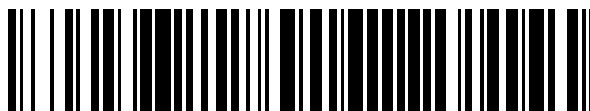


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 793 177**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/28 (2006.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.02.2014 PCT/JP2014/055004**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.09.2014 WO14133120**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2014 E 14756887 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2020 EP 2963123**

54 Título: **Kit de sustrato que contiene DAB para uso de tinción que se produce usando enzima de mercado**

30 Prioridad:
28.02.2013 JP 2013039672

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.11.2020

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

72 Inventor/es:
**KASAMATSU, TOSHIYUKI y
KITANO, YURIKO**

74 Agente/Representante:
ELZABURU, S.L.P

ES 2 793 177 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

Kit de sustrato que contiene DAB para uso de tinción que se produce usando enzima de marcado

5 La presente invención se refiere a un kit de sustrato que contiene diaminobencidina (DAB) que es capaz de suprimir la precipitación debido a la agregación de DAB en la disolución de sustrato que contiene DAB, reduciendo la tinción inespecífica, tal como la tinción de fondo, y mejorando la intensidad de la tinción específica, en la reacción cromogénica en inmunotinción, tal como tinción inmunohistoquímica (por sus siglas en inglés, IHC) o tinción inmunocitoquímica (por sus siglas en inglés, ICC), o en hibridación in situ (por sus siglas en inglés, ISH), utilizando anticuerpos marcados con aperoxidasa, con el uso de un líquido cromogénico que contiene DAB y su imidazol sensibilizador.

10 En el campo de la patología o la biología molecular, se utilizan diversos reactivos en líquidos cromogénicos para IHC, ICC o ISH, dependiendo de las enzimas marcadoras para la reacción cromogénica. La enzima marcadora más común es la peroxidasa, que es principalmente peroxidasa de rábano picante derivada de plantas (por sus siglas en inglés, HRP) (peso molecular de 40 a 45 kDa), como se describe en la publicación no de patente 1. Un donante de hidrógeno para la reacción enzimática de HRP para uso rutinario es disolución de sustrato que contiene DAB que contiene diaminobencidina (DAB), que desarrolla color marrón y peróxido de hidrógeno.

15 La disolución de sustrato que contiene DAB generalmente se proporciona en un sistema de dos o tres componentes (la DAB y el peróxido de hidrógeno generalmente se separan para evitar la reacción de la DAB), y están disponibles comercialmente en disoluciones madre altamente concentradas para la preparación al uso o comprimidos secos. Ejemplos de dichos productos comerciales son DAB líquida + sistema cromógeno de sustrato (código: K3468) (DAKO),
 20 DAB Quanto (código: TA-XXX-QHDX) (THERMO SCIENTIFIC), DAB estable (código: 750118) (LIFE TECHNOLOGIES) y kit de sustrato DAB (NICHIREI BIOSCIENCES, INC.). Las composiciones de la mayoría de dichos productos no se describen.

25 La publicación no de patente 1 describe el uso de imidazol como sensibilizador para la tinción de DAB. La experiencia ha demostrado que el imidazol es eficaz para acelerar la reacción de DAB pero, por otro lado, hace que la agregación de DAB provoque la precipitación de DAB en el líquido de reacción después de un cierto período de tiempo. También se ha demostrado que el efecto de alta sensibilización provoca una tinción inespecífica, tal como la tinción de fondo, en el área que no sea la sustancia objetivo en presencia de HRP en el tejido.

30 La publicación de patente 1 enseña que un tensioactivo no iónico puede estar contenido en una disolución de sustrato que contiene DAB según se desee, y las publicaciones de patente 2 y 3 enseñan que el EDTA puede estar contenido en una disolución de sustrato que contiene DAB. Sin embargo, no se discutió sobre los problemas con el imidazol en estas publicaciones.

La publicación de patente 4 describe un medio de deposición, que es un medio acuoso tamponado que tiene un pH de 4 a 9, que comprende un conjugado, un compuesto de peróxido y DAB.

35 La publicación de patente 5 describe una disolución que comprende una composición de disolvente desparafinado y una composición de reactivo liberador de aldehído que se usa para preparar una muestra antes de una reacción histoquímica.

Publicación de patente 1: Documento JP-3503890-B2

Publicación de patente 2: Documento CA-2417671-A1

Publicación de patente 3: Documento DE-3812605-A1

Publicación de patente 4: Documento WO 2010/094283 A1

40 Publicación de patente 5: Documento WO 02/23156 A1

Publicación no de patente 1: Hiroshi Nagura, Yoshiyuki Osamura, Yutaka Tsutsumi, "Watanabe-Nakane Kousou Koutai Hou (immunoenzymatic technique)", 4^ª ed., Interdisciplinary Planning (2002)

La presente invención es como se define en las reivindicaciones.

45 Es un objeto de la presente invención proporcionar un kit de sustrato que contiene DAB que sea capaz de mejorar la intensidad de la tinción específica y reducir la tinción inespecífica en la reacción cromogénica en la inmunotinción, tal como la tinción inmunohistoquímica o inmunocitoquímica, o en hibridación in situ, utilizando un anticuerpo marcado con peroxidasa, mediante el uso de una disolución de sustrato que contiene DAB que contiene DAB y su imidazol sensibilizador.

50 Es otro objeto de la presente invención proporcionar un kit de sustrato que contiene DAB que sea capaz de aumentar la intensidad de la tinción específica, suprimir la precipitación debido a la agregación de DAB en la disolución de sustrato que contiene DAB y reducir la tinción inespecífica, en la reacción cromogénica en inmunotinción o hibridación

in situ utilizando un anticuerpo marcado con peroxidasa, mediante el uso de una disolución de sustrato que contiene DAB que contiene DAB y su imidazol sensibilizador.

5 Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar un kit de sustrato que contiene DAB que mejore la intensidad de la tinción específica, reduzca la tinción inespecífica, como la tinción de fondo, y suprima la precipitación debido a la agregación de DAB en la disolución de sustrato que contiene DAB durante un período prolongado de tiempo, en reacción cromogénica en inmunotinción o hibridación in situ usando un anticuerpo marcado con peroxidasa, mediante el uso de una disolución de sustrato que contiene DAB que contiene DAB y su imidazol sensibilizador, con lo que se mejora la capacidad de uso y la estabilidad de almacenamiento del kit de sustrato.

10 Los presentes inventores han realizado investigaciones intensivas para lograr los objetos anteriores, para descubrir que la presencia de un agente quelante particular y un tensioactivo no iónico particular puede reducir la tinción inespecífica, por ejemplo, la tinción de fondo, que puede ocurrir cuando se usa portaobjetos de vidrio, incluso cuando se usa imidazol, que se conoce como sensibilizador, está contenido para una tinción específica mejorada en una composición de disolución de sustrato que contiene DAB comúnmente utilizada para el desarrollo del color en inmunotinción, tal como la técnica inmunoenzimática, o hibridación in situ. Además, la agregación de DAB en la
15 disolución de sustrato que contiene DAB preparada puede suprimirse, y la estabilidad de almacenamiento se mejora significativamente al proporcionar una disolución de sustrato en un sistema de dos o más componentes con composición ajustada, es decir, no se produce precipitación durante dos semanas desde la mezcla de las disoluciones de componentes cuando se almacenan en sombra a 4 °C, y se puede lograr una estabilidad comparable a la que se obtiene inmediatamente después de la preparación de la disolución de sustrato que contiene DAB. De este modo, la
20 presente invención se ha completado.

Como se usa en la presente memoria, la disolución de sustrato que contiene DAB significa disolución de sustrato obtenida mezclando, o mezclando y diluyendo, los componentes del kit de la presente invención. También como se usa en la presente memoria, el término "tinción" a veces significa tinción o coloración.

25 Según la presente invención, se proporciona un kit de sustrato que contiene DAB para tinción usando un anticuerpo marcado con peroxidasa, tal como IHC, ICC o ISH, comprendiendo dicho kit: disolución que contiene cromóforo (A) que comprende diaminobencidina (DAB) como un cromóforo de peroxidasa y agua; y reactivo cromogénico (B) que comprende: al menos un agente quelante que es dihidrato de sal disódica del ácido tetraetilendiaminotetraacético (EDTA-2Na); un tensioactivo no iónico de alquil éter de polioxietileno (abreviado como POE más adelante) que es
30 POE (23) lauril éter (Brij 35); imidazol; peróxido de hidrógeno; y agua, en el que dicho kit está en un sistema de dos o más componentes con al menos dicha disolución que contiene cromóforo (A) y dicho reactivo cromogénico (B) se almacena por separado (a veces denominado como un presente kit más adelante),

en donde la disolución de sustrato que contiene DAB obtenida mezclando, o mezclando y diluyendo, las disoluciones componentes del kit de sustrato que contiene DAB comprende

- 0,1 a 10 mg/ml de DAB;
- 35 – 0,3 a 3 mM de agente quelante;
- 0,1 a 5% en masa de tensioactivo no iónico de alquil éter de POE;
- 5 a 100 mM de imidazol; y
- 0,01 a 0,05% en masa de peróxido de hidrógeno.

40 Según la presente invención, también se proporciona el kit, en donde dicho reactivo cromogénico (B) está en un sistema de dos componentes en donde la disolución cromogénica (B1) que comprende dicho peróxido de hidrógeno y dicha agua, y la disolución estabilizadora del sustrato (B2) que comprende dicho agente quelante, dichos tensioactivos no iónicos de alquil éter de POE, dicho imidazol y dicha agua, se almacenan por separado, y en donde dicho kit está en un sistema de tres componentes.

45 Según la presente invención, se proporciona el método IHC, ICC o ISH, en donde el presente kit se usa para teñir tejido, células o parte del mismo con DAB.

Según la presente invención, también se proporciona un método de tinción, caracterizado por que el presente kit se usa para teñir tejido, células o parte del mismo con DAB.

50 El presente kit contiene una disolución que contiene cromóforo (A) que contiene un cromóforo de peroxidasa de DAB y agua, y un reactivo cromogénico (B) que contiene un agente quelante particular, un tensioactivo particular, imidazol, peróxido de hidrógeno y agua, y está en un sistema de dos o más componentes en donde al menos la disolución que contiene cromóforo (A) y el reactivo cromogénico (B) se almacenan por separado. Por lo tanto, el presente kit es capaz de mejorar la intensidad de la tinción específica, reducir la tinción inespecífica y suprimir la precipitación debido a la agregación de DAB en la disolución de sustrato que contiene DAB, en IHC, ICC o ISH usando peroxidasa. Además, el presente kit es capaz de suprimir la precipitación durante un período prolongado de tiempo para mejorar la capacidad

de uso y la estabilidad de almacenamiento. El presente kit que tiene tales ventajas es particularmente útil para teñir muestras de tejido pegadas en portaobjetos de vidrio por IHC, teñir muestras celulares por ICC, o teñir tejidos o muestras celulares por ISH.

La presente invención se explicará ahora en detalle.

5 El presente kit es un kit de sustrato que contiene DAB provisto en un sistema de dos o más componentes, para teñir, con cromóforo DAB, sustancias particulares, tales como antígenos, ARNm o ADN, presentes en tejidos o células normales o tumorales de células biológicas objeto en diagnóstico patológico o ensayos de biología molecular, sobre la base de tinción en IHC o ICC o coloración en ISH, utilizando anticuerpos marcados con peroxidasa.

10 En la presente invención, las muestras de tejido a someter a IHC, las muestras celulares a someter a ICC o las muestras de tejido o celular a someter a ISH se han fijado para evitar la desnaturalización y después se seccionaron para uso. Por ejemplo, las muestras pueden usarse preferiblemente en la presente invención que, para el almacenamiento a largo plazo, se han fijado generalmente con formalina o alcohol, se han incrustado en un medio de inclusión que contiene, por ejemplo, parafina, seccionado y pegado en un portaobjetos de vidrio. La reacción antígeno-anticuerpo antes de la tinción, o reacción de anticuerpos después de la hibridación usando una sonda marcada con DIG (digoxigenina), puede realizarse mediante un proceso conocido, como un método directo o indirecto, usando un anticuerpo marcado con peroxidasa. Aquí, la peroxidasa es preferiblemente HRP.

20 El presente kit se puede usar preferiblemente en una reacción inmunoenzimática indirecta usando un portaobjetos de vidrio en el que se pegan los tejidos o las muestras celulares. Por ejemplo, una muestra fijada con formalina e incrustada en parafina en un portaobjetos de vidrio, se somete a desparafinación, rehidratación y, opcionalmente, recuperación de antigenicidad, para eliminar la peroxidasa endógena. Después, la muestra se hace reaccionar con un anticuerpo primario o una sonda marcada con DIG, y después se hace reaccionar con un polímero marcado con peroxidasa que se ha conjugado con anticuerpos secundarios o anticuerpos anti-DIG. La muestra resultante se hace reaccionar con una disolución de sustrato que contiene DAB preparada mezclando las disoluciones componentes del presente kit, para la tinción específica y la visualización del área reaccionada usando peroxidasa como catalizador.

25 Después de la tinción específica para visualización, puede llevarse a cabo una tinción nuclear con hematoxilina o similar para mejorar la capacidad de observación de la morfología.

La disolución de sustrato que contiene DAB se prepara mezclando las disoluciones componentes del presente kit, o mezclando las disoluciones concentradas componentes del presente kit con una cantidad particular de agua, tal como agua destilada.

30 Los ejemplos de los tejidos que pueden usarse para teñir con IHC o colorear con ISH usando el presente kit pueden incluir intestino grueso (normal o neoplásico), intestino delgado (normal), duodeno (normal), colon (normal), estómago (normal o neoplásico), esófago (normal), lengua (normal), hígado (neoplásico), páncreas (normal), riñón (normal), cerebro (normal), cerebelo (normal), corazón (normal), glándula mamaria (normal o neoplásica), placenta, próstata (normal o neoplásica), pulmón (normal o neoplásico), glándula tiroidea (normal), amígdala (normal), ganglio linfático (normal), cuello uterino (normal), melanoma maligno, linfoma de Hodgkin, caso de hiperplasia del timo, GIST (tumor del estroma gastrointestinal) y mesotelioma. Entre estos, los que contienen tejidos musculares o conectivos, como el intestino grueso (normal o neoplásico), intestino delgado (normal), duodeno (normal), colon (normal) y estómago (normal o neoplásico), son particularmente propensos a las manchas de fondo, de modo que el presente kit es particularmente efectivo para teñir tales tejidos.

40 Los ejemplos preferidos de las células adecuadas para la tinción por ICC o la coloración por ISH usando el presente kit pueden incluir células de cáncer de mama, células de cáncer de pulmón y linfoblastos (normal).

45 El presente kit incluye una disolución que contiene cromóforo (A) que contiene un cromóforo de peroxidasa de DAB y agua. La DAB contenida en la disolución (A) funciona como un donante de hidrógeno en la reacción enzimática del peróxido de hidrógeno y la peroxidasa. La polimerización de DAB colorea específicamente la parte unida a la peroxidasa en marrón.

50 En la disolución (A), el contenido de DAB no está particularmente limitado siempre que la disolución de sustrato que contiene DAB que se obtiene finalmente produzca una reacción cromogénica en la tinción por IHC o ICC o coloración por ISH, y es de 0,1 a 10 mg/ml en términos de la concentración en disolución de sustrato que contiene DAB para uso. A menos de 0,1 mg/ml, no se puede producir una reacción cromogénica suficiente, mientras que a más de 10 mg/ml, la DAB en la disolución de sustrato que contiene DAB puede agregarse y precipitar.

En la disolución (A), el agua puede ser, por ejemplo, agua destilada o ultrapura. La cantidad de agua es suficiente para disolver DAB en la disolución (A), y puede seleccionarse adecuadamente para que el contenido de cada constituyente esté en un intervalo apropiado en la disolución de sustrato que contiene DAB.

55 La disolución (A) puede contener opcionalmente, además de DAB y agua, varios disolventes orgánicos para mejorar la solubilidad o estabilidad de DAB, a un contenido adecuadamente seleccionado para el propósito.

El presente kit incluye reactivo cromogénico (B) que contiene un agente quelante particular, tensioactivo no iónico alquil éter de POE, imidazol, peróxido de hidrógeno y agua.

5 El reactivo cromogénico (B) puede dividirse en, por ejemplo, disolución cromogénica (B1) que contiene el peróxido de hidrógeno y el agua, y disolución estabilizadora de sustrato (B2) que contiene el agente quelante particular, los tensioactivos no iónicos de alquil éter de POE, el imidazol y el agua

10 El presente kit puede estar en un sistema de cualquier número de componentes siempre que esté en un sistema de dos o más componentes en donde la DAB y el peróxido de hidrógeno se almacenan por separado. A la luz de la eficiencia, un sistema de dos componentes compuesto por la disolución que contiene cromóforo (A) y el reactivo cromogénico (B), y un sistema de tres componentes compuesto por la disolución que contiene cromóforo (A), la disolución cromogénica (B1), y la disolución estabilizadora del sustrato (B2), son preferidos.

15 El agente quelante particular contenido en el reactivo cromogénico (B) o la disolución estabilizadora del sustrato (B2) es EDTA-2Na. Este agente quelante particularmente suprime la unión no específica de DAB, en particular, la tinción de fondo de muestras de tejido pegadas en portaobjetos de vidrio. Además, en combinación con el tensioactivo no iónico particular que se analizará más adelante, el agente quelante puede reducir eficazmente la unión no específica de DAB incluso cuando la muestra de tejido es muscular o tejido conectivo.

El agente quelante en el reactivo cromogénico (B) o la disolución estabilizadora del sustrato (B2) tiende a exhibir una mejora dependiente de la cantidad de sus efectos funcionales, y su contenido puede seleccionarse adecuadamente, teniendo en cuenta los efectos funcionales. Específicamente, el contenido del agente quelante es tal que la concentración en la disolución de sustrato que contiene DAB para uso es de 0,3 a 3 mM.

20 El tensioactivo particular contenido en el reactivo cromogénico (B) o la disolución estabilizadora del sustrato (B2) es un alquil éter de POE que es lauril éter de POE (23) (Brij 35). Este tensioactivo no iónico tiene excelentes efectos, particularmente en la disolución de sustrato que contiene DAB que contiene DAB y peróxido de hidrógeno, al suprimir la polimerización o precipitación de DAB en la disolución y al mejorar la intensidad de tinción de DAB. Los efectos deseados no se pueden obtener con otros tensioactivos, como Triton X-100 (4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil-polietilenglicol), NP-40 (4-nonilfenil-polietilenglicol) o Tween 20 (monolaurato de polioxietilenosorbitan), disolventes polares orapróticos, tales como DMSO (dimetilsulfóxido).

25 El tensioactivo no iónico de alquil éter de POE en el reactivo cromogénico (B) o la disolución estabilizadora de sustrato (B2) tiende a exhibir un aumento dependiente de la cantidad de sus efectos funcionales, y su contenido puede seleccionarse adecuadamente, teniendo en cuenta los efectos funcionales. El contenido del tensioactivo es tal que la concentración en la disolución de sustrato que contiene DAB para uso en IHC, ICC o ISH es de 0,1 a 5% en masa.

30 El imidazol contenido en el reactivo cromogénico (B) o la disolución estabilizadora del sustrato (B2) funciona como un sensibilizador para mejorar la intensidad de tinción de DAB. El imidazol, que tiene tal efecto funcional, mejora la intensidad de la tinción pero, por otro lado, induce la agregación de DAB en presencia de peróxido de hidrógeno para causar precipitación en la disolución de sustrato que contiene DAB después de un cierto período de tiempo, y también induce una tinción inespecífica de sustancias distintas de la sustancia objetivo, como la tinción de fondo, en una muestra de tejidos o células. En vista de esto, en el presente kit, el imidazol está contenido en el reactivo cromogénico (B) o la disolución estabilizadora del sustrato (B2), que contiene una combinación del agente quelante particular y el tensioactivo no iónico particular.

35 El imidazol en el reactivo cromogénico (B) o la disolución estabilizadora del sustrato (B2) exhibe un aumento dependiente de la cantidad de la intensidad de tinción de DAB, pero demasiado imidazol puede aumentar el riesgo de los problemas discutidos anteriormente. Por lo tanto, el contenido del imidazol es tal que la concentración en la disolución de sustrato que contiene DAB para uso en IHC, ICC o ISH es de 5 a 100 mM. En caso de que se desee una mayor concentración de imidazol, la concentración del agente quelante particular también se incrementa preferiblemente dentro del intervalo mencionado anteriormente.

40 El peróxido de hidrógeno contenido en el reactivo cromogénico (B) o la disolución cromogénica (B1) actúa sobre la peroxidasa para contribuir a la reacción cromogénica de DAB. El contenido del peróxido de hidrógeno puede ser una cantidad en exceso, pero demasiado peróxido de hidrógeno puede disminuir la intensidad de la tinción específica. Por otro lado, cuando el contenido de peróxido de hidrógeno es demasiado pequeño, la reacción cromogénica puede no proceder lo suficiente, y la estabilidad de la disolución de sustrato que contiene DAB preparada es pobre.

45 En vista de lo anterior, el contenido del peróxido de hidrógeno es tal que el contenido en la disolución de sustrato que contiene DAB para uso en IHC, ICC o ISH es 0,01 a 0,05% en masa.

El agua contenida en el reactivo cromogénico (B), la disolución cromogénica (B1) y la disolución estabilizadora del sustrato (B2) puede ser, por ejemplo, agua destilada o ultrapura. El contenido del agua puede seleccionarse adecuadamente para que el contenido de cada constituyente esté dentro de un intervalo adecuado.

En el presente kit, para lograr eficazmente los efectos deseados de la presente invención, el pH del reactivo cromogénico (B) o la disolución estabilizadora del sustrato (B2) puede ajustarse preferiblemente de modo que el pH de la disolución de sustrato que contiene DAB resultante normalmente es de 5 a 9, particularmente de 6 a 8.

5 El pH se puede ajustar con un ajustador de pH, como ácido clorhídrico, o un tampón, como ácido fosfórico, Tris, MOPS, HEPES, ADA, CHES o MES. Se prefiere particularmente un ajustador de pH, tal como ácido clorhídrico, en vista de la estabilidad de almacenamiento mejorada del reactivo cromogénico (B) que contiene peróxido de hidrógeno, o de la disolución de sustrato que contiene DAB resultante.

10 Cada una de las disoluciones de componentes del presente kit puede contener opcionalmente constituyentes adicionales siempre que los efectos de la presente invención no se vean afectados y para proporcionar efectos adicionales. Ejemplos de dichos componentes adicionales pueden incluir conservantes y desinfectantes.

El presente kit puede usarse en procesos manuales o automatizados. En particular, el presente kit puede usarse preferiblemente y convenientemente en un proceso que usa un instrumento automatizado con control de temperatura, un instrumento de tinción inmunohistoquímica automatizado o un instrumento de hibridación in situ automatizado.

15 La tinción o coloración en IHC, ICC o ISH usando el presente kit puede llevarse a cabo mezclando las disoluciones componentes del kit, o mezclando y disolviendo las disoluciones componentes del kit en una cantidad prescrita de agua, para preparar una disolución de sustrato que contiene DAB y, por ejemplo, en el caso del método inmunoenzimático que utiliza una muestra de tejido o células en un portaobjetos de vidrio, añadiendo la disolución de sustrato que contiene DAB gota a gota sobre el área marcada generalmente a temperatura ambiente (15 a 30 °C) y reaccionando de 1 a 20 minutos

20 La presente invención se explicará ahora con más detalle con referencia a ejemplos, controles 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)

25 Intensidad de la tinción específica: la intensidad de la tinción específica de una muestra obtenida se observó bajo un microscopio óptico.

La evaluación se expresó en múltiplos de la intensidad de la tinción específica en el control 1 o 2 siendo "+".

Artículo de evaluación (2)

Tinción de fondo: la tinción de fondo de una muestra obtenida se observó bajo un microscopio óptico.

30 La evaluación se expresó en base al ejemplo comparativo 1 u 8 en donde se observó la tinción de fondo indicada como "±", y el control 1 u 8 en donde no se observó la tinción de fondo indicada como "-", y la tinción de fondo más que esta se indicó como "+", y la tinción de fondo aproximadamente el doble de la indicada como "2+".

Artículo de evaluación (3)

35 Color de la disolución de sustrato que contiene DAB: se observó visualmente el color de la disolución mezclada obtenida mezclando las disoluciones componentes del kit preparado en los ejemplos y ejemplos comparativos que se discutirán más adelante.

Artículo de evaluación (4)

Precipitación en disolución de sustrato que contiene DAB:

Se observaron visualmente las condiciones de precipitado en la disolución mixta obtenida mezclando las disoluciones componentes del kit preparado en los ejemplos y ejemplos comparativos que se discutirán más adelante.

40 Artículo de evaluación (5)

Estabilidad de almacenamiento: se determinó el período de almacenamiento en el que la intensidad de la tinción específica y la tinción de fondo determinada de la disolución de sustrato que contiene DAB preparada a partir de un kit almacenado a 37 °C se evaluaron como comparables a las determinadas de la disolución de sustrato que contiene DAB obtenida mezclando los componentes de un kit recién preparado.

45 Preparación de muestra para tinción inmunohistoquímica usando anticuerpo marcado con peroxidasa

(A) Desparafinación y rehidratación

La sección de tejido del intestino delgado humano embebido en parafina fijada con formalina se seccionó a 3 µm con un microtomo, se pegó a un portaobjetos de vidrio recubierto con silano y se secó a 37 °C durante 16 horas. El

portaobjetos se desparafinó durante tres minutos permaneciendo en la capa de xileno tres veces, y después se rehidrató durante tres minutos permaneciendo en la capa de etanol cuatro veces.

(B) Lavado

5 Después del reposo final en la capa de etanol, el portaobjetos se lavó con tampón fosfato a pH 7,6 durante 3 minutos tres veces.

(C) Tinción inmunohistoquímica

Tinción inmunohistoquímica manual

10 El portaobjetos de vidrio del lavado (B), después de ser drenado, se colocó en disolución de peróxido de hidrógeno/metanol al 3% durante 10 minutos para la reacción para eliminar la peroxidasa endógena, y después se lavó con tampón fosfato pH 7,6 durante 3 minutos tres veces.

Después de drenar el portaobjetos de vidrio obtenido, la muestra de tejido se rodeó con una pluma PAP (DAIDO SANGYO CO., LTD.) para formar un depósito para el reactivo.

15 Después de drenar el portaobjetos de vidrio, se añadieron gota a gota sobre el portaobjetos de vidrio 100 µl de anticuerpo primario derivado de ratón, anticuerpo monoclonal anti - actina (músculo liso) (clon 1A4) (nombre comercial, NICHIREI BIOSCIENCES, INC.) a 25 °C durante 60 minutos. Una vez completada la reacción, el portaobjetos de vidrio se lavó con tampón fosfato a pH 7,6 durante 3 minutos tres veces.

20 Después de drenar el portaobjetos de vidrio lavado, se añadieron gota a gota 100 µL de un polímero marcado, Simple Stain MAX PO (MULTI) (nombre comercial, NICHIREI BIOSCIENCES, INC.), que se preparó mediante unión, a un polímero de aminoácidos, peroxidasa y fragmentos Fab' de Ig anti-ratón e Ig anti-conejo como anticuerpos secundarios, sobre el portaobjetos de vidrio y se hicieron reaccionar a 25 °C durante 30 minutos. Una vez completada la reacción, el portaobjetos de vidrio se lavó con tampón fosfato a pH 7,6 durante 3 minutos tres veces.

25 Después del lavado, se drenó el portaobjetos de vidrio y se añadió una disolución de sustrato que contenía DAB preparada a partir del kit obtenido en cada uno de los ejemplos y ejemplos comparativos, como un sustrato cromogénico, gota a gota sobre el portaobjetos de vidrio y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después, el portaobjetos de vidrio se lavó en agua corriente durante 5 minutos. Después de ser drenado, para contratinción, el portaobjetos de vidrio se hizo reaccionar en hematoxilina de Mayer durante 30 segundos para la tinción nuclear, y se lavó en agua corriente durante 5 minutos.

30 Después, después de ser drenado, el portaobjetos se sometió a deshidratación y limpieza por paso a través de la capa de etanol tres veces, reposo de tres minutos en la capa de etanol una vez, paso a través de la capa de xileno una vez y reposo de cinco minutos en la capa de xileno dos veces, y después se montó en medio de montaje no acuoso (NICHIREI BIOSCIENCES INC.) para obtener una muestra.

Control 1: kit de sustrato que contiene DAB en un sistema de tres componentes sin imidazol, agente quelante particular y tensioactivo particular

35 Se disolvió una cantidad de DAB en agua destilada de modo que la concentración en la disolución de sustrato que contenía DAB finalmente obtenida fue de 15 mg/ml, para preparar la disolución que contiene cromóforo (A). Por separado, se preparó una disolución cromogénica (B1) disolviendo 0,6% en masa de peróxido de hidrógeno en agua destilada, y se preparó una disolución estabilizadora de sustrato (B2') de Tris-HCl de pH 7,6. Usando un kit de la disolución que contiene cromóforo (A) obtenida, disolución cromogénica (B1) y disolución estabilizadora de sustrato (B2'), se mezcló una gota de cada disolución componente (aproximadamente 40 µL) en 1 ml de agua destilada bajo agitación para preparar una disolución de sustrato que contiene DAB.

40

Usando la disolución de sustrato que contiene DAB obtenida, se prepararon muestras para tinción inmunohistoquímica según el proceso descrito anteriormente. Las muestras obtenidas se evaluaron para los artículos de evaluación (1) y (2). Los resultados se muestran en la tabla 1.

Ejemplo comparativo 1: kit de sustrato que contiene DAB en un sistema de tres componentes sin tensioactivo particular

45 Se disolvió una cantidad de DAB en agua destilada de modo que la concentración de la disolución de sustrato que contenía DAB finalmente obtenida fue de 15 mg/ml, para preparar la disolución que contiene cromóforo (A). Por separado, se preparó una disolución cromogénica (B1) disolviendo 0,6% en masa de peróxido de hidrógeno en agua destilada, y se preparó una disolución estabilizadora de sustrato (B2') disolviendo imidazol y EDTA-2Na en agua destilada a concentraciones de 0,5 M y 20 mM, respectivamente, y ajustando el pH a 7,5 con ácido clorhídrico. Usando un kit de la disolución que contiene cromóforo (A) obtenida, disolución cromogénica (B1) y disolución estabilizadora de sustrato (B2'), se mezcló una gota de cada disolución componente (aproximadamente 40 µL) en 1 ml de agua destilada bajo agitación para preparar una disolución de sustrato que contiene DAB. En la disolución obtenida, el contenido de peróxido de hidrógeno fue de 0,024% en masa, la concentración de imidazol fue de 20 mM, la concentración de EDTA-2Na fue de 0,8 mM y el pH fue de 7,5.

50

Usando la disolución de sustrato que contiene DAB obtenida, se prepararon muestras para tinción inmunohistoquímica según el proceso descrito anteriormente. Las muestras obtenidas se evaluaron para los artículos de evaluación (1) a (4). Las evaluaciones para los artículos de evaluación (3) y (4) se realizaron después del lapso de una hora desde la preparación de la disolución de sustrato que contiene DAB. Los resultados se muestran en las tablas 1 y 2.

5 Ejemplo 1: kit de sustrato que contiene DAB en un sistema de tres componentes que contiene EDTA-2Na como agente quelante

10 En lugar de la disolución estabilizadora de sustrato (B2'), se preparó una disolución estabilizadora de sustrato (B2) disolviendo imidazol, EDTA-2Na y lauril éter de POE(23) (Brij 35, SIGMA-ALDRICH) en agua destilada a concentraciones de 0,5 M, 20 mM y 1% en masa, respectivamente, y ajustando el pH a 7,5 con ácido clorhídrico. Excepto para la preparación de la disolución (B2), la disolución de sustrato que contiene DAB se preparó usando un kit resultante de la misma manera que en el ejemplo comparativo 1. En la disolución obtenida, la concentración del peróxido de hidrógeno fue 0,024% en masa, la concentración de imidazol fue de 20 mM, la concentración de EDTA-2Na fue de 0,8 mM, el contenido de Brij 35 fue de 0,04% en masa y el pH fue de 7,5. Las evaluaciones se realizaron de la misma manera que en el ejemplo comparativo 1. Para los artículos de evaluación (3) y (4), se realizaron evaluaciones adicionales después del lapso de tres días desde la preparación de la disolución de sustrato que contiene DAB. Los resultados se muestran en las tablas 1 y 2.

Ejemplos comparativos 2 a 4: kit de sustrato que contiene DAB en un sistema de tres componentes que contiene diferentes tensioactivos

20 La disolución estabilizadora de sustrato (B2') se preparó de la misma manera que en el ejemplo 1, excepto que Brij 35 se reemplazó con tensioactivo no iónico de polioxisorbitano Tween 20, tensioactivo no iónico de polioxisalquilfenil éter Triton X-100, o un éster de ácido graso de sacarosa "éster DK de SS"(nombre comercial, DKS CO., LTD.), como se muestra en la tabla 1.

25 La disolución que contiene cromóforo (A) y la disolución cromogénica (B1) se prepararon de la misma manera que en el ejemplo comparativo 1, para obtener un kit en un sistema de tres componentes. La disolución de sustrato que contiene DAB se preparó usando el kit obtenido de la misma manera que en el ejemplo comparativo 1, y las evaluaciones se realizaron de la misma manera que en el ejemplo 1. Los resultados se muestran en las tablas 1 y 2. Las concentraciones en la disolución de sustrato que contiene DAB obtenida fueron las mismas que las del ejemplo 1.

Ejemplos 2 a 5: kit de sustrato que contiene DAB en un sistema de tres componentes con un tipo y concentración de agente quelante cambiado del ejemplo 1

30 La disolución estabilizadora de sustrato (B2) se preparó de la misma manera que en el ejemplo 1, excepto que 20 mM de EDTA-2Na se reemplazó con EDTA-2NH₄, NTA, GEDTA o EDTA-2Na a una concentración que se muestra en la tabla 1. La disolución que contiene cromóforo (A) y la disolución cromogénica (B1) se prepararon de la misma manera que en el ejemplo comparativo 1, para obtener un kit en un sistema de tres componentes. La disolución de sustrato que contiene DAB se preparó usando el kit obtenido de la misma manera que en el ejemplo comparativo 1, y las evaluaciones se realizaron de la misma manera que en el ejemplo 1. Los resultados se muestran en las tablas 1 y 2. En la disolución de sustrato que contiene DAB preparada en el ejemplo 5, la concentración de peróxido de hidrógeno fue de 0,024% en masa, la concentración de imidazol fue de 20 mM, la concentración de EDTA-2Na fue de 0,8 mM, el contenido de Brij 35 fue de 0,04% en masa y el pH fue de 7,5.

40 Ejemplos comparativos 5 a 7: kit de sustrato que contiene DAB en un sistema de tres componentes con diferentes agentes quelantes

45 La disolución estabilizadora del sustrato (B2') se preparó de la misma manera que en el ejemplo comparativo 2, excepto que EDTA-2Na se reemplazó con ácido cítrico, ácido tartárico o ácido gálico a una concentración que se muestra en la tabla 1. La disolución que contiene cromóforo (A) y la disolución cromogénica (B1) se prepararon de la misma manera que en el ejemplo comparativo 1, para obtener un kit en un sistema de tres componentes. La disolución de sustrato que contiene DAB se preparó usando el kit obtenido de la misma manera que en el ejemplo comparativo 1, y las evaluaciones se realizaron de la misma manera que en el ejemplo 1, excepto que las evaluaciones del color de la disolución y las condiciones de precipitado después del lapso de una hora después de que no se hizo la mezcla. Los resultados se muestran en las tablas 1 y 2. En las disoluciones de sustrato que contienen DAB obtenidas en los ejemplos comparativos 5 a 7, la concentración de peróxido de hidrógeno fue 0,024% en masa, la concentración de imidazol fue 20 mM, la concentración de ácido cítrico o tartárico fue 0,8 mM, la concentración de ácido gálico fue de 0,08 mM, y el contenido de Tween 20 fue de 0,04% en masa.

Tabla 1

	Tipo de tensioactivo en disolución (B2) o (B2')	Tipo y concentración de agente quelante en la disolución (B2) o (B2')	Intensidad de tinción específica	Tinción de fondo
Control 1	-	-	+	-
Ej. Comp. 1	-	20 mM EDTA-2Na	2,5+	±
Ejemplo 1	Brij 35	20 mM EDTA-2Na	3+	-
Ej. Comp. 2	Tween 20	20 mM EDTA-2Na	3+	+
Ej. Comp. 3	Triton X-100	20 mM EDTA-2Na	3+	+
Ej. Comp. 4	éster DK de SS	20 mM EDTA-2Na	3+	+
Ejemplo 2	Brij 35	20 mM EDTA-2NH ₄	3+	-
Ejemplo 3	Brij 35	20 mM NTA	3+	-
Ejemplo 4	Brij 35	20 mM GEDTA	3+	-
Ejemplo 5	Brij 35	50 mM EDTA-2Na	3+	-
Ej. Comp. 5	Tween 20	20 mM ácido cítrico	2+	+
Ej. Comp. 6	Tween 20	20 mM ácido tartárico	2+	+
Ej. Comp. 7	Tween 20	2 mM ácido gálico	+	2+

Tabla 2

	Disolución después de 1 hora desde la mezcla		Disolución después de 3 días desde la mezcla	
	Color	Condición del precipitado	Color	Condición del precipitado
Ej. Comp. 1	Disolución transparente	Precipitado	-	-
Ejemplo 1	Claro e incoloro	Sin precipitar	Marrón claro	Sin precipitar
Ej. Comp. 2	Disolución transparente	Sin precipitar	Marrón turbio	Precipitado
Ej. Comp. 3	Disolución transparente	Sin precipitar	Marrón turbio	Precipitado
Ej. Comp. 4	Disolución transparente	Sin precipitar	Marrón turbio	Mucho precipitado
Ejemplo 2	Claro e incoloro	Sin precipitar	Marrón claro	Sin precipitar
Ejemplo 3	Claro e incoloro	Sin precipitar	Marrón claro	Sin precipitar
Ejemplo 4	Claro e incoloro	Sin precipitar	Marrón claro	Sin precipitar
Ejemplo 5	Claro e incoloro	Sin precipitar	Marrón claro	Sin precipitar
Ej. Comp. 5	-	-	Marrón turbio	Precipitado
Ej. Comp. 6	-	-	Marrón turbio	Precipitado
Ej. Comp. 7	-	-	Marrón turbio	Precipitado

5 Las tablas 1 y 2 muestran que en el control 1 sin que el imidazol tenga un efecto potenciador de la tinción, la intensidad de la tinción específica fue baja, pero no se observó la tinción de fondo. Por el contrario, en el ejemplo comparativo 1

con imidazol, se observó tinción de fondo a pesar de que estaba contenido el agente quelante particular EDTA-2Na, y se observó precipitación en la disolución en tan poco tiempo como una hora después de la mezcla. Los ejemplos comparativos 3 y 4 con el tensioactivo no iónico distinto de los tensioactivos no iónicos de alquil éter de POE exhibieron una intensidad aún más excelente de tinción específica en comparación con el ejemplo comparativo 1, pero también se mejoró la tinción de fondo y se observó precipitación en las disoluciones después del lapso de tres días desde la mezcla. Los ejemplos comparativos 5 y 6 con el agente quelante que tiene menos efecto quelante en comparación con EDTA-2Na, exhibieron una menor intensidad de tinción específica en comparación con el ejemplo comparativo 2 con EDTA-2Na, pero las condiciones de tinción de fondo y disolución comparables con el ejemplo comparativo 2. En contraste, en el ejemplo 1, se mejoró la intensidad de tinción específica, no se observó tinción de fondo y no se observó precipitación en la disolución después del lapso de tres días desde la mezcla. Además, los ejemplos 2 a 4 demuestran que los agentes quelantes particulares distintos de EDTA-2Na también exhibieron los efectos comparables al ejemplo 1.

Ejemplo 6: kit de sustrato que contiene DAB en un sistema de tres componentes con diferente concentración de imidazol

La disolución estabilizadora de sustrato (B2) se preparó de la misma manera que en el ejemplo 1, excepto que la concentración de imidazol de 0,5 M se cambió a 0,1 M (la concentración de imidazol en la disolución de sustrato que contiene DAB fue de 4 mM), 0,2 M (la concentración de imidazol en la disolución de sustrato que contiene DAB fue de 8 mM), 0,3 M (la concentración de imidazol en la disolución de sustrato que contiene DAB fue de 12 mM) o 0,4 M (la concentración de imidazol en la disolución de sustrato que contiene DAB fue de 16 mM), y las evaluaciones se realizaron de la misma manera que en el ejemplo 1 como un kit en un sistema de tres componentes. Los resultados muestran que la intensidad de tinción específica estaba en el intervalo de +1,5 a +2,5, aumentando de manera dependiente de la cantidad a medida que aumentaba la concentración de imidazol. La tinción de fondo, el color de la disolución mixta y las condiciones de precipitación fueron comparables a las del ejemplo 1.

Ejemplos 7 a 13: kit de sustrato que contiene DAB en un sistema de tres componentes con diferente concentración de tensioactivo

La disolución estabilizadora de sustrato (B2) se preparó de la misma manera que en el ejemplo 1, excepto que la concentración de Brij 35 se cambió a la concentración mostrada en la tabla 3. Se prepararon una disolución que contiene cromóforo (A) y una disolución cromogénica (B1) de la misma manera que en el ejemplo comparativo 1, para obtener un kit en un sistema de tres componentes. La disolución de sustrato que contiene DAB se preparó usando el kit obtenido, y las muestras para tinción inmunohistoquímica se prepararon usando la disolución inmediatamente después de la mezcla. Las muestras fueron evaluadas para los artículos de evaluación (1) y (2). Los resultados se muestran en la tabla 3. Además, las muestras para tinción inmunohistoquímica también se prepararon usando una disolución de sustrato que contiene DAB almacenada en sombra a 4 °C durante 2 semanas después de la preparación. Las muestras obtenidas se evaluaron para los elementos de evaluación (1) y (2), y la disolución almacenada en sombra a 4 °C durante 2 semanas se sometió a los elementos de evaluación (3) y (4). Los resultados se muestran en la tabla 4. en la disolución de sustrato que contiene DAB obtenida, la concentración de Brij 35 fue 0,02% en masa en el ejemplo 7, 0,06% en masa en el ejemplo 8, 0,08% en masa en el ejemplo 9, 0,1% en masa en el ejemplo 10, 0,12 % en masa en el ejemplo 11, 0,2% en masa en el ejemplo 12 y 0,4% en masa en el ejemplo 13.

Tabla 3

	Concentración de Brij 35 (% en masa)	Intensidad de tinción específica	Tinción de fondo
Ejemplo 7	0,5	3+	-
Ejemplo 8	1,5	3+	-
Ejemplo 9	2,0	3+	-
Ejemplo 10	2,5	3+	-
Ejemplo 11	3,0	3,5+	-
Ejemplo 12	5,0	3,5+	-
Ejemplo 13	10,0	3,5+	-

Tabla 4

	Concentración Brij 35 (% en masa)	Después del almacenamiento en sombra a 4 °C durante 2 semanas después de la mezcla		
		Intensidad de tinción específica	Tinción de fondo	Condición de precipitación después del almacenamiento de la disolución
Ejemplo 7	0,5	3+	-	Precipitado
Ejemplo 8	1,5	3+	-	Precipitado
Ejemplo 9	2,0	3+	-	Precipitado
Ejemplo 10	2,5	3+	-	Ligero precipitado
Ejemplo 11	3,0	3,5+	-	Sin precipitar
Ejemplo 12	5,0	3,5+	-	Sin precipitar
Ejemplo 13	10,0	3,5+	-	Sin precipitar

5 La tabla 4 muestra que con una concentración más alta del tensioactivo particular, no se observó precipitado en la disolución de sustrato que contiene DAB incluso después de un almacenamiento a largo plazo, exhibiendo una buena estabilidad de almacenamiento.

10 El kit del ejemplo 13 se sometió adicionalmente a un ensayo acelerado a 37 °C durante 3 meses y un ensayo de congelación-descongelación de almacenamiento a -20 °C durante 3 días, y las disoluciones componentes se mezclaron y evaluaron. Los resultados no muestran problemas de estabilidad y precipitación. Además, después del ensayo acelerado y el ensayo de congelación-descongelación, la disolución mezclada se almacenó en sombra a 4 °C durante 5 días, y se evaluó, lo que resultó en una pequeña disminución de la intensidad de tinción específica y sin tinción de fondo. Sin embargo, con una disolución mixta después del lapso de 7 días, se observó tinción con una ligera disminución en la intensidad de tinción específica en comparación con la disolución preparada el día de la evaluación.

Ejemplo 14: kit de sustrato que contiene DAB en un sistema de dos componentes

15 Se disolvió una cantidad de DAB en agua destilada de modo que la concentración de la disolución de sustrato que contiene DAB finalmente obtenida fue de 20 mg/ml, para preparar la disolución que contiene cromóforo (A). El reactivo cromogénico (B) se preparó disolviendo peróxido de hidrógeno, imidazol, EDTA-2Na y Brij 35 en agua destilada a concentraciones de 0,025% en masa, 20 mM, 2 mM y 0,4% en masa, respectivamente, y ajustando el pH a 7,5 únicamente con ácido clorhídrico. Usando un kit en un sistema de dos componentes compuesto por la disolución que contiene cromóforo (A) obtenida y la disolución cromogénica (B), se mezclaron 500 µL de la disolución (B) con una gota de la disolución (A) (aproximadamente 20 µL) bajo agitación para preparar una disolución de sustrato que contiene DAB. En la disolución obtenida, el contenido de peróxido de hidrógeno fue de 0,025% en masa, la concentración de imidazol fue de 20 mM, la concentración de EDTA-2Na fue de 2 mM, el contenido de Brij 35 fue de 0,4% en masa y el pH fue de 7,5.

25 Usando la disolución de sustrato que contiene DAB obtenida, se prepararon muestras para tinción inmunohistoquímica según el proceso descrito anteriormente. Las muestras obtenidas se evaluaron para los artículos de evaluación (1) y (2), y el kit obtenido se sometió al ensayo de estabilidad de almacenamiento del artículo de evaluación (5). Los resultados se muestran en la tabla 5.

Ejemplos 15 a 18

30 El reactivo cromogénico (B) se preparó de la misma manera que en el ejemplo 14, excepto que, en lugar de ajustar el pH a 7,5 únicamente con ácido clorhídrico, la disolución tampón que se muestra en la tabla 5 se tituló con HCl o NaOH para mostrar el pH en Tabla 5. La preparación restante de la disolución que contiene cromóforo (A) y las evaluaciones se realizaron de la misma manera que en el ejemplo 14. Los resultados se muestran en la tabla 5.

Tabla 5

	Tampón (pH)	Intensidad de tinción específica	Tinción de fondo	Artículo de evaluación (5) del período conservable a 37 °C
Ejemplo 14	- (7,5)	3,5+	-	Conservable durante 3 meses
Ejemplo 15	MOPS (7,5)	3,5+	-	Conservable durante aproximadamente 2 meses
Ejemplo 16	HEPES (7,5)	3,5+	-	Conservable durante aproximadamente 1 mes
Ejemplo 17	ADA (7,5)	3,5+	-	Conservable durante aproximadamente 1 mes
Ejemplo 18	CHES (9,0)	3,5+	-	Conservable durante aproximadamente 2 meses
MOPS: ácido 3-morforino propanosulfónico HEPES: ácido 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazina-etanosulfónico ADA: imidodiacetato de N-(2-acetamida) CHES: ácido N-ciclohexil-2-aminoetanosulfónico				

La tabla 5 muestra que todos los reactivos cromogénicos (B) exhibieron una excelente estabilidad de almacenamiento en el ensayo de almacenamiento, siendo el ejemplo 14 sin un tampón particularmente excelente.

5 Ejemplo 19

El reactivo cromogénico (B) se preparó de la misma manera que en el ejemplo 14, excepto que la concentración de EDTA-2Na de 2 mM se cambió a 1 mM o 1,5 mM. Se preparó la disolución que contiene cromóforo (A) y se realizaron las evaluaciones de la intensidad de tinción específica y la tinción de fondo, para obtener resultados similares a los del ejemplo 14. Se observó el tono de color de la tinción para descubrir que la tinción estaba en ocre hasta la concentración de EDTA-2Na de 1 mM, pero en marrón oscuro a 1,5 mM o más, mostrando un tono de color más preferible.

10

CISH manual (hibridación in situ cromogénica)

(A) Preparación de la sección de tejido, desparafinación y rehidratación

15

La sección de tejido de cáncer de mama humano embebido en parafina fijada con formalina confirmada como HER2 positivo se seccionó a 5 µm con un microtomo, se pegó en un portaobjetos de vidrio recubierto con silano y se secó a 37 °C durante 16 horas. El portaobjetos se desparafinó durante tres minutos en reposo en xileno tres veces, y después se rehidrató durante tres minutos en etanol cuatro veces.

(B) Pretratamiento

20

Después del reposo final en etanol, el portaobjetos se drenó, se colocó en agua oxigenada al 3%/agua para eliminar la peroxidasa endógena y se hizo reaccionar a 25 °C durante 5 minutos. Después, el portaobjetos se lavó con tampón fosfato (pH 7,6) durante 1 minuto dos veces.

Después de drenarse, el portaobjetos se colocó en tampón citrato 10 mM (pH 6,0) previamente calentado a 98 °C en un baño tibio, y se hizo reaccionar durante 30 minutos. Después, el portaobjetos se lavó en tampón fosfato (pH 7,6) durante 2 minutos dos veces.

25

Después de drenar el portaobjetos, se añadieron gota a gota 100 µL de disolución de proteasa diluida cinco veces (NICHIREI BIOSCIENCES, INC.) sobre el portaobjetos, se hizo reaccionar a 25 °C durante 3 minutos y después se lavó en tampón fosfato (pH 7,6) durante cinco minutos tres veces.

30

Para la deshidratación, el portaobjetos se hizo reaccionar con etanol al 70%, 90% y 100% (el resto era agua desionizada) a 25 °C durante 1 minuto cada uno, y se sometió a viento frío directo desde un secador para secar el tejido.

Desnaturalización e hibridación

Se preparó una sonda HER2 marcando con DIG, con un conector, una secuencia de aproximadamente 220 kb complementaria a una región en el cromosoma 17 humano (17q21,1), y se añadieron gota a gota 10 µL de la sonda HER2 así obtenida alrededor del tejido seco.

35

Se colocó una cubierta de vidrio de 22 mm x 22 mm (MATSUNAMI GLASS IND., LTD.) sobre el tejido, excluyendo las burbujas de aire, y se selló con un papel adhesivo alrededor de la perifería. Después, el portaobjetos de vidrio se

colocó en una placa caliente a 75 °C y se desnaturizó térmicamente durante 5 minutos. Después, el portaobjetos de vidrio se transfirió a una cámara húmeda y se hizo reaccionar durante la noche a 37 °C.

Poshibridación y detección

- 5 A continuación, el papel adhesivo se despegó cuidadosamente, y el portaobjetos de vidrio se hizo reaccionar en tampón SSC 2X (tampón citrato) a 25 °C durante 5 minutos, después en tampón SSC 2X previamente calentado a 72 °C durante 5 minutos, y se lavó con tampón fosfato (pH 7,6) durante 1 minuto dos veces.

Un polímero de aminoácidos se conjugó con peroxidasa y el fragmento Fab' de anticuerpo anti-DIG para preparar un polímero marcado, y se añadieron gota a gota 100 µl del polímero marcado así obtenido sobre el portaobjetos, se hizo reaccionar a 25 °C durante 30 minutos y se lavó con tampón fosfato (pH 7,6) durante 1 minuto tres veces.

- 10 Antes de la reacción, la disolución de sustrato que contenía DAB se preparó a partir de un kit compuesto por las disoluciones componentes preparadas en los ejemplos y ejemplos comparativos. Después de drenar el portaobjetos de vidrio, se añadieron gota a gota 100 µl de la disolución de sustrato que contiene DAB, se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 10 minutos y después se lavó en agua corriente durante 5 minutos.

- 15 Después del drenaje, para la contratinción, el portaobjetos de vidrio se hizo reaccionar en hematoxilina de Mayer durante 15 segundos para la tinción nuclear, y se lavó en agua corriente durante 5 minutos.

Después del lavado, el portaobjetos se drenó y se sometió a deshidratación y limpieza por paso a través de etanol tres veces, reposo de tres minutos en etanol una vez, paso de xileno una vez y reposo de cinco minutos en xileno dos veces. El portaobjetos se montó después en un medio de montaje no acuoso (NICHIREI BIOSCIENCES, INC.) Para obtener una muestra.

- 20 Control 2: kit de sustrato que contiene DAB en un sistema de tres componentes sin imidazol, agente quelante particular y tensioactivo particular

- 25 Se disolvió una cantidad de DAB en agua destilada de modo que la concentración de la disolución de sustrato que contiene DAB finalmente obtenida fue de 15 mg/ml, para preparar la disolución que contiene cromóforo (A). Por separado, se preparó una disolución cromogénica (B1) disolviendo 0,6% en masa de peróxido de hidrógeno en agua destilada, y se preparó una disolución estabilizadora de sustrato (B2') de Tris-HCl de pH 7,6. Usando un kit de la disolución que contiene cromóforo (A) obtenida, disolución cromogénica (B1) y disolución estabilizadora de sustrato (B2'), se mezcló una gota de cada disolución componente (aproximadamente 40 µL) en 1 ml de agua destilada bajo agitación para preparar una disolución de sustrato que contiene DAB.

- 30 Usando la disolución de sustrato que contiene DAB obtenida, se prepararon muestras para CISH según el proceso descrito anteriormente. Las muestras obtenidas se evaluaron para los artículos de evaluación (1) y (2). Los resultados se muestran en la tabla 6.

Ejemplo comparativo 8: kit de sustrato que contiene DAB en un sistema de tres componentes sin tensioactivo particular

- 35 Se disolvió una cantidad de DAB en agua destilada de modo que la concentración de la disolución de sustrato que contiene DAB finalmente obtenida fue de 15 mg/ml, para preparar la disolución que contiene cromóforo (A). Por separado, se preparó una disolución cromogénica (B1) disolviendo 0,6% en masa de peróxido de hidrógeno en agua destilada, y se preparó una disolución estabilizadora de sustrato (B2') disolviendo imidazol y EDTA-2Na en agua destilada a concentraciones de 0,5 M y 20 mM, respectivamente, y ajustando el pH a 7,5 con ácido clorhídrico. Usando un kit de la disolución que contiene cromóforo (A) obtenida, disolución cromogénica (B1) y disolución estabilizadora de sustrato (B2'), se mezcló una gota de cada disolución componente (aproximadamente 40 µL) en 1 ml de agua destilada bajo agitación para preparar una disolución de sustrato que contiene DAB. En la disolución obtenida, el contenido de peróxido de hidrógeno fue de 0,024% en masa, la concentración de imidazol fue de 20 mM, la concentración de EDTA-2Na fue de 0,8 mM y el pH fue de 7,5.

- 45 Usando la disolución de sustrato que contiene DAB obtenida, se prepararon muestras para CISH según el proceso descrito anteriormente. Las muestras obtenidas se evaluaron para los artículos de evaluación (1) a (4). Las evaluaciones para los artículos de evaluación (3) y (4) se realizaron después del lapso de una hora desde la preparación de la disolución de sustrato que contiene DAB. Los resultados se muestran en la tabla 6.

Ejemplo 20: kit de sustrato que contiene DAB en un sistema de tres componentes que contiene EDTA-2Na como agente quelante

- 50 En lugar de la disolución estabilizadora de sustrato (B2'), se preparó una disolución estabilizadora de sustrato (B2) disolviendo imidazol, EDTA-2Na y Brij 35 (SIGMA-ALDRICH) en agua destilada a concentraciones de 0,5 M, 20 mM, y 10% en masa, respectivamente, y ajustando el pH a 7,5 con ácido clorhídrico. Excepto para la preparación de la disolución (B2), la disolución de sustrato que contiene DAB se preparó usando un kit resultante de la misma manera que en el ejemplo comparativo 8. En la disolución obtenida, la concentración del peróxido de hidrógeno fue 0,024% en masa, la concentración de imidazol fue de 20 mM, la concentración de EDTA-2Na fue de 0,8 mM, el contenido de

Brij 35 fue de 0,4% en masa y el pH fue de 7,5. Las evaluaciones se realizaron de la misma manera que en el ejemplo comparativo 8. Para los artículos de evaluación (3) y (4), se realizaron evaluaciones adicionales después del lapso de tres días desde la preparación de la disolución de sustrato que contiene DAB. Los resultados se muestran en las Tablas 6 y 7.

5

Tabla 6

	Tipo de tensioactivo en disolución (B2) o (B2')	Tipo y concentración de agente quelante en la disolución (B2) o (B2')	Intensidad de tinción específica	Tinción de fondo
Control 2	-	-	+	-
Ej. Comp. 8	-	20 mM EDTA-2Na	2,5+	±
Ejemplo 20	Brij 35	20 mM EDTA-2Na	3+	-

Tabla 7

	Disolución después de 1 hora desde la mezcla		Disolución después de 3 días desde la mezcla	
	Color	Condición del precipitado	Color	Condición del precipitado
Ej. Comp. 8	Disolución transparente	Precipitado	-	-
Ejemplo 20	Claro e incoloro	Sin precipitar	Marrón claro	Sin precipitar

10

Los resultados muestran que el kit de la presente invención, también cuando se usa en CISH, mejora la intensidad de la tinción específica, reduce la tinción de fondo y suprime la precipitación en la disolución de sustrato que contiene DAB.

REIVINDICACIONES

1. Un kit de sustrato que contiene diaminobencidina (DAB) para tinción usando un anticuerpo marcado con peroxidasa, comprendiendo dicho kit:
- disolución que contiene cromóforo (A) que comprende DAB como un cromóforo de peroxidasa y agua; y
- 5 reactivo cromogénico (B) que comprende: un agente quelante que es dihidrato de sal disódica de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA-2Na); un tensioactivo no iónico de alquil éter de polioxietileno (POE) que es lauril éter de POE (23) (Brij 35); imidazol; peróxido de hidrógeno; y agua,
- en donde dicho kit está en un sistema de dos o más componentes con al menos dicha disolución que contiene cromóforo (A) y dicho reactivo cromogénico (B) se almacena por separado,
- 10 en donde la disolución de sustrato que contiene DAB obtenida mezclando, o mezclando y diluyendo, las disoluciones componentes del kit de sustrato que contiene DAB comprende
- 0,1 a 10 mg/ml de DAB;
 - 0,3 a 3 mM de agente quelante;
 - 0,1 a 5% en masa de tensioactivo no iónico de alquil éter de POE;
 - 15 - 5 a 100 mM de imidazol; y
 - 0,01 a 0,05% en masa de peróxido de hidrógeno.
2. El kit según la reivindicación 1, en donde dicho reactivo cromogénico (B) está en un sistema de dos componentes en donde la disolución cromogénica (B1) comprende dicho peróxido de hidrógeno y dicha agua, y la disolución estabilizadora de sustrato (B2) que comprende dicho agente quelante, dicho tensioactivo no iónico de alquil éter de POE, dicho imidazol y dicha agua, se almacenan por separado, y en donde dicho kit está en un sistema de tres componentes.
- 20 3. El kit según la reivindicación 1 o 2, en donde el pH del reactivo cromogénico (B) o la disolución estabilizadora de sustrato (B2) se ajusta de tal manera que el pH de la disolución de sustrato que contiene DAB para uso, preparado mezclando o mezclando y diluyendo las disoluciones componentes del kit de sustrato que contiene DAB para la tinción es de 5 a 9.
- 25 4. Uso del kit según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en inmunotinción o tinción en hibridación in situ.