composición de anticuerpos de acuerdo con la presente invención puede
contener además una solución de anticuerpos, que es diferente de la solución anterior. La solución de
anticuerpos está contenida, por ejemplo, en un contenedor de solución de anticuerpos equipado con tapa o en
una bolsa de almacenamiento de solución de anticuerpos. Como se describió anteriormente en la Sección
10 (Preparación de la composición de anticuerpos), la solución de anticuerpos es la que se mezcla con la solución
anterior para preparar una composición de anticuerpos. El kit para la preparación de una composición de
anticuerpos puede incluir dos o más tipos de soluciones de anticuerpos. Cuando se toma como ejemplo un
anticuerpo para inmunotinción, el kit para la preparación de una composición de anticuerpos incluye, por ejemplo,
una solución de anticuerpos que contiene un anticuerpo primario y una solución de anticuerpos que contiene un
15 anticuerpo secundario o de orden superior. Además, en un caso donde el kit para la preparación de una
composición de anticuerpos incluye la solución o soluciones de anticuerpo, el kit puede incluir además, por
ejemplo, un recipiente de mezcla para usar en la mezcla de la solución o soluciones de anticuerpo con la
solución anterior.

[3. Método de inmunotinción utilizando una composición de anticuerpos]

20 Un ejemplo del uso de una composición de anticuerpos de acuerdo con la presente invención es la inmunotinción.
Para uso en inmunotinción, la composición de anticuerpos contiene un anticuerpo primario para inmunotinción o un
anticuerpo secundario o de orden superior utilizado según sea necesario. El método de inmunotinción incluye una
etapa de poner en contacto entre sí la composición de anticuerpos de acuerdo con la presente invención y un
material biológico.

25 (Material biológico para ser sometido a inmunotinción)

Un material biológico para ser sometido a inmunotinción usando una composición de anticuerpos de acuerdo con la
presente invención no está limitado a ningún tipo específico. Preferiblemente, el material biológico es un material
30 derivado de una planta o un animal, más preferiblemente un material derivado de un animal tal como el seleccionado
entre peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos, particularmente preferiblemente un material derivado de un
mamífero. El mamífero no está limitado a ningún tipo específico, ejemplos de los cuales abarcan: animales de
laboratorio tales como ratones, ratas, conejos, cobayas y primates, excepto los seres humanos; animales de
compañía tales como perros y gatos; animales de granja tales como vacas y caballos y seres humanos.

35 En otra alternativa, el material biológico puede ser un individuo en sí mismo (a excepción de un ser humano vivo).
Además, en otra alternativa, el material biológico puede ser una parte de un organismo biológico tal como un órgano,
un tejido o una célula de un organismo multicelular. La parte de un organismo biológico tal como un órgano, un tejido
o una célula de un organismo multicelular puede tomarse de un individuo o puede prepararse artificialmente in vitro.
40 El material biológico es preferiblemente un individuo en sí mismo de un organismo biológico, un órgano tomado de
un individuo de un organismo biológico, o un tejido tomado de un individuo de un organismo biológico. El individuo,
órgano y tejido de un organismo biológico puede ser sometido a inmunotinción con sus propias formas sin cambios o
puede ser sometido a inmunotinción en forma de cortes. Además, el material biológico puede ser uno en el que, por
ejemplo, se expresa una o más proteínas fluorescentes.

45 Obsérvese que un método para la preparación de una muestra biológica utilizando el material biológico anterior
como muestra para la inmunotinción puede ser un método general para la preparación de una muestra de corte para
la inmunotinción o un método para la preparación de una muestra de montaje completo. Como ejemplo, en la
preparación de una muestra de corte para inmunotinción, se fija un material biológico si es necesario, y luego se
50 incorpora en, por ejemplo, parafina, después de lo cual el material biológico se corta en cortes o se procesa en
cortes congelados o similares. Dependiendo del tipo de muestra de corte, se puede realizar un tratamiento de
limpieza si es necesario. En otro ejemplo, en la preparación de una muestra de montaje completa para la
inmunotinción, se realiza un tratamiento de fijación y un tratamiento de limpieza si es necesario.

55 (Ejemplo de método de inmunotinción y método de observación)

A continuación se describe un ejemplo de un esquema de flujo de inmunotinción que usa una composición de
anticuerpos de acuerdo con la presente invención y un método de observación. Obsérvese que todas las etapas
60 descritas a continuación pueden llevarse a cabo en las mismas condiciones que en un método de inmunotinción
ampliamente conocido.

Etapa 1: Una etapa de preparar la muestra anterior para inmunotinción.

65 Etapa 2: Una etapa de someter la muestra que se ha preparado en la etapa 1 a un tratamiento de activación de
antígeno (la etapa 2 se realiza si surge la necesidad). Esta etapa se lleva a cabo realizando, por ejemplo, un
tratamiento térmico o un tratamiento proteolítico.

Etapa 3: Una etapa de realizar un tratamiento para reducir el ruido de fondo (la etapa 3 se realiza si surge la necesidad). Esta etapa se lleva a cabo realizando, por ejemplo, un tratamiento de degradación de ARN para prevenir la contaminación del ARN no deseado o un tratamiento de bloqueo con un reactivo de bloqueo tal como suero o leche desnatada.

5 Etapa 4: Una etapa de tratamiento de reacción antígeno-anticuerpo para realizar un tratamiento para una reacción antígeno-anticuerpo de la muestra para inmunotinción, muestra que se ha sometido a las etapas 1 a 3, y una composición de anticuerpos que contiene un anticuerpo primario para inmunotinción. Las condiciones de incubación en la etapa de tratamiento de reacción antígeno-anticuerpo pueden determinarse dependiendo del rendimiento del anticuerpo, el tamaño de la muestra y otros. Por ejemplo, la incubación se realiza agitando durante un período de tiempo que varía de seis horas a cinco días y preferiblemente de dos a tres días. Además, la incubación se realiza preferiblemente a una temperatura de, por ejemplo, aproximadamente 4 °C. Un ejemplo específico de una concentración del anticuerpo primario en la composición de anticuerpos incluye una concentración de no menos de 4 µg/ml y no más de 40 µg/ml.

15 Etapa 5: Una etapa de limpieza de la muestra para inmunotinción, muestra que se ha sometido a la Etapa 4. La etapa de limpieza es, por ejemplo, el enjuague de la muestra con una solución que contiene al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en urea y derivados de urea a una concentración de no menos de 0,1 M y menos de 1 M. La cantidad de uso de la solución no se limita a ninguna cantidad específica, sino que es, por ejemplo, de 9 a 15 ml por cada 0,3 g de muestra y preferiblemente aproximadamente 12 ml por cada 0,3 g de muestra. La temperatura de la etapa de limpieza y el período de tiempo para la etapa de limpieza no están particularmente limitados. Preferiblemente, la muestra se enjuaga sacudiendo a temperatura ambiente durante aproximadamente una hora.

25 Etapa 6: Una etapa de tratamiento de reacción antígeno-anticuerpo para realizar un tratamiento para una reacción antígeno-anticuerpo de la muestra para inmunotinción, muestra que se ha sometido a la Etapa 5 y una composición de anticuerpos que contiene un anticuerpo secundario o de orden superior para inmunotinción. Las condiciones de incubación en la etapa de tratamiento de reacción antígeno-anticuerpo pueden determinarse dependiendo del rendimiento del anticuerpo, el tamaño de la muestra y otros. Por ejemplo, la incubación se realiza agitando durante un período de tiempo que varía de seis horas a cinco días y preferiblemente de dos a tres días. Además, la incubación se realiza preferiblemente a una temperatura de, por ejemplo, aproximadamente 4 °C. Un ejemplo específico de una concentración del anticuerpo secundario o de orden superior en la composición de anticuerpos incluye una concentración de no menos de 1 µg/ml y no más de 10 µg/ml.

35 Etapa 7: Una etapa de limpiar la muestra para inmunotinción, muestra que se ha sometido a la Etapa 6. Más específicamente, la etapa 7 se realiza de la misma manera que en la Etapa 5.

40 Etapa 8: Una etapa de visualización de una reacción antígeno-anticuerpo de la muestra para la inmunotinción, muestra que se ha sometido las Etapas 1 a 7 (la Etapa 8 se realiza si surge la necesidad). Por ejemplo, en un caso en el que el anticuerpo primario o el anticuerpo secundario o de orden superior se marca con una enzima tal como fosfatasa alcalina, la muestra se puede hacer reaccionar en un sustrato de la enzima, con el resultado de que se produce la pigmentación de la muestra con un colorante generado por la reacción para la visualización. En un caso donde el anticuerpo primario o el anticuerpo secundario o de orden superior se marcan con un colorante fluorescente tal como fluoresceína o rodamina, la muestra se observa en la Etapa 9, la cual describe más adelante, a través de un microscopio de fluorescencia mientras se visualiza directamente mediante el microscopio de fluorescencia.

45 Etapa 9: Una etapa de observación de observar la muestra inmunoteñida para inmunotinción, muestra que se ha sometido a las Etapas 1 a 8, a través de un microscopio óptico. La etapa de observación se puede realizar con el uso de cualquier tipo de microscopio óptico. En un caso en el que la muestra para inmunotinción debe observarse tridimensionalmente, la etapa de observación puede realizarse empleando, por ejemplo, una técnica de microscopía de superresolución tridimensional (por ejemplo, STED, 3D PALM, FPALM, 3D STORM o SIM). Preferiblemente, la etapa de observación se realiza empleando una técnica de microscopía óptica de tipo de excitación multi-fotón (generalmente, de tipo de excitación bifotónica).

50 En el esquema de flujo anterior, si se realiza la Etapa 4 y se omite la Etapa 6, la composición de anticuerpos usada en la Etapa 4 es la composición de anticuerpos de acuerdo con la presente invención. En un caso en el que se realizan tanto las Etapas 4 como 6, al menos una de las composiciones de anticuerpos usadas en las Etapas 4 y 6 es la composición de anticuerpos de acuerdo con la presente invención. Preferiblemente, las dos composiciones de anticuerpos usadas en las Etapas 4 y 6 son la composición de anticuerpos de acuerdo con la presente invención.

60 Obsérvese que, en el esquema de flujo anterior, la muestra para inmunotinción puede someterse a un tratamiento de limpieza en la Etapa 1 o antes de la Etapa 1. El tratamiento de limpieza es, por ejemplo, el descrito en la publicación internacional PCT N.º WO 2011/111876 A1 (Solicitud de patente de los Estados Unidos N.º 13/583.548) en la cual se realiza un tratamiento de limpieza en una muestra con un reactivo de aclarado para un material biológico,

conteniendo el reactivo, como componente activo, al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en urea y derivados de urea. El compuesto es idéntico a un compuesto que constituye la composición de anticuerpos de acuerdo con la presente invención. Sin embargo, la concentración del compuesto usado en el tratamiento de limpieza es preferiblemente no menos de 1 M y no más de 8,5 M, más preferiblemente no menos de 3 M y no más de 5 M, más preferiblemente no menos de 3,5 M y no más de 4,5 M, y particularmente preferiblemente no menos de 3,7 M y no más de 4,3 M. Un tiempo de procesamiento para el cual se realiza el tratamiento de limpieza no está particularmente limitado, pero está, por ejemplo, dentro de un intervalo de no menos de dos horas y no más de un año, preferiblemente dentro de un intervalo de no menos de dos horas y no más de seis meses, más preferiblemente dentro de un intervalo de no menos de 72 horas y no más de 21 días.

Un tratamiento de limpieza que utiliza el "reactivo limpiador para hacer que un material biológico sea transparente" es reversible. Como tal, un material biológico que ha sido sometido al tratamiento de limpieza puede devolverse al estado que tenía antes del tratamiento de limpieza, por ejemplo, sumergiendo el material biológico en una solución salina de equilibrio para eliminar del mismo los componentes del reactivo de limpieza. Aquí, los ejemplos específicos de la solución salina de equilibrio abarcan: soluciones salinas de equilibrio (por ejemplo, PBS y HBSS) que están tamponadas con fosfato; una solución salina de equilibrio (TBS) que se tampona con hidrócloruro de tris; un líquido cefalorraquídeo artificial (ACSF); y medios basales para el cultivo celular, tales como MEM, DMEM y F-12 de Ham. El tiempo durante el cual el material biológico está sumergido en la solución salina de equilibrio no está particularmente limitado, pero es, por ejemplo, de dos horas a 24 horas. El tratamiento de inmersión se realiza a una temperatura, por ejemplo, en un intervalo de aproximadamente 4 °C a temperatura ambiente y preferiblemente a aproximadamente 4 °C o temperatura ambiente.

Al realizar la inmunotinción con el uso de una composición de anticuerpos de acuerdo con la presente invención en una muestra que se ha sometido al tratamiento de limpieza con el uso del reactivo de limpieza anterior para un material biológico, es posible realizar una inmunotinción con una sensibilidad más alta. Obsérvese que incluso en un caso en el que una muestra que se ha sometido al tratamiento de limpieza se devuelve al estado que la muestra tenía antes del tratamiento de limpieza y luego se somete a inmunotinción, se produce un efecto similar.

(Ejemplificación del aspecto específico de la presente invención)

Un aspecto específico de la presente invención es cualquiera de los aspectos descritos a continuación. Un aspecto específico de la presente invención potencia la propiedad de infiltración de un anticuerpo con respecto a un biomaterial y, por lo tanto, es útil para el análisis de la estructura tridimensional de un sujeto en, por ejemplo, análisis de inmunohistoquímica. Esto permite analizar tridimensionalmente un tejido patológico, que se analizó bidimensionalmente en el pasado. Esto puede servir como una función útil en la comprensión de una afección patológica de una enfermedad y elevar la posibilidad de un nuevo desarrollo de fármacos.

(1) Una composición de anticuerpos que incluye:

al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en urea y derivados de urea; y un anticuerpo,

estando el compuesto contenido en la composición del anticuerpo a una concentración de no menos de 0,1 M y menos de 1 M,

siendo la composición de anticuerpos una solución.

(2) La composición de anticuerpos como se expone en (1), en la que el compuesto está contenido en una concentración no menos de 0,2 M y no más de 0,5 M.

(3) La composición de anticuerpos como se expone en (1) o (2), que además incluye:

un tensioactivo.

(4) La composición de anticuerpos como se expone en (3), en la que el tensioactivo es un tensioactivo no iónico.

(5) La composición de anticuerpos como se expone en (4), en la que el tensioactivo no iónico es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en Triton X (marca registrada), Tween (marca registrada) y NP-40 (nombre del producto).

(6) La composición de anticuerpos como se expone en una cualquiera de (3) a (5), en la que el tensioactivo está contenido en una concentración de no menos de 0,025 % (p/v) y no más de 0,2 % (p/v).

(7) La composición de anticuerpos como se expone en una cualquiera de (1) a (6), en la que el anticuerpo está contenido en una concentración de no menos de 0,05 µg/ml y no más de 100 µg/ml.

(8) La composición de anticuerpos como se expone en una cualquiera de (1) a (7), en la que la urea está contenida como el compuesto.

5 (9) La composición de anticuerpos como se expone en una cualquiera de (1) a (8), en la que el anticuerpo es un anticuerpo para inmunotinción.

(10) Un kit para la preparación de una composición de anticuerpos, que incluye:

10 una solución que contiene al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en urea y derivados de urea; y

un manual de instrucciones para el kit,

15 incluyendo el manual de instrucciones las siguientes instrucciones:

1) mezclar la solución y un anticuerpo para preparar una composición de anticuerpos; y

20 2) preparar la composición de anticuerpos de modo que la concentración final del compuesto en la composición de anticuerpos no sea menos de 0,1 M y sea menos de 1 M.

(11) El kit como se expone en (10), en el que la solución contiene un tensioactivo de modo que una concentración final del tensioactivo en la composición de anticuerpos no es menos de 0,025 % (p/v) y no más de 0,2 % (p/v).

25 (12) El kit como se expone en (10) u (11), en el que la solución es un tampón

(13) El kit como se expone en cualquiera de (10) a (12), incluyendo además:

30 una solución de anticuerpos.

(14) Un método de inmunotinción que incluye:

35 una etapa de poner una composición de anticuerpos como se expone en (9) y un material biológico en contacto entre sí.

Ejemplos

40 A continuación se describirá específicamente adicionalmente la presente invención con referencia a Ejemplos, Ejemplos Comparativos, etc. Sin embargo, la presente invención no está limitada a estos.

[Ejemplo 1: Efecto promotor de la permeabilidad a anticuerpos de la composición de anticuerpos de acuerdo con la presente invención]

45 En el presente ejemplo, la tinción de un hipocampo completo de un ratón ICR de 3 semanas de edad (adquirido en Japan SLC, Inc.) se llevó a cabo con el uso de NeuN-Cy5 y GFAP-Cy3 de la manera que se describe a continuación. Específicamente, en la etapa de preparación de la muestra realizada antes de la tinción, se sumergió un hipocampo derecho de un cerebro de ratón en una solución A y luego se agitó durante siete días a temperatura ambiente. Después de eso, el hipocampo derecho se sometió a tratamiento de inmersión en 1X PBS durante doce horas. Un hipocampo izquierdo derivado del mismo cerebro se sumergió durante 7,5 días en un PBS 1X y se agitó a 4 °C para evitar el deterioro de un tejido del mismo. Obsérvese que la solución A es una solución acuosa preparada disolviendo 4M de urea, 0,1 % (p/v) de Triton X-100 y 10 % (p/v) de glicerol en agua pura.

55 Posteriormente, se obtuvieron composiciones de anticuerpos diluyendo anticuerpos individuales con 1 ml de PBS 1X y se obtuvieron otras composiciones de anticuerpos diluyendo anticuerpos individuales con 1 ml de solución de tratamiento de anticuerpos (solución de Ab). A continuación, las diferentes combinaciones de estas composiciones de anticuerpos y los hipocampos preparados mediante el tratamiento descrito anteriormente se agitaron a 4 °C durante cuatro días, reaccionando entre sí para la tinción. Obsérvese que los anticuerpos usados en el presente Ejemplo son (i) un anticuerpo monoclonal de ratón anti-GFAP marcado con colorante Cy3 (Sigma, Clon GA-5, denominado GFAP-Cy3) cuyo antígeno es GFAP que sirve como marcador de un astrocito y (ii) un anticuerpo monoclonal de ratón anti-NeuN (Millipore, denominado NeuN-Cy5) que se auto-marcó con un colorante reactivo Cy5 (GE Healthcare). En cuanto al anticuerpo monoclonal de ratón anti-NeuN, su antígeno es un factor de transcripción específico de una neurona. Obsérvese que cada una de las composiciones de anticuerpos anteriores estaba compuesta de una solución de anticuerpos que contenía uno cualquiera de los anticuerpos (i) y (ii) y una solución de tratamiento (PBS o una solución de tratamiento de anticuerpo), ambos mezclados en una relación de volumen de

1:300, y una concentración de anticuerpo del mismo fue la siguiente: la concentración de GFAP-Cy3 es 7 µg/ml y la concentración de NeuN-Cy5 es 3 µg/ml. Además, la solución de tratamiento de anticuerpos es una solución acuosa compuesta de urea 0,33 M, Triton X-100 al 0,1 % (p/v) y PBS 1X.

5 Después de la tinción, los tratamientos se llevaron a cabo de acuerdo con un flujo de operación como se describe a continuación. Específicamente, los hipocampos se enjuagaron con las soluciones individuales usadas para la dilución de los anticuerpos y luego se refinaron, después de lo cual los hipocampos se trataron en la solución A a temperatura ambiente durante dos días. Luego, el hipocampo así tratado se montó con el uso de 0,35 % (p/v) de agarosa. Posteriormente, los hipocampos (cortes ópticos de 7 µm de espesor) se sometieron a observación continua
10 multipunto, desde sus superficies hasta las partes profundas de los mismos, mediante un microscopio confocal de barrido láser FV1000 (Olympus) equipado con una lente de objetivo de inmersión en agua de aumento 20 (Olympus, WD: 2 mm, NA: 0,95), después de lo cual el análisis de imágenes se llevó a cabo mediante el software de análisis llamado Volocity (Perkin Elmer). Obsérvese que la observación se realizó en la solución A.

15 <Flujo de operación después de la tinción>

Primero, después de la incubación para la tinción, los hipocampos se enjuagaron mediante agitación con PBS (12 ml por cada 0,3 g de tejido hipocampal) o con la solución de tratamiento de anticuerpos descrita anteriormente a temperatura ambiente durante una hora. En segundo lugar, los hipocampos se enjuagaron mediante agitación con una solución de mezcla (12 ml por cada 0,3 g de tejido hipocampal) de albúmina de suero bovino (BSA) 2,5 % (p/v),
20 Tween 20 0,05 % (p/v) y 0,1 X PBS a temperatura ambiente durante una hora. Finalmente, los hipocampos se refinaron, mediante agitación, en un PFA-PBS al 4 % (12 ml por cada 0,3 g de tejido del hipocampo) a temperatura ambiente durante una hora.

25 Los resultados se muestran en la Fig. 1. Los anticuerpos alcanzaron porciones más profundas de ambos hipocampos (inferiores en la Fig. 1) sometidos al tratamiento de inmersión en la solución A en la etapa de preparación de la muestra, en comparación con los hipocampos (superiores en la Fig. 1) sometidos al tratamiento de inmersión en PBS, y se observó un reconocimiento antigénico significativo del mismo. Particularmente, para los anticuerpos diluidos con la solución de tratamiento de anticuerpos y a los que se les dejó reaccionar, se observó que
30 los anticuerpos penetraron y alcanzaron una porción más profunda (una profundidad de aproximadamente 2 mm desde la superficie), en comparación con los anticuerpos diluidos con el PBS y que se dejaron reaccionar (una profundidad de aproximadamente 1.5 mm desde la superficie).

35 **[Ejemplo 2: propiedades de tinción del anticuerpo monoclonal anti-GFAP con respecto al cerebro de ratón de la línea YFP-H]**

Un cerebro completo de un ratón de línea YFP-H de 8 semanas de edad (proporcionado por el profesor Josh Sanes de la Universidad de Harvard, Estados Unidos [referencia] Feng et al. Neuron, 28: 41-51, 2000) se sometió a tratamiento de inmersión en la solución A durante un mes y luego se sometió a tratamiento de inmersión en PBS 1X
40 durante tres horas. A continuación, el cerebro se tiñó con una composición de anticuerpos que se preparó diluyendo un anticuerpo monoclonal de ratón anti-proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP) marcado con colorante Cy3 (GFAP) (Sigma, Clon GA-5) con 1 ml de solución de tratamiento de anticuerpos (idéntica la usada en el Ejemplo 1). Como en el Ejemplo 1, la composición de anticuerpos estaba compuesta de una solución de anticuerpos que contenía el anticuerpo y la solución de tratamiento de anticuerpos, ambas mezcladas en una relación de volumen de 1:300 y
45 una concentración de anticuerpo de la misma era 7 µg/ml. La tinción se llevó a cabo de tal manera que la composición de anticuerpos y el cerebro del ratón preparados mediante el tratamiento descrito anteriormente se agitaron a 4 °C durante cinco días mientras coexistían entre sí.

Después de la tinción, los tratamientos se llevaron a cabo de la misma manera que en el Ejemplo 1. Específicamente, el cerebro se enjuagó con la solución de tratamiento de anticuerpos y luego se volvió a fijar, después de lo cual el cerebro se trató en la solución A a temperatura ambiente durante dos días. Después, el cerebro así tratado se montó con el uso de agarosa 0,35 % (p/v). Posteriormente, se observó el cerebro (corte óptico de 7 µm de espesor) desde arriba de la superficie del mismo a través de un microscopio vertical confocal de barrido láser FV1000 (Olympus) equipado con una lente de objetivo de inmersión en agua de aumento 20 (Olympus; WD: 2
50 mm, NA: 0,95) ("a" en la Fig. 2). Obsérvese que la observación se realizó en la solución A. Como resultado de la observación, las señales de GFAP se detectaron en un intervalo desde la superficie del cerebro hasta una profundidad de 2,1 mm (en la Fig. 2, una vista lateral en "b"). En la figura 2, los paneles 1 a 5 en "b" son vistas en sección transversal tomadas a las profundidades correspondientes a las líneas de puntos dibujadas en la vista lateral en "b".
55

60 Además, los cerebros anteriores (cortes ópticos de 7 µm de espesor) se observaron a través de un microscopio vertical de tipo barrido láser multifotónico FV1000 (Olympus) equipado con una lente de objetivo de inmersión en agua de aumento 25 (Olympus; WD: 4 mm, NA: 1.0) y láser bifotónico ("c" en la Fig. 2). Una longitud de onda del láser bifotónico usada en esta observación fue de 920 nm y la observación se realizó en la solución A. Esto permitió
65 la excitación simultánea de los colorantes YFP y Cy3 y la detección simultánea de señales separadas derivadas de dos tintes. Como resultado de la observación, las señales de GFAP se detectaron en un intervalo desde la superficie

del cerebro hasta una profundidad de 3,5 mm correspondiente al hipocampo CA1-CA3 (en la figura 2, una vista lateral en "c").

[Ejemplo 3: Propiedades de tinción del anticuerpo monoclonal anti-neurofilamento con respecto al hipocampo de ratón]

De la misma manera que en el Ejemplo 1, en la etapa de preparación de la muestra realizada antes de la tinción, se sometió a inmersión en la solución un hipocampo completo de un ratón C57BL6/J de 9 semanas de edad (adquirido de Japan SLC, Inc.) y luego se sometió a un tratamiento de inmersión en PBS 1X. Después, el hipocampo se tiñó cada uno con una composición de anticuerpos que se preparó diluyendo un anticuerpo monoclonal de ratón anti-neurofilamento marcado con colorante Alexa Fluor 488 (Millipore) con 1 ml de solución de tratamiento de anticuerpo (idéntica a la utilizada en el Ejemplo 1). En cuanto al anticuerpo monoclonal de ratón anti-neurofilamento marcado con colorante Alexa Fluor 488 (Millipore), su antígeno es un neurofilamento que sirve como marcador de una neurona. Como en el Ejemplo 1, la composición de anticuerpos estaba compuesta por una solución de anticuerpos que contenía el anticuerpo y la solución de tratamiento de anticuerpos, ambas mezcladas en una relación de volumen de 1:300 y una concentración de anticuerpo de la misma era 10 µg/ml. La tinción se llevó a cabo de tal manera que la composición de anticuerpos y el hipocampo de ratón preparado mediante el tratamiento descrito anteriormente se agitaron a 4 °C durante 3,5 días mientras coexistían entre sí.

Después de la tinción, los tratamientos se llevaron a cabo de la misma manera que en el Ejemplo 1. Específicamente, el hipocampo se enjuagó con la solución de tratamiento de anticuerpos y después se volvió a fijar, después de lo cual se montó el hipocampo con el uso de agarosa 0,35 % (p/v). Posteriormente, se observó el hipocampo (corte óptico de 6 µm de espesor) por encima de la superficie del mismo a través de un microscopio vertical confocal de tipo barrido láser FV1000 (Olympus) equipado con una lente objetivo de inmersión en agua de potencia 20 (Olympus; WD: 2 mm, NA: 0,95) (Fig. 3). Obsérvese que la observación se realizó en la solución A (ver Ejemplo 1). Como resultado de la observación, se detectaron señales fibrosas de neurofilamento, que se compone principalmente de dendritas y axones, en un intervalo desde la superficie del hipocampo hasta una profundidad de 1,3 mm (que recorre un espesor casi completo del hipocampo) (una vista lateral en la Fig. 3). En la figura 3, tres paneles 1 a 3 en la figura 3 son vistas en sección transversal tomadas en las profundidades correspondientes a líneas de puntos dibujadas en la vista lateral de la figura 3.

[Ejemplo 4: Inmunotinción de marcadores de células madre neurales con respecto a células madre neurales, neuroesferas, derivadas del hipocampo de rata adulta]

Después de preparación a partir de una rata de 8 a 10 semanas de edad, las células madre neurales derivadas del hipocampo que mantienen la purificación y el pase se dispersaron en un medio de cultivo y luego se sometieron a cultivo en suspensión durante 12 días basándose en las descripciones de referencia (Doetsch et al. Cell, 97: 703-716, 1999) para formar neuroesferas. La neuroesfera es un grupo de células fuertemente agregadas. Por lo tanto, existe una dificultad para infiltrar anticuerpos en la neuroesfera. La neuroesfera, a pesar de su tamaño relativamente pequeño, se somete a inmunotinción con dificultad. Este grupo de células esféricas (neuroesferas) se fijaron en un PFA-PBS 4 %, después de lo cual las neuroesferas se reemplazaron por sacarosa-PBS 20 % (p/v) a 4 °C durante dos días y luego se sometieron a crioprotección. A continuación, las neuroesferas se incluyeron en un compuesto de OCT y se descongelaron. Posteriormente, las neuroesferas se limpiaron con 1X PBS y se refinaron en PFA-PBS al 4 % (p/v). Luego, las neuroesferas se sumergieron en la solución A, que es idéntica a la utilizada en el Ejemplo 1, se agitó a temperatura ambiente durante tres días y luego se sometió a tratamiento de inmersión en 1X PBS durante una hora.

Posteriormente, las neuroesferas se tiñeron con dos tipos de composiciones de anticuerpos que contienen anticuerpos primarios. Las composiciones de anticuerpos usadas en la tinción fueron las siguientes:

1) Una composición de anticuerpos preparada diluyendo un anticuerpo monoclonal de ratón anti-nestina (BD Bioscience) con 1 ml de solución de tratamiento de anticuerpos (idéntica a la utilizada en el Ejemplo 1). La composición de anticuerpos estaba compuesta de una solución de anticuerpos que contenía el anticuerpo y la solución de tratamiento de anticuerpos, ambas mezcladas en una relación de volumen de 1:300, y una concentración de anticuerpo del mismo era de 6 µg/ml. Este anticuerpo reconoce una célula madre neural.

2) Una composición de anticuerpos preparada diluyendo un anticuerpo policlonal de conejo anti-doble cortina (abcam) con 1 ml de solución de tratamiento de anticuerpos (idéntica a la utilizada en el Ejemplo 1). La composición de anticuerpos estaba compuesta por una solución de anticuerpos que contenía el anticuerpo y la solución de tratamiento de anticuerpos, ambas mezcladas en una relación de volumen de 1:200, y una concentración de anticuerpo de la misma era de 7 µg/ml. Este anticuerpo reconoce una neurona inmadura.

La tinción se llevó a cabo de tal manera que cada una de estas composiciones de anticuerpos y la neuroesfera preparada mediante el tratamiento descrito anteriormente se agitaron a 4 °C durante dos días mientras coexistían entre sí. Posteriormente, cada uno de los anticuerpos primarios se enjuagó con la solución de tratamiento de anticuerpos anterior (12 ml por cada 0,3 g de tejido (neuroesfera)) mediante agitación de una hora a temperatura

ambiente.

Después de someterse al enjuague, las neuroesferas se tiñeron con (i) una composición de anticuerpos preparada diluyendo un anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con Alexa Fluor 488, como anticuerpo secundario, con 1 ml de la solución de tratamiento de anticuerpos anterior y (ii) una composición de anticuerpos preparada diluyendo un anticuerpo anti-IgG de conejo marcado con Alexa Fluor 633, como un anticuerpo secundario, con 1 ml de la solución de tratamiento de anticuerpo anterior. Obsérvese que estas composiciones de anticuerpo estaban compuestas cada una de una solución de anticuerpos que contenía el anticuerpo y la solución de tratamiento de anticuerpos, ambas mezcladas en una relación de volumen de 1:500, y las concentraciones de anticuerpos de las mismas eran cada una de 4 µg/ml. La tinción se llevó a cabo de tal manera que cada una de estas composiciones de anticuerpos y la neuroesfera se agitó luego a 4 °C durante 24 horas mientras coexistían entre sí. Posteriormente, cada uno de los anticuerpos secundarios se enjuagó con la solución de tratamiento de anticuerpos anterior (12 ml por cada 0,3 g de tejido (neuroesfera)) mediante agitación durante una hora a temperatura ambiente.

Posteriormente, la neuroesfera se tiñó con una composición de anticuerpos preparada diluyendo un anticuerpo monoclonal de ratón anti-GFAP-Cy3 (Sigma), que reconocía un astrocito, con 1 ml de solución de tratamiento de anticuerpos (idéntica a la utilizada en el Ejemplo 1). Esta composición de anticuerpos estaba compuesta por una solución de anticuerpos que contenía el anticuerpo y la solución de tratamiento de anticuerpos, ambas mezcladas en una relación en volumen de 1:300, y una concentración de anticuerpos de la misma era de 7 µg/ml. La tinción se llevó a cabo de tal manera que la neuroesfera se agitó a 4 °C durante 24 horas mientras que coexistía con la composición de anticuerpos, reaccionando de este modo con la composición de anticuerpos para la tinción. Después de eso, la neuroesfera se enjuagó y se volvió a fijar, después de lo cual la neuroesfera se sumergió en la solución A (véase el Ejemplo 1) y luego se agitó para la incubación a temperatura ambiente durante dos días. Finalmente, la neuroesfera así tratada se montó con el uso de agarosa 0,35 % (p/v).

La neuroesfera así montada se observó (con respecto a su corte óptico de 6 µm de espesor) en la solución A a través de un microscopio confocal vertical de barrido láser FV1000 (Olympus) equipado con una lente de objetivo de inmersión en agua de aumento 20 (Olympus; WD: 2 mm, NA: 0,95).

Fue posible observar de forma completa toda la neuroesfera (aproximadamente 400 µm de diámetro) cubriendo todos los intervalos desde su superficie hasta las partes internas. Fue posible detectar qué tipo de células estaban presentes en la neuroesfera y la localización de la célula y se observó que las células madre neurales estaban distribuidas de manera desigual sobre la superficie de la neuroesfera, mientras que las neuronas inmaduras diferenciadas de las células madre estaban presentes en el neuroesfera. En la figura 4, una vista en el lado izquierdo muestra una imagen fluoroscópica tridimensional preparada utilizando Volocity, y una vista en el lado derecho muestra una vista en sección transversal tomada en una posición correspondiente a un diámetro máximo de la neuroesfera.

[Ejemplo 5: Inmunotinción de una neurona de recién nacido en un cerebro de ratón maduro]

Un cerebro de un ratón transgénico GFP controlado por un promotor de nestina de 8 semanas de edad (ratón Nestin-GFP, Referencia: Yamamoto et al., Neuroreport, 11:1991-1996, 2000.), en el que las células madre neurales mostraron fluorescencia verde, se separó en los hemisferios izquierdo y derecho a lo largo de una línea media. El hemisferio cerebral se sumergió en la solución A de la misma composición que en el Ejemplo 1 y luego se agitó a temperatura ambiente durante aproximadamente 3 semanas, después de lo cual el hemisferio cerebral se sometió a tratamiento de inmersión en PBS 1X durante doce horas.

Posteriormente, el hemisferio cerebral se tiñó con dos tipos de composiciones de anticuerpos que contienen anticuerpos primarios. Las composiciones de anticuerpos usadas en la tinción fueron las siguientes:

1) Una composición de anticuerpos preparada diluyendo un anticuerpo monoclonal de ratón anti-GFAP-Cy3 (Sigma) con 1 ml de solución de tratamiento de anticuerpos (idéntica a la utilizada en el Ejemplo 1). La composición de anticuerpos estaba compuesta de una solución de anticuerpos que contenía el anticuerpo y la solución de tratamiento de anticuerpos, ambas mezclados en una relación en volumen de 1:400, y una concentración de anticuerpos de la misma era de 7 µg/ml.

2) Una composición de anticuerpos preparada diluyendo un anticuerpo policlonal de conejo anti-doblecortina (abcam) con 1 ml de solución de tratamiento de anticuerpos (idéntica a la utilizada en el Ejemplo 1). La composición del anticuerpo estaba compuesta de una solución de anticuerpos que contenía el anticuerpo y la solución de tratamiento de anticuerpos, ambas mezcladas en una relación en volumen de 1:200, y una concentración de anticuerpos de la misma era de 10 µg/ml. Este anticuerpo reconoce una neurona inmadura.

La tinción se llevó a cabo de tal manera que cada una de estas composiciones de anticuerpos y el hemisferio cerebral preparado mediante el tratamiento descrito anteriormente se agitaron a 4 °C durante cuatro días mientras coexistían entre sí. Posteriormente, cada uno de los anticuerpos primarios se enjuagó con la solución de tratamiento de anticuerpos anterior (12 ml por cada 0,3 g de tejido (hemisferio cerebral)) mediante agitación de una hora a

temperatura ambiente.

Después del enjuague de los anticuerpos primarios, el hemisferio cerebral se tiñó con (i) una composición de anticuerpos preparada diluyendo un anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con Alexa Fluor 488, como anticuerpo secundario, con 1 ml de solución de tratamiento de anticuerpos (idéntica a la usada en el Ejemplo 1) y (ii) una composición de anticuerpos preparada diluyendo un anticuerpo anti IgG de conejo marcado con Alexa Fluor 633, como un anticuerpo secundario, con 1 ml de solución de tratamiento de anticuerpos (idéntica a la utilizada en Ejemplo 1). Obsérvese que estas composiciones de anticuerpo estaban compuestas cada una de una solución de anticuerpos que contenía el anticuerpo y la solución de tratamiento de anticuerpos, ambas mezcladas en una relación de volumen de 1:500, y las concentraciones de anticuerpo de la misma eran cada una de 4 µg/ml. La tinción se llevó a cabo de tal manera que cada una de las composiciones de anticuerpos anteriores y el hemisferio cerebral se agitó a 4 °C durante dos días mientras coexistían entre sí. Posteriormente, cada uno de los anticuerpos secundarios se enjuagó con la solución de tratamiento de anticuerpos anterior (12 ml por cada 0,3 g de tejido (hemisferio cerebral)) mediante agitación durante cuatro días a temperatura ambiente.

Posteriormente, se volvió a fijar el hemisferio cerebral, después de lo cual el hemisferio cerebral se sumergió en la solución A (véase el Ejemplo 1) y luego se agitó para la incubación a temperatura ambiente durante dos días. Finalmente, el hemisferio cerebral así tratado se montó con su sección de corte mirando hacia arriba, usando agarosa 0,35 % (p/v) y luego se sumergió en la solución A.

El hemisferio cerebral así montado se observó en la solución A a través de un microscopio vertical confocal de barrido láser FV1000 (Olympus) equipado con una lente de objetivo de inmersión en agua de aumento 20 (Olympus, W.D.: 2 mm, NA: 0,95). La observación fue una observación multipunto realizada en 50 campos visuales, en la que la profundidad de observación fue de 1,6 mm y un corte óptico de 7 µm de espesor.

Para roedores maduros, se sabe que los nervios nacen (neurogénesis) a partir de células madre neurales que se presentan principalmente en dos regiones, es decir, el hipocampo y la zona subventricular. Las células madre neurales que crecen en una zona subventricular cerca de un ventrículo lateral se desplazan una gran distancia hacia un bulbo olfativo mientras se diferencian secuencialmente en blastos o neuronas inmaduras, y finalmente se incorporan en un tejido neural del bulbo olfatorio. Tal movimiento continuo se conoce como flujo migratorio rostral (RMS). El presente ejemplo demuestra que un grupo celular que constituye el RMS se identificó mediante inmunotinción.

Más específicamente, como se muestra en la Fig. 5, se demostró que se formaba una corriente celular continua de células madre neuronales diferenciándose en neuronas inmaduras mientras se avanzaba desde el ventrículo lateral como punto de partida. Además, se demostró que esta corriente estaba rodeada por un tubo o túnel formado por astrocitos ensamblados y movido a través del tubo o túnel. En la figura 5, las regiones respectivas rodeadas por cuadrados numerados del 1 al 4 se muestran junto con vistas de sus correspondientes imágenes fluoroscópicas tridimensionales obtenidas ampliando las regiones respectivas. La tinción, tal como se describió anteriormente, ha sido posible y se espera que sirva como un medio importante en un estudio exhaustivo sobre la diferenciación de las células madre neurales en un área profunda y amplia.

[Ejemplo 6: Inmunotinción de la terminación nerviosa del hipocampo del ratón]

Se fijó un hipocampo separado de un cerebro de un ratón ICR de 7 semanas de edad (adquirido de Japan SLC, Inc.) en un PFA-PBS 4 %, después de lo cual el hipocampo se sumergió en la solución A que se compuso como en el Ejemplo 1 y se agitó a temperatura ambiente durante 10 días. Después de eso, el hipocampo se sometió a tratamiento de inmersión en PBS 1X durante doce horas.

Posteriormente, el hipocampo así tratado se tiñó en su totalidad con una composición de anticuerpos preparada diluyendo un anticuerpo monoclonal de ratón anti-sinaptofisina marcado con Oyster 650 (Synaptic Systems), que reconoce una proteína que se presenta en una vesícula de un terminal presináptico, con 1 ml de solución de tratamiento de anticuerpos (idéntica a la utilizada en el Ejemplo 1). La composición del anticuerpo estaba compuesta de una solución de anticuerpos que contenía el anticuerpo y la solución de tratamiento de anticuerpos, ambas mezcladas en una relación en volumen de 1:200 y una concentración de anticuerpo de la misma era de 10 µg/ml. La tinción se llevó a cabo de tal manera que la composición de anticuerpos y el hipocampo se agitaron a temperatura ambiente durante tres días mientras coexistían entre sí.

Después de la tinción, el hipocampo se enjuagó con la solución de tratamiento de anticuerpos y luego se volvió a mezclar, después de lo cual el hipocampo se sumergió en la solución A (véase el Ejemplo 1) y luego se agitó para incubación a temperatura ambiente durante dos días. Finalmente, el hipocampo así tratado se montó con su circonvolución dentada mirando hacia arriba usando agarosa 0,35 % (p/v) y después se sumergió en la solución A.

Posteriormente, se observó el hipocampo montado de esta manera en la solución A a través de un microscopio confocal vertical de barrido láser FV1000 (Olympus) equipado con una lente de objetivo de inmersión en agua de aumento 20 (Olympus, W.D.: 2 mm, NA: 0,95). La observación se realizó de modo que la profundidad de

observación fuera de 1,4 mm, y un corte óptico de 5 μm de espesor (véase también “a” en la Fig. 6).

Los axones de células granulares que se originan en la circunvolución dentada permiten que se proyecten fibras musgosas características (fibra musgosa, MF) en la región CA3, formándose una sinapsis gigante entre los axones y las células piramidales de CA3. En la figura 6, se observan señales similares a partículas blancas en las vistas en sección transversal tomadas en las profundidades en “b” y “c”. Estas señales son señales de sinaptofisina que se presentan en una vesícula de una terminación nerviosa. Por lo tanto, se considera que la sinapsis gigante se forma en un sitio donde se detectaron las señales de sinaptofisina.

Como se muestra en la Fig. 6, se confirmó que el anticuerpo marcado con Oyster 650 infiltraba el tejido a las dos profundidades de 600 μm y 1300 μm . La tinción descrita anteriormente se ha hecho posible y, por lo tanto, permite evitar un proceso complicado de observar una gran cantidad de cortes sometidos a inmunotinción y observar, de inmediato, si se forman o no sinapsis en los destinos de proyección de las fibras nerviosas en varias regiones en un cerebro usando, por ejemplo, un tejido completo. Es decir, se puede considerar que la tinción, tal como se describió anteriormente, juega un papel importante a la hora de hacer un estudio eficaz en los circuitos neuronales.

[Ejemplo 7: Inmunotinción de β -amiloide en el hipocampo de un ratón que sobreexpresa la proteína precursora amiloide-presenilina 1]

De un cerebro de un ratón que sobreexpresa la proteína precursora de amiloide-presenilina de 23 meses de edad (Saito et al. Nature Neuroscience 14 (8):1023-1032, 2011), se preparó una muestra de cerebro que tenía tálamo desprendido de la misma y que tenía el hipocampo expuesto a la vista. La muestra de cerebro se fijó en PFA-PBS 4 %. Posteriormente, la muestra de cerebro se sumergió en la solución A de la misma composición que en el Ejemplo 1 y luego se agitó a temperatura ambiente durante 20 días, después de lo cual la muestra de cerebro se sometió a tratamiento de inmersión en PBS 1X durante 24 horas.

Posteriormente, el hipocampo así tratado se tiñó en su totalidad con (i) una composición de anticuerpos preparada diluyendo un anticuerpo monoclonal de ratón anti- β -amiloide marcado con AlexaFluor 488 (Covance, clon 6E10) con 1 ml de solución de tratamiento de anticuerpo (idéntica a la utilizada en el Ejemplo 1) y (ii) una composición de anticuerpos preparada diluyendo un anticuerpo monoclonal de ratón anti-GFAP-Cy3 (Sigma) con 1 ml de solución de tratamiento de anticuerpos (idéntica a la utilizada en el Ejemplo 1). La tinción se llevó a cabo de tal manera que cada una de estas composiciones de anticuerpos y el hipocampo se agitó a temperatura ambiente durante cuatro días mientras coexistían entre sí. La composición de anticuerpos que contenía el anticuerpo monoclonal de ratón anti- β -amiloide marcado con Alexa Fluor 488 estaba compuesta de una solución de anticuerpos que contenía el anticuerpo y la solución de tratamiento de anticuerpos, ambas mezcladas en una relación de volumen de 1:300 y una concentración de anticuerpos de la misma era de 10 $\mu\text{g/ml}$. La composición de anticuerpos que contenía el anticuerpo monoclonal de ratón anti-GFAP-Cy3 estaba compuesta de una solución de anticuerpos que contenía el anticuerpo y la solución de tratamiento de anticuerpos, ambas mezcladas en una relación de volumen de 1:400 y una concentración de anticuerpo de la misma era de 7 $\mu\text{g/ml}$.

Después de la tinción, el hipocampo se enjuagó con la solución de tratamiento de anticuerpos y luego se volvió a fijar, después de lo cual el hipocampo se sumergió en la solución A y luego se agitó para la incubación a temperatura ambiente durante dos días. Finalmente, el hipocampo así tratado se montó con su circunvolución dentada mirando hacia arriba usando agarosa 0,35 % (p/v) y después se sumergió en la solución A.

Posteriormente, se observó el hipocampo montado de esta manera en la solución A a través de un microscopio confocal vertical de barrido láser FV1000 (Olympus) equipado con una lente de objetivo de inmersión en agua de aumento 20 (Olympus, W.D.: 2 mm, NA: 0,95). La observación se realizó de forma que la profundidad de observación fuera de 2 mm y un corte óptico de 7 μm de espesor (véase también la Fig. 7). En la figura 7, los paneles 1 a 6 en “b” son vistas en sección transversal tomadas a las profundidades correspondientes a las líneas de puntos 1 a 6 dibujadas en “b” de la figura 7.

Se cree que la acumulación de β -amiloide es un factor importante que contribuye a la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer grave en humanos. Desde la vista que muestra una imagen inmunoteñida del ratón, se observa que existe una miríada de placas amiloides que consisten en β -amiloides grandes y pequeños en todas las regiones que abarcan desde la superficie del hipocampo hasta la porción profunda. Tal aspecto es significativamente diferente del de un tejido normal. Específicamente, se encuentra un aspecto patológico conocido como gliosis, en el cual los astrocitos, células positivas para GFAP, están densamente presentes alrededor de una gran placa. En la figura 7, “c” es una vista superior que muestra una imagen fluoroscópica tridimensional de un área rodeada por un cuadrado punteado en el panel 3 en “b”. En la figura 7, “d” es una vista lateral que muestra una imagen fluoroscópica tridimensional de la misma área.

Como se demuestra en el presente ejemplo, ha sido posible someter un tejido enfermo a inmunotinción de una manera colectiva. Esto proporciona un medio extremadamente eficaz para “una búsqueda exitosa de una patología sin una derrota inesperada” con el fin de realizar una búsqueda patológica más detallada que nunca.

Aplicabilidad industrial

La presente invención es aplicable a todas las industrias que usan reacciones antígeno-anticuerpo, que incluyen reactivos que contienen anticuerpos. Las aplicaciones de ejemplo de la presente invención incluyen reactivos que
5 usan reacciones antígeno-anticuerpo, aplicaciones de diagnóstico y desarrollo farmacéutico.

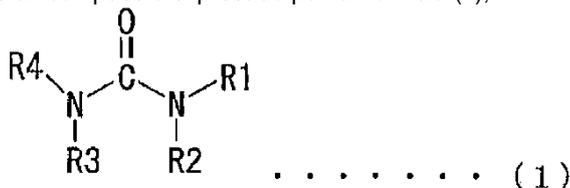
REIVINDICACIONES

1. Una composición de anticuerpos que es un reactivo para la inmunotinción, que comprende:

- 5 - al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en urea y derivados de urea; y
 - un anticuerpo,
 - una concentración total de dicho compuesto o compuestos seleccionados del grupo que consiste en urea y derivados de urea que no sea menos de 0,1 M y sea menos de 1 M,
 - siendo la composición del anticuerpo una solución,

10

en la que el derivado de urea es un compuesto expresado por la Fórmula (1),



15

en la que en la Fórmula (1), cada uno de R1, R2, R3 y R4 es independientemente un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno o un grupo hidrocarburo, donde se excluye aquel en el que todos de R1, R2, R3 y R4 son átomos de hidrógeno, y en un caso en el que el grupo hidrocarburo tiene una pluralidad de átomos de carbono, parte de los átomos de carbono pueden reemplazarse por un heteroátomo tal como un átomo de nitrógeno, un átomo de oxígeno o un átomo de azufre.

20

2. La composición de anticuerpos como se expone en la reivindicación 1, en la que el compuesto está contenido en una concentración de no menos de 0,2 M y no más de 0,5 M.

3. La composición de anticuerpos como se expone en la reivindicación 1 o 2, que comprende adicionalmente:

25

- un tensioactivo.

4. La composición de anticuerpos como se expone en la reivindicación 3, en la que el tensioactivo es un tensioactivo no iónico.

30

5. La composición de anticuerpos como se expone en la reivindicación 4, en la que el tensioactivo no iónico es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en Triton X (marca registrada), Tween (marca registrada) y NP-40 (nombre del producto).

35

6. La composición de anticuerpos como se expone en una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en la que el tensioactivo está contenido en una concentración de no menos de 0,025 % (p/v) y no más de 0,2 % (p/v).

7. La composición de anticuerpos como se expone en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el anticuerpo está contenido en una concentración de no menos de 0,05 µg/ml y no más de 100 µg/ml.

40

8. La composición de anticuerpos como se expone en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la urea está contenida como el compuesto.

9. La composición de anticuerpos como se expone en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que el anticuerpo es un anticuerpo para la inmunotinción.

45

10. Un kit para la preparación de una composición de anticuerpos que es un reactivo para inmunotinción, que comprende:

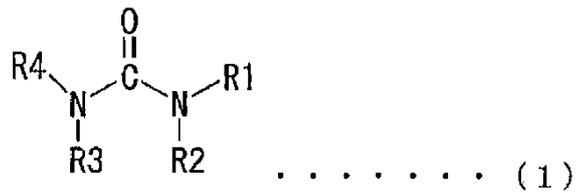
50

- una solución que contiene al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en urea y derivados de urea;
 - una solución de anticuerpos; y
 - un manual de instrucciones para el kit,
 - incluyendo el manual de instrucciones las siguientes instrucciones:

55

- 1) mezclar la solución y la solución de anticuerpos para preparar una composición de anticuerpos; y
 2) preparar la composición de anticuerpos de modo que una concentración final total del compuesto o los compuestos seleccionados del grupo que consiste en urea y derivados de urea no sea menos de 0,1 M y sea menos de 1 M,
 en la que el derivado de urea es un compuesto expresado por la Fórmula (1),

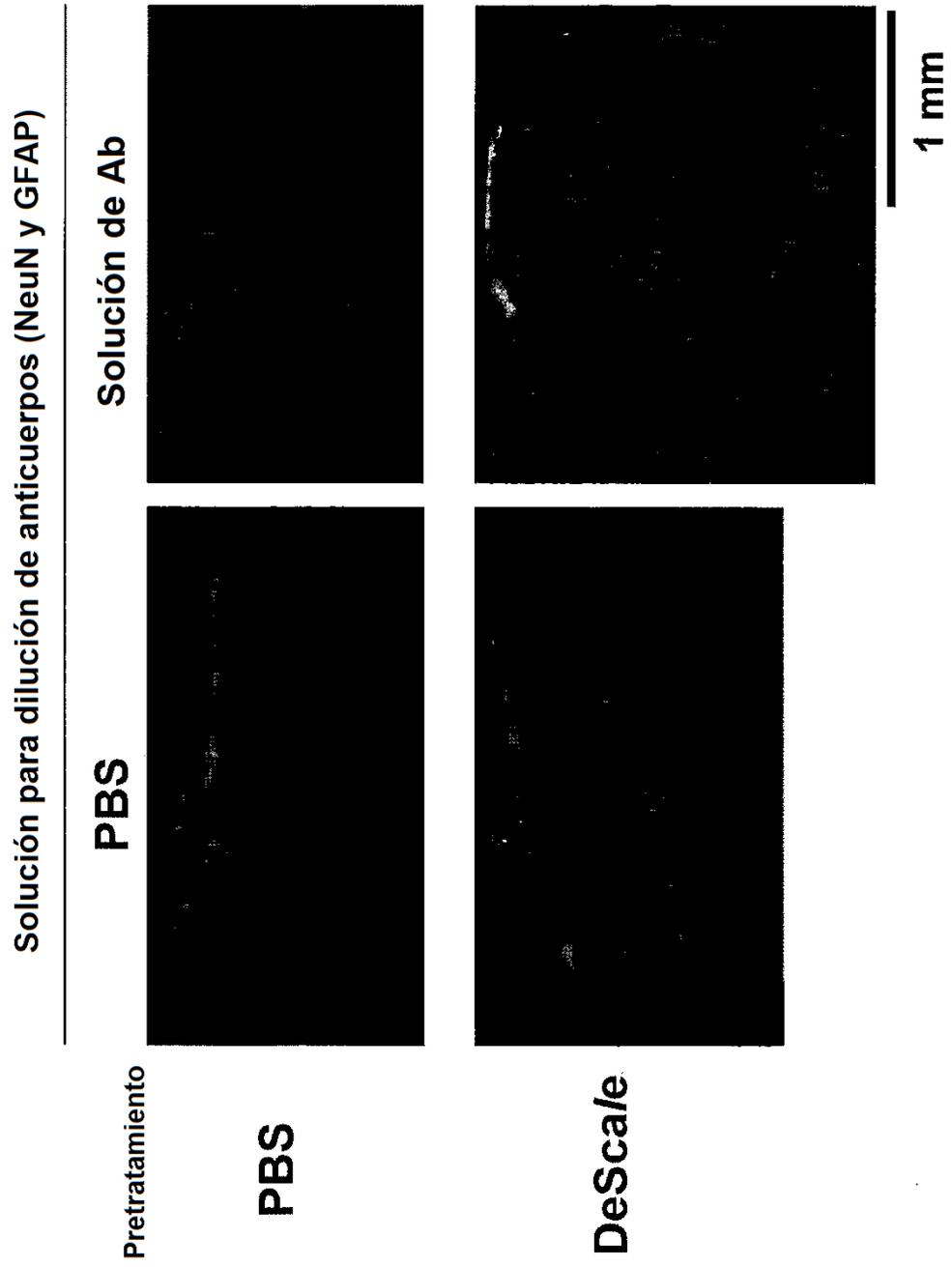
60



en la que en la Fórmula (1), cada uno de R1, R2, R3 y R4 es independientemente un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno o un grupo hidrocarburo, donde se excluye aquel en el que todos de R1, R2, R3 y R4 son átomos de hidrógeno, y en un caso en el que el grupo hidrocarburo tiene una pluralidad de átomos de carbono, parte de los átomos de carbono pueden reemplazarse por un heteroátomo tal como un átomo de nitrógeno, un átomo de oxígeno o un átomo de azufre.

- 5
- 10 11. El kit como se expone en la reivindicación 10, en el que la solución contiene un tensioactivo de modo que una concentración final del tensioactivo en la composición de anticuerpos no es menos de 0,025 % (p/v) y no más de 0,2 % (p/v).
- 12. El kit como se expone en la reivindicación 10 u 11, en el que la solución es un tampón.
- 15 13. Un método de inmunotinción que comprende:
 - una etapa de poner en contacto entre sí una composición de anticuerpos como se expone en la reivindicación 9 y un material biológico.

FIG. 1



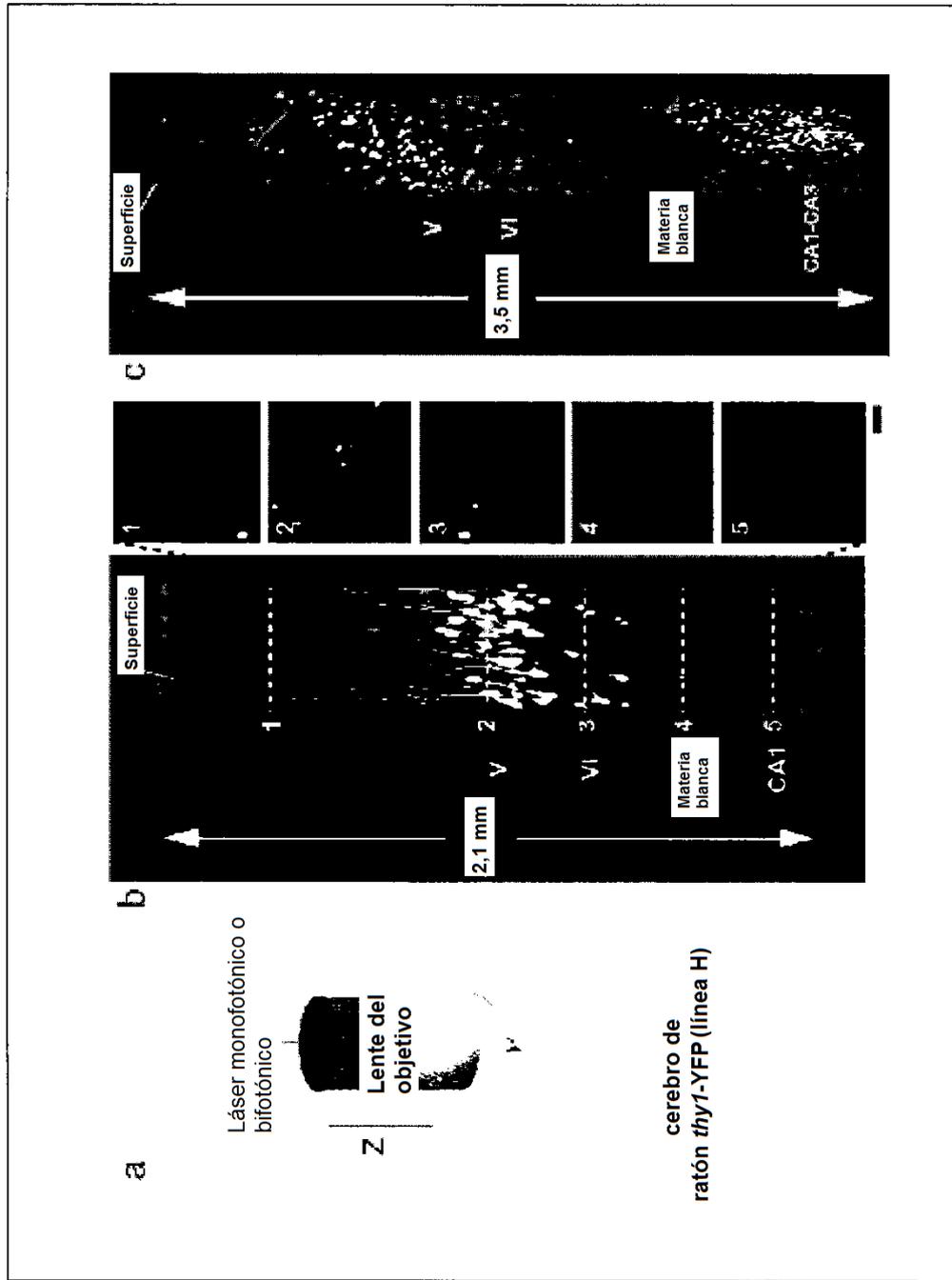
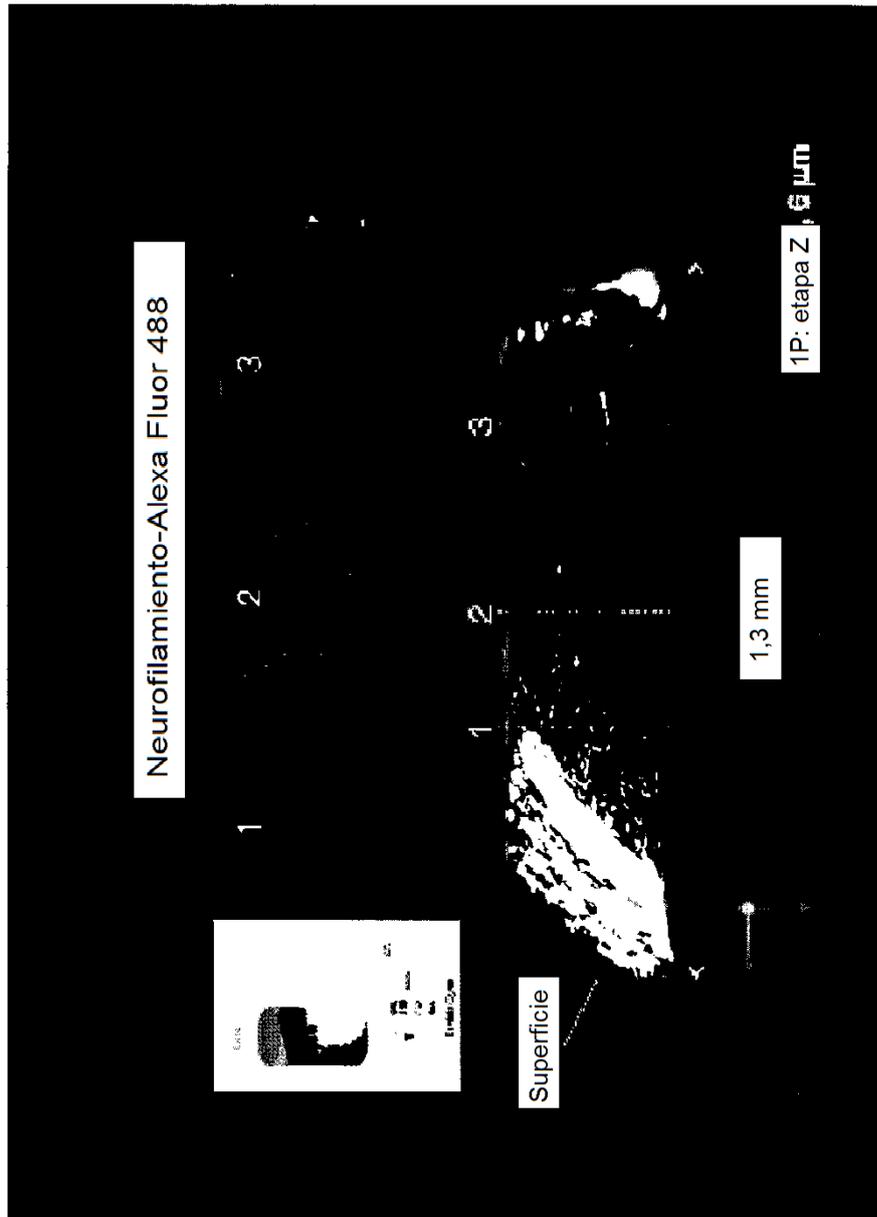


FIG. 2

FIG. 3



Nestina GFAP Doblecortina

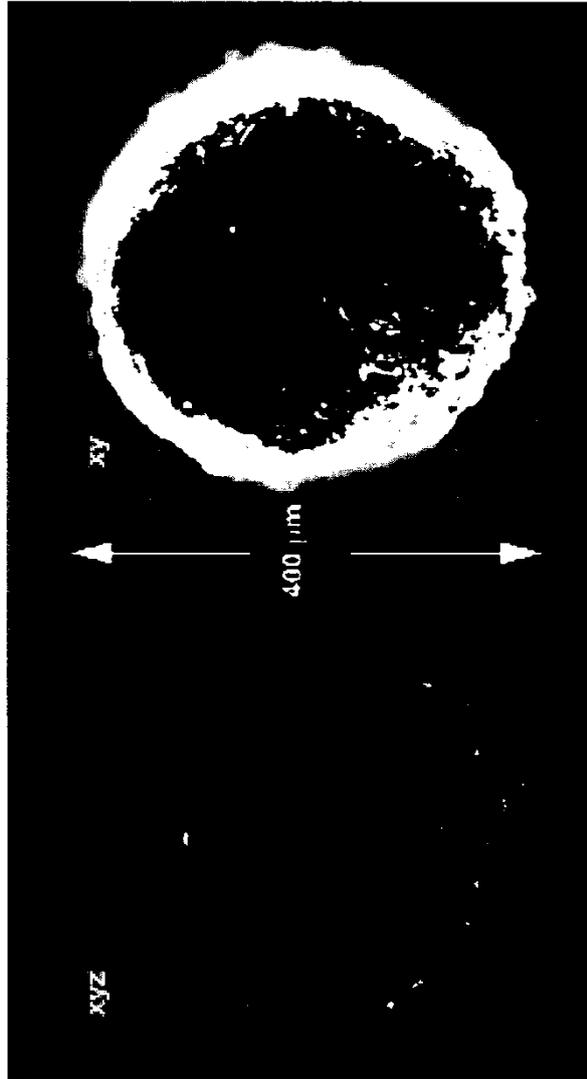


FIG. 4

FIG. 5

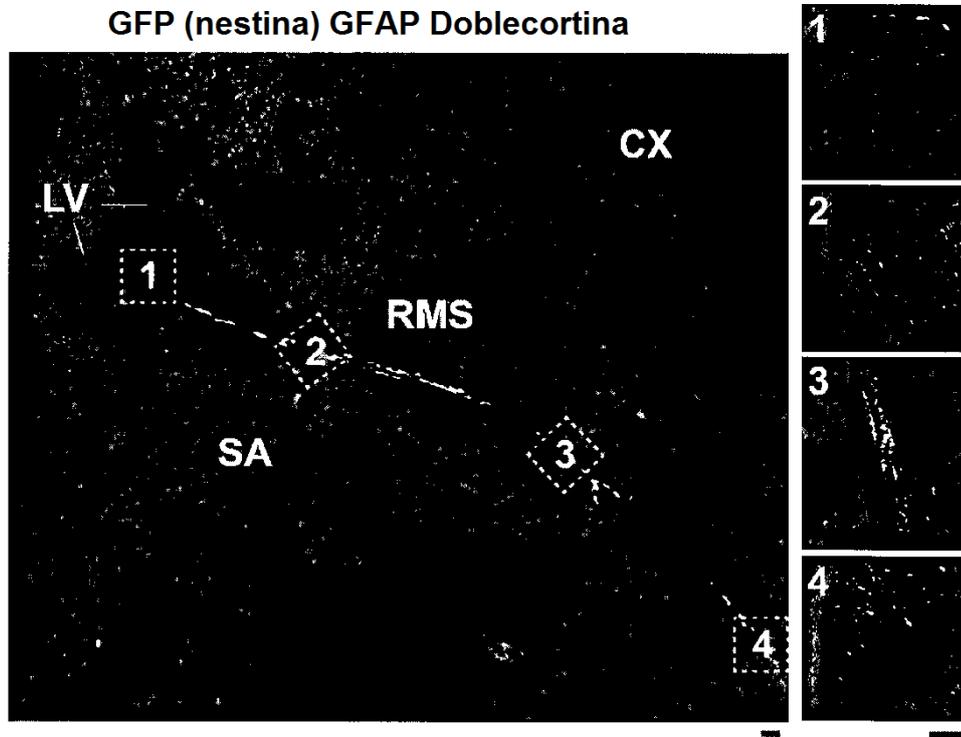
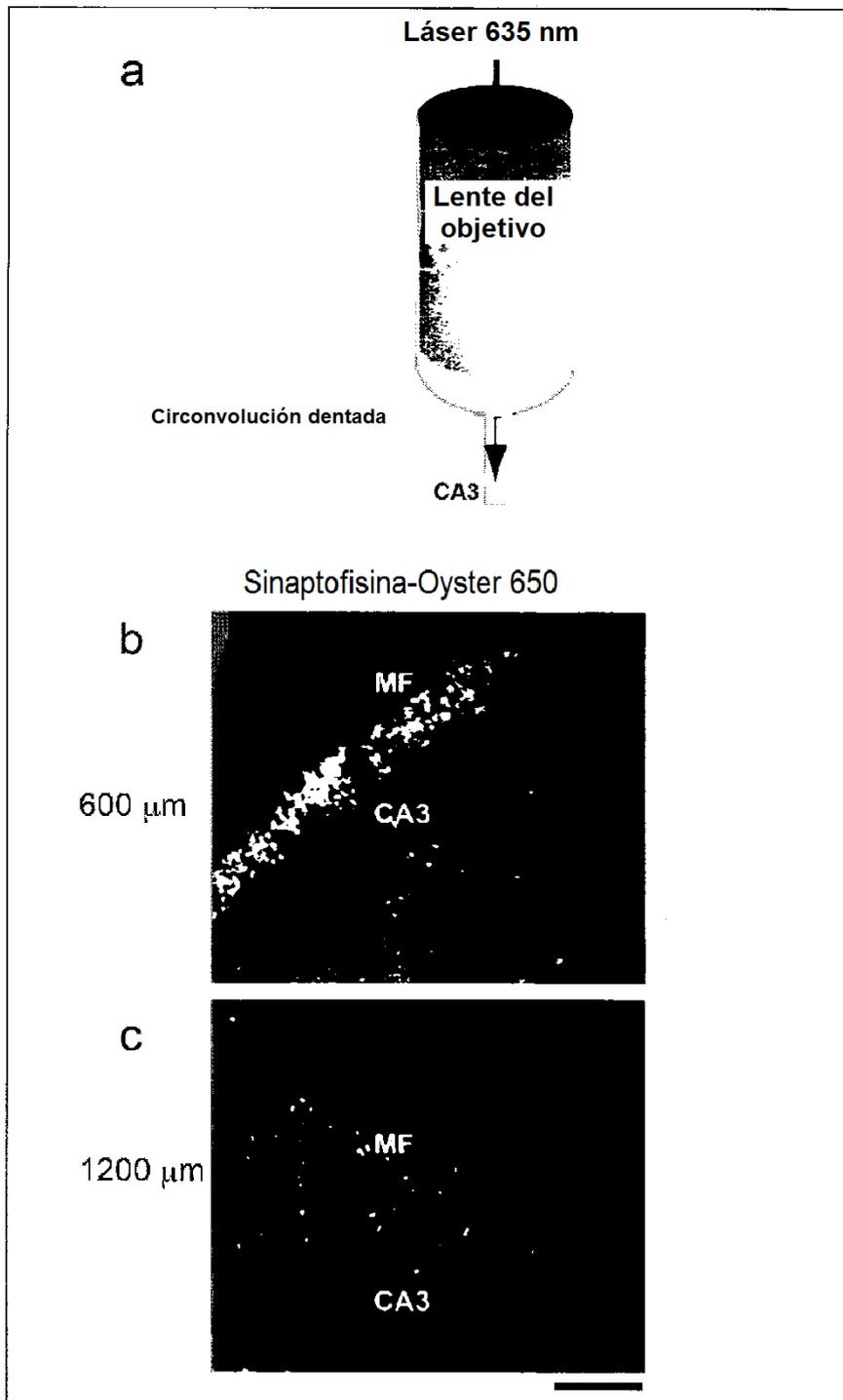


FIG. 6



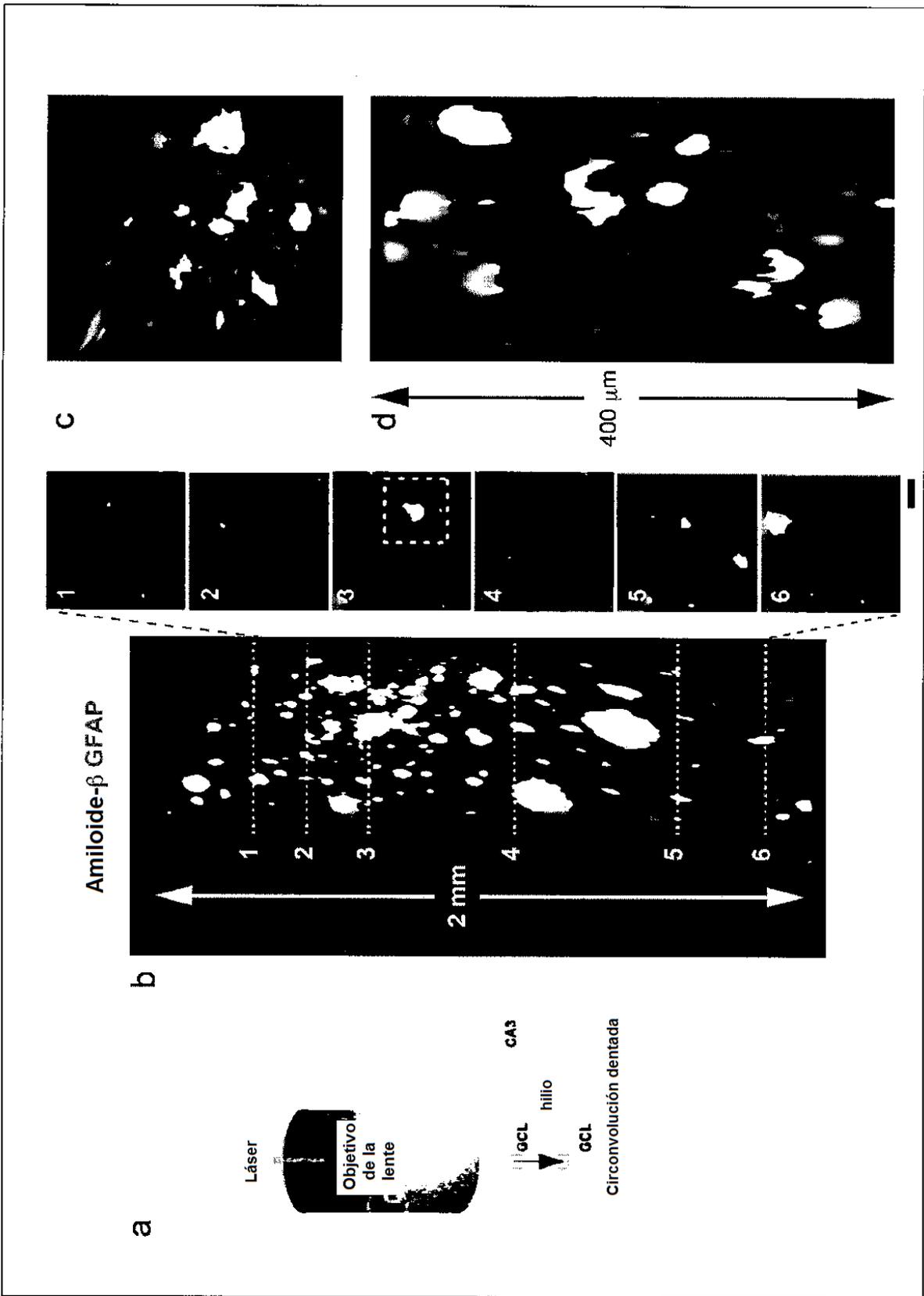


FIG. 7