

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 967 515**

51 Int. Cl.:

**G01N 15/10** (2006.01)

**G01N 15/14** (2006.01)

**G01N 1/30** (2006.01)

**G01N 1/14** (2006.01)

**G01N 1/10** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.08.2019** **PCT/US2019/044623**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.02.2020** **WO20028639**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.08.2019** **E 19759094 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2023** **EP 3830547**

54 Título: **Métodos, kits y composiciones de tinción para la evaluación de citometría de flujo de partículas del tamaño de un virus no asociadas utilizando múltiples colorantes fluorogénicos**

30 Prioridad:

**01.08.2018 US 201862713377 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**30.04.2024**

73 Titular/es:

**SARTORIUS BIOANALYTICAL INSTRUMENTS,  
INC. (100.0%)  
565 Johnson Avenue  
Bohemia, NY 11716, US**

72 Inventor/es:

**MONTANGE, REBECCA K.;  
SCHICKERT, ANTJE;  
STEAFFENS, JEFFREY W. y  
OLSZOWY, MICHAEL W.**

74 Agente/Representante:

**DEL VALLE VALIENTE, Sonia**

ES 2 967 515 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

Métodos, kits y composiciones de tinción para la evaluación de citometría de flujo de partículas del tamaño de un virus no asociadas utilizando múltiples colorantes fluorogénicos

## Antecedentes

La citometría de flujo es una técnica analítica para la medición de las propiedades físicas y/o químicas de las partículas a medida que fluyen en una muestra de fluido a través de una cubeta de investigación, comúnmente conocida como celda de flujo, de un citómetro de flujo. Aunque un fluido de muestra puede investigarse sometiendo el fluido de muestra a una variedad de estímulos, la radiación, típicamente en forma de luz, es una técnica de estímulo común. La citometría de flujo es una técnica analítica importante que ha ganado una amplia aceptación para el análisis de partículas de material biológico y, en particular, para investigar las propiedades de las células. Más recientemente, la citometría de flujo se ha adaptado para usar para detectar partículas de virus no asociadas (libres en solución), normalmente denominadas viriones, y otras partículas extremadamente pequeñas de material biológico de tamaño similar a los virus, denominadas partículas del tamaño de un virus. Dichas partículas del tamaño de un virus tienen típicamente un tamaño menor de un micrómetro, menor de 500 nanómetros, y en muchos casos menor de 300 nanómetros, menor de 200 nanómetros, o incluso menor de 100 nanómetros. Algunas partículas del tamaño de un virus tienen un tamaño del orden de decenas de nanómetros, aunque muchas tienen un tamaño de al menos 10 nanómetros, a menudo al menos 20 nanómetros, o incluso al menos 30 nanómetros o más. Existen muchos tipos de virus y otras partículas del tamaño de un virus, que tienen un tamaño de partícula en un intervalo de 20 nanómetros a 300 nanómetros. En la presente memoria, el tamaño de partícula es una referencia generalmente a la dimensión transversal máxima de la partícula (p. ej., diámetro de una esfera, longitud de una varilla). Los sistemas y procedimientos para analizar con precisión dichas pequeñas partículas por citometría de flujo han sido desafiantes, incluyendo con respecto a la repetibilidad de los resultados analíticos.

La citometría de flujo tradicional para la detección de partículas de un tamaño del orden de las células, que son a menudo de varios micrómetros de tamaño o mayores, se basa en la identificación de partículas a través de la detección de dispersión de luz. La información adicional sobre atributos biológicos específicos (p. ej., tipo de célula o infección de la célula por un virus particular) de una partícula identificada a través de detección de dispersión de luz, puede proporcionarse mediante el uso suplementario de tinciones de anticuerpos fluorescentes que se unan a sitios, o epítomos, de unión biológica particulares, para los cuales la firma de emisión fluorescente pueda detectarse por separado de la detección de dispersión de luz. Sin embargo, la identificación de partículas a través de la detección de dispersión de luz generalmente no es práctica para partículas del tamaño de un virus, ya que el pequeño tamaño de las partículas se acerca más al tamaño de la longitud de onda de la luz usada como fuente de excitación para la evaluación por citometría de flujo. En consecuencia, se han desarrollado técnicas para la detección y análisis de respuesta de emisión fluorescente tanto para identificar la presencia de una partícula como para determinar los atributos particulares de una partícula. Un ejemplo de un citómetro de flujo diseñado para la detección y recuento de partículas del tamaño de un virus mediante el uso de tinciones fluorescentes, es el citómetro de flujo Virus Counter® 3100 (Sartorius Stedim Biotech).

Una clase muy útil de tinciones fluorescentes para la evaluación por citometría de flujo de partículas del tamaño de un virus, son los denominados colorantes fluorogénicos. Cuando está en una solución en estado libre y no unido, un colorante fluorogénico solo muestra una respuesta fluorescente muy débil (rendimiento cuántico) a una fuente de luz de excitación. Sin embargo, cuando la orientación de la molécula del colorante fluorogénico se vuelve más rígida en su conformación cuando se une a una partícula, el rendimiento cuántico fluorescente aumenta significativamente, a menudo del orden de una magnitud o más con respecto a la respuesta fluorescente del colorante fluorogénico en el estado libre y no unido. Esto permite que las fuertes señales fluorescentes de las moléculas de colorante unidas se identifiquen sobre la fluorescencia de fondo relativamente débil de las moléculas de colorante no unidas. El funcionamiento de los colorantes fluorogénicos es significativamente distinto del funcionamiento de las tinciones de fluoróforos tradicionales, a menudo en forma de tinciones de anticuerpos fluorescentes, comúnmente usadas en la evaluación por la citometría de flujo de las células. Tales tinciones de fluoróforo muestran una fuerte respuesta fluorescente tanto si en una solución se encuentran unidas a una partícula como si se encuentran en estado libre no unido.

La solicitud de patente internacional WO 2016/154283 A1 describe un método de citometría de flujo para evaluar el material biológico para partículas del virus de la influenza no asociadas, mediante el uso de una combinación de una tinción de proteínas no específica y una tinción de ácido nucleico no específica.

Una limitación sobre el uso de colorantes fluorogénicos para teñir partículas del tamaño de un virus es que los colorantes tienden a ser no específicos, y no se unen a un sitio biológico de unión particular, o epítomo, como es el caso de las tinciones de anticuerpos fluorescentes. Una técnica importante para el uso de colorantes fluorogénicos en la evaluación por citometría de flujo para partículas del tamaño de un virus, implica la tinción simultánea con un colorante fluorescente que tiña de forma no específica el contenido proteico, y una segunda tinción fluorescente que tiña de forma no específica el contenido de ácido nucleico (p. ej., ADN, ARN). Mediante el uso de formulaciones de tinciones que incluyan una mezcla de ambos tipos de colorantes fluorogénicos, la detección de la aparición simultánea

de las firmas de emisión fluorescente de tanto la tinción de proteínas no específica como la tinción de ácido nucleico no específica, es indicativo de una partícula que la partícula pueda ser un virus intacto que contenga, por ejemplo, una proteína de envoltura y material genético, mientras que la detección de solo una de las firmas fluorescentes es indicativo de un tipo distinto de partícula que no contiene ni la proteína ni los atributos de ácido nucleico, por ejemplo, una partícula similar a un virus que tenga contenido proteico, pero no material genético. Este tipo de uso simultáneo de múltiples colorantes fluorogénicos para la evaluación por citometría de flujo de partículas del tamaño de un virus, ha logrado un éxito significativo, por ejemplo, en combinación con el uso del citómetro de flujo Virus Counter® 3100. Aun así, ha resultado ser un reto formular múltiples colorantes fluorogénicos en una mezcla que tenga una vida útil significativa y que pueda usarse de manera conveniente para teñir partículas del tamaño de un virus no asociadas, para la evaluación por citometría de flujo con un alto nivel de precisión o repetibilidad. Por ejemplo, un kit de reactivos Combo Dye®, que ha estado disponible para usar con el citómetro de flujo Virus Counter®, incluye una mezcla en polvo seco de colorantes fluorogénicos para la tinción de proteínas no específica y la tinción de ácido nucleico no específica de partículas del tamaño de un virus no asociadas y acetonitrilo, y una solución tampón acuosa usada para reconstituir la mezcla de colorante en polvo seco en una formulación de tinción líquida acuosa que se añade a una muestra de fluido que contiene material biológico, para teñir simultáneamente la muestra fluida con colorantes fluorogénicos. Para preparar la formulación de tinción líquida acuosa, la mezcla en polvo seco se mezcla con el acetonitrilo para promover la disolución de los colorantes fluorogénicos en el acetonitrilo, y después de un período de incubación de 5 minutos, se añade una solución tampón acuosa a la mezcla para preparar la formulación de tinción líquida acuosa, que luego se añade a la muestra de fluido que contiene el material biológico que se va a teñir para la evaluación por citometría de flujo para las partículas del tamaño de un virus no asociadas. Un ejemplo de dicha mezcla de polvo seco incluye una mezcla de tinción de ácido nucleico POPO™-3 yoduro (ThermoFisher Scientific) y tinción de proteína SYPRO™ Red (ThermoFisher Scientific). Dicho kit tiene una vida útil razonable y es relativamente fácil de usar para teñir muestras de fluido para la evaluación por citometría de flujo. El documento WO 2005/059178 A1 describe un kit que comprende dos colorantes fluorescentes, en donde un colorante (Sybr Green) es una tinción de gel de ácido nucleico para teñir ARN o ADN, y un colorante (Sypro Rube) es una tinción de gel proteico para proteínas.

Sin embargo, aunque dichos kits hayan tenido un nivel de éxito, sigue existiendo la necesidad de productos de tinción y técnicas de tinción que proporcionen un rendimiento mejorado de citometría de flujo, cuando se utilicen múltiples tinciones fluorogénicas para la evaluación por citometría de flujo para partículas del tamaño de un virus no asociadas, incluyendo en términos de precisión y repetibilidad mejoradas de los resultados de la citometría de flujo.

## Resumen

La autoextinción es un fenómeno en el que la energía de fluorescencia de las tinciones fluorescentes se consume por transferencia de energía entre las moléculas de colorante cercanas entre sí, que consume eficazmente la longitud de onda prevista de luz que de otro modo podría emitirse. Dicha proximidad cercana de moléculas de colorante que puede causar la extinción, puede resultar del hacinamiento de moléculas de colorante sobre un sustrato teñido, tal como una partícula. En el caso de los colorantes fluorogénicos, si las moléculas de colorante son susceptibles a existir en formas agregadas en líquidos acuosos, tales como los que se usan típicamente para preparar muestras de fluido de citometría de flujo y formulaciones de tinciones fluorogénicas para teñir dichas muestras de fluido, dichos agregados de moléculas de colorante que se unen a una partícula, pueden tener una tendencia significativa a autoextinguir una cantidad significativa de emisión fluorescente, y la presencia de dichos agregados en una partícula teñida, que puede reducir la fuerza total de una señal de emisión fluorescente de una partícula teñida durante la citometría de flujo. Tal deterioro de las señales de emisión fluorescente puede tener un efecto negativo pronunciado sobre la evaluación por citometría de flujo de partículas teñidas del tamaño de un virus, debido a la menor área disponible en tales pequeñas partículas para acomodar la unión de moléculas de colorante con respecto a la partículas mayores, tales como las células. Las partes ocupadas de dicha área de unión disponible con agregados de moléculas de colorante, pueden reducir significativamente la fuerza de la señal de emisión fluorescente total de una partícula del tamaño de un virus teñida, y dichos efectos de autoextinción pueden perjudicar la precisión de los resultados de citometría de flujo y la repetibilidad de los resultados entre muestras de fluido. Una medida de la precisión de la citometría de flujo en los resultados de la citometría de flujo es el coeficiente de variación (el error estándar o las mediciones divididas por la media de las mediciones, a menudo abreviado como c.v.), que es una indicación de la variación estadística de los resultados de la citometría de flujo entre muestras de fluido de la misma composición teñidas y procesadas de la misma manera. Se ha descubierto que diferentes viales de un lote de formulaciones de colorantes fluorogénicos acuosos preparados a partir de mezclas de colorantes fluorogénicos en polvo seco reconstituidos, como se resume anteriormente utilizando acetonitrilo en el proceso de reconstitución, pueden variar significativamente en el rendimiento de citometría de flujo, que se cree que se debe a la disolución y dispersión inconsistentes de los colorantes fluorogénicos presentes en la formulación de tinción acuosa final, lo que conduce a una tinción inconsistente y una variación mayor a la deseada en los resultados de citometría de flujo. Las variaciones muestra a muestra pueden ser superiores al 20 %, y las variaciones día a día pueden ser del 30 % o más. Más particularmente, se cree que tal disolución y dispersión inconsistentes da como resultado una parte significativa de la formación y/o persistencia de las moléculas de colorante mantenidas en agregados a través de interacciones de apilamiento  $\pi$  en las formulaciones líquidas acuosas de moléculas de colorantes fluorogénicos usados para teñir muestras de fluido para la evaluación por citometría de flujo. El apilamiento  $\pi$  (que también se denomina apilamiento  $\pi$  o apilamiento  $\pi$ - $\pi$ , o a veces se denomina simplemente "apilamiento"), se refiere a una atracción no covalente que se produce entre anillos

aromáticos. Tales interacciones, por ejemplo, están involucradas con el apilamiento de bases en estructuras tridimensionales de moléculas de ADN y ARN.

Otra complicación con el uso de colorantes fluorogénicos, es que algunos colorantes fluorogénicos tienen una estabilidad limitada en las formulaciones de tinción acuosas utilizadas para teñir muestras de fluidos, y el rendimiento de la formulación de tinción puede deteriorarse significativamente durante un corto período de tiempo después de la preparación, limitando significativamente la vida útil de la formulación de tinción antes de su uso. Una complicación adicional con el uso de colorantes fluorogénicos es que para algunos colorantes fluorogénicos, las moléculas de colorante parecen agregarse en formulaciones de tinción y muestras de fluido teñidas, de manera que cuando dichos agregados se encuentran en un estado libre en una solución, y no unidos a, y teñiendo, una partícula, los agregados a veces pueden volverse lo suficientemente fluorescentes que durante la evaluación por citometría de flujo, la respuesta fluorescente de los agregados libres puede ser difícil de diferenciar de las partículas teñidas de interés, lo que puede llevar a imprecisiones significativas en los recuentos de partículas determinados por citometría de flujo. Una técnica para corregir los resultados del recuento de partículas de citometría de flujo sin procesar, es restar de esos resultados sin procesar los recuentos de partículas de fondo determinados a partir de citometría de flujo en muestras de fluido en blanco de la misma o similar matriz de fluido, pero sin contener ninguna partícula. Dichas muestras de fluido en blanco se tiñen de la misma manera que las muestras de fluido con material biológico en investigación, y se someten a la misma evaluación por citometría de flujo para determinar un recuento de partículas en blanco que luego se resta de los recuentos de partículas sin procesar de los resultados de la citometría de flujo en las muestras de fluido en investigación. Sin embargo, la actividad fluorescente de algunos agregados de moléculas de colorante puede aumentar significativamente los recuentos de fondo para algunos colorantes fluorogénicos, hasta un nivel donde puede volverse difícil de distinguir de forma significativa entre los recuentos de partículas en blanco y los reales. Las complicaciones indicadas en relación con la inestabilidad de la formulación de tinción de los agregados de moléculas de colorante altamente fluorescentes, parecen estar más asociados con colorantes fluorogénicos que tienen mayor hidrofobicidad, como es el caso, por ejemplo, con la tinción de proteínas SYPRO™ Red.

Se ha descubierto que disolver una mezcla en polvo seco con múltiples diferentes colorantes fluorogénicos en un medio líquido con dimetilsulfóxido (DMSO) antes de la dilución con líquido acuoso añadido, para preparar formulaciones de colorante fluorogénico acuosas finales que se usen para teñir muestras de fluido para la evaluación por citometría de flujo para partículas del tamaño de un virus no asociadas (libres en solución), puede, sorprendente e inesperadamente, reducir significativamente el coeficiente de variación de los resultados de la citometría de flujo entre muestras de fluido. Este hallazgo sorprendente e inesperado siguió la prueba de un enfoque sin éxito para reducir las interacciones de apilamiento  $\pi$  y, por lo tanto, la extinción por energía fluorescente, a través de la adición de un agente químico, (2-hidroxiopropil)- $\beta$ -ciclodextrina, para interrumpir las interacciones de apilamiento  $\pi$ . La interrupción de tales interacciones de apilamiento  $\pi$  fue sugerida por Gurgivev, y col., Control of the Fluorescence of Dye - Antibody Conjugates by (2-Hydroxypropyl)- $\beta$ -cyclodextrin in Fluorescence Microscopy and Flow Cytometry, Anal. Chem., 2011, 83, 7109-7114, 2011 (American Chemical Society). En lugar de mejorar el rendimiento de la citometría de flujo, la adición del agente químico fue perjudicial para la precisión del recuento de partículas de virus. Se probó utilizar DMSO en lugar de acetonitrilo, para disolver inicialmente mezclas en polvo seco de múltiples colorantes fluorogénicos antes de la dilución con líquido acuoso para preparar formulaciones de colorante acuosas finales para la tinción, sin que se esperara una reducción en las interacciones de apilamiento  $\pi$ , o un cambio significativo en los resultados de la citometría de flujo. Cuando se utiliza acetonitrilo o DMSO, la concentración final del disolvente orgánico líquido en ambos casos, es muy pequeña en la formulación de colorante acuosa final utilizada para teñir muestras de fluido. Además, la reducción en las interacciones de apilamiento  $\pi$  mediante el uso de DMSO con respecto al acetonitrilo, se contraindica en Norberg, Jan & Nilsson Lennart, Solvent Influence on Base Stacking, Biophysical Journal, Vol. 74, 394-402, enero de 1998 (Biophysical Society), al descubrir que el apilamiento de bases en un disolvente se ve más favorecido a medida que aumenta la constante dieléctrica del disolvente. El DMSO, con una constante dieléctrica de 47,24 (20 °C), se indicaría como más favorable a tales interacciones de apilamiento que el acetonitrilo, con una constante dieléctrica inferior de 36,64 (20 °C). Sin embargo, por el contrario, la mejora del rendimiento encontrada con el uso de DMSO con respecto al acetonitrilo es sorprendente e inesperada al proporcionar una mejora significativa en la precisión de los resultados de la citometría de flujo para cuantificar las partículas de virus no asociadas en muestras de fluido a través de una serie de virus diferentes.

También se descubrió que el rendimiento de las formulaciones de tinción fluorogénica preparadas en medios líquidos acuosos puede mejorarse significativamente al incluir una cantidad significativa (aunque una cantidad menor en una base molar) de DMSO en el medio líquido acuoso de la formulación de tinción fluorogénica que se usa para teñir muestras de fluido, y que da como resultado una cantidad significativa (aunque una cantidad menor en una base molar) de DMSO también presente en la muestra de fluido teñida final que luego se somete a citometría de flujo. Además, aunque la discusión se presenta en relación con la inclusión de tal cantidad significativa de DMSO en la composición de tinción fluorogénica acuosa, que se prefiere, el concepto no está limitado, y un efecto beneficioso similar puede obtenerse mediante el uso de otros líquidos de disolventes orgánicos polares, por ejemplo, acetonitrilo, y la discusión de ese aspecto de esta descripción, aunque se proporciona principalmente con referencia a DMSO como componente líquido orgánico, se aplica igualmente a otros componentes líquidos orgánicos, tales como, por ejemplo, acetonitrilo.

También se descubrió que los problemas asociados con los recuentos de partículas en blanco, que se cree que son atribuibles a los agregados de moléculas de colorante fluorogénico, pueden reducirse significativamente al incluir un disacárido en las muestras de fluido teñidas finales, tanto en muestras de fluido en blanco teñidas como en muestras de fluido teñidas con el material biológico de interés para la evaluación por citometría de flujo. Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que la presencia del disacárido en solución en la muestra de fluido teñida, ayuda a dispersar y reducir la agregación de colorantes fluorogénicos, y particularmente aquellos que son más hidrófobos, tales como SYPRP™ Red, para reducir posibles efectos perjudiciales de los agregados de moléculas de colorante altamente fluorescentes durante la citometría de flujo. Sorprendentemente, se encontró que incluso el disacárido disuelto en muestras de fluido teñidas redujo significativamente los recuentos de partículas en blanco, mientras que la inclusión del monosacárido o el trisacárido disuelto no se encontró que proporcione ningún beneficio significativo y, en algunos casos, fue perjudicial.

Un primer aspecto de la presente invención se orienta a un método para la evaluación por citometría de flujo de una muestra de fluido para partículas del tamaño de un virus no asociadas teñidas con múltiples colorantes fluorogénicos susceptibles a interacciones de apilamiento  $\pi$  en líquido acuoso, comprendiendo el método:

someter una muestra de fluido teñida a la evaluación por citometría de flujo para partículas del tamaño de un virus, en donde la muestra de fluido teñida comprende:

material biológico para evaluarse por citometría de flujo para detectar la presencia de las partículas de tamaño de un virus no asociadas;

una pluralidad de diferentes colorantes fluorogénicos, cada uno con una firma de emisión fluorescente diferente, y conteniendo cada uno al menos un grupo aromático susceptible a apilamiento  $\pi$ , incluyendo la pluralidad de diferentes colorantes fluorogénicos al menos un primer colorante fluorogénico con la primera firma de emisión fluorescente, y un segundo colorante fluorogénico con una segunda firma de emisión fluorescente que es distinta de la primera característica de emisión fluorescente; y

un líquido acuoso en el que se dispersan el material biológico y los colorantes fluorogénicos; en donde la evaluación por citometría de flujo comprende

someter la muestra de fluido teñida a citometría de flujo en un citómetro de flujo para detectar y contar las apariciones de las partículas del tamaño de un virus teñidas no asociadas, tanto con el primer colorante fluorogénico como con el segundo colorante fluorogénico; y

en donde el líquido acuoso de la muestra de fluido teñido comprende disacárido disuelto.

El método de la presente invención se define en la reivindicación 9.

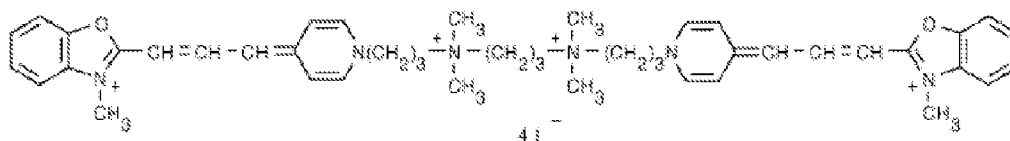
La composición de colorante en polvo seco incluye una pluralidad de diferentes colorantes fluorogénicos, que pueden incluir solo el primer colorante fluorogénico y el segundo colorante fluorogénico, o pueden incluir uno o más colorantes fluorogénicos adicionales, además del primer colorante fluorogénico y el segundo colorante fluorogénico. En algunas implementaciones preferidas, la formulación de colorante en polvo seco consiste esencialmente en, o consiste solo en, la pluralidad de diferentes colorantes fluorogénicos que, como se indica, puede constituirse únicamente por el primer colorante fluorogénico y el segundo colorante fluorogénico.

Los grupos aromáticos incluyen una estructura cíclica que tiene uno o más anillos con una configuración de cubierta de electrones muy estable y una estructura generalmente plana, y generalmente son susceptibles a interacciones de apilamiento  $\pi$  en líquidos acuosos, aunque el grado de susceptibilidad puede variar en base al grupo aromático particular y la estructura molecular particular en la que se contenga el grupo aromático. Cada uno de los colorantes fluorogénicos tiene al menos uno de dichos grupos aromáticos susceptible a las interacciones de apilamiento  $\pi$  en líquidos acuosos. Dichos grupos aromáticos pueden ser homocíclicos, que contienen solo átomos de carbono en el anillo o anillos aromáticos, o heterocíclicos, que contienen uno o más átomos diferentes del carbono (denominados heteroátomos) en el anillo o anillos aromáticos. Un anillo aromático que contiene solo átomos de carbono en el anillo puede denominarse anillo homoaromático, y un anillo aromático que contiene un heteroátomo en el anillo puede denominarse anillo heteroaromático. Algunos heteroátomos comunes incluyen nitrógeno, oxígeno y azufre, y un grupo aromático de un colorante fluorogénico puede incluir uno o más de estos u otros heteroátomos. Dicho grupo aromático puede incluir a menudo un anillo aromático de 6 miembros y/o un anillo aromático de 5 miembros, cada uno de los cuales puede ser independientemente un anillo homocíclico o un anillo heterocíclico. Dicho grupo aromático puede incluir un único anillo aromático o puede ser policíclico, que contiene múltiples anillos aromáticos en el grupo aromático. Dicho grupo aromático puede ser parte de un resto de anillo fusionado, por ejemplo, que incluye un anillo aromático de 6 miembros fusionado con uno o ambos de un anillo aromático de 5 miembros y un anillo aromático de 6 miembros. Un tipo importante de resto de anillo fusionado utilizado en colorantes fluorogénicos incluye un anillo homoaromático de 6 miembros fusionado con un anillo heteroaromático de 6 miembros, por ejemplo, que incluye nitrógeno como heteroátomo. Otro tipo importante de resto de anillo condensado usado en colorantes fluorogénicos incluye anillo homoaromático de 6 miembros fusionado con un anillo heteroaromático de 5 miembros, y en el que el anillo

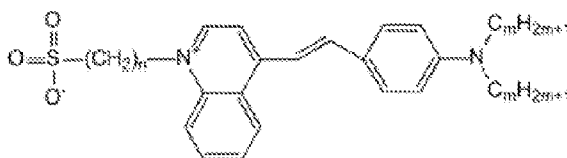
heteroaromático incluye tanto nitrógeno como oxígeno, como heteroátomos, o tanto nitrógeno como azufre, como heteroátomos. Ejemplos de algunos colorantes fluorogénicos que tienen tales restos de anillo fusionados se describen, por ejemplo, en la patente número "US-5.410.030" y la patente número "US-5.616.502". Muchos colorantes fluorogénicos útiles para usar con los aspectos de esta descripción, son los colorantes de cianina, y uno o más de los colorantes fluorogénicos pueden ser un colorante de cianina. Los colorantes de cianina son aquellos que incluyen enlaces de grupo metilo ( $=CH-$ ). Un grupo importante de colorantes de cianina se denomina colorantes de merocianina, que tienen un heterociclo de nitrógeno cuaternario enlazado a un resto donador de par de electrones por un puente de alquileo o de polialquileo. Los colorantes fluorogénicos descritos en las patentes números "US-5.410.030" y "US-5.616.502", son ejemplos de colorantes de cianina, siendo los de la patente número "US-5.616.502" ejemplos de colorantes de merocianina. Los colorantes de cianina descritos en la patente número "US-5.410.030" son dímeros de cianina, y más particularmente ciertos dímeros de colorantes de cianina asimétricos. Uno o más de, o todos, la pluralidad de diferentes colorantes fluorogénicos pueden ser colorantes de cianina, y pueden ser colorantes de cianina como se describe en las patentes de números "US-5.410.030" y "US-5.616.502".

En algunas implementaciones preferidas, el primer colorante fluorogénico es para la tinción no específica de ácido nucleico. En algunas implementaciones preferidas, el segundo colorante fluorogénico es para la tinción de proteínas no específica. En algunas implementaciones particularmente preferidas, el primer colorante fluorogénico es para la tinción de ácido nucleico no específica, y el segundo colorante fluorogénico es para la tinción de proteínas no específica. Preferiblemente, el primer colorante fluorogénico para la tinción de ácido nucleico no específica, y el segundo colorante fluorogénico para la tinción de proteínas no específica, son cada uno colorantes de cianina y, más preferiblemente, con el segundo colorante fluorogénico siendo un colorante de merocianina.

Un ejemplo específico de un colorante fluorogénico para la tinción de ácido nucleico no específica, que puede usarse como el primer colorante fluorogénico, es la tinción de ácido nucleico POPO<sup>TM</sup>-3 yoduro (ThermoFisher Scientific), que es un dímero de cianina de un tipo como se describe en la patente número "US-5.410.030", y que se ha indicado que tiene la siguiente fórmula química (p. ej., en [www.thermofisher.com/orden/catalog/product/P3\\_5\\_84](http://www.thermofisher.com/orden/catalog/product/P3_5_84)):



Un ejemplo específico de un colorante fluorogénico para la tinción de proteínas no específica, que puede usarse como el segundo colorante fluorogénico, es la tinción de proteínas SYPRO<sup>TM</sup> Red (ThermoFisher Scientific), que es un colorante de merocianina de un tipo como se describe en la patente número "US-5.616.502", y que se ha indicado que se basa en la siguiente fórmula química (p. ej., en [de.wikipedia.org/wiki/SYPRO\\_Red#cite\\_nota-Demchenko-1](http://de.wikipedia.org/wiki/SYPRO_Red#cite_nota-Demchenko-1)):



donde m es 5 o 6, y n es un número entero de 2 a 4.

Algunos otros colorantes fluorogénicos ilustrativos para usar con los diferentes aspectos de esta descripción, incluyen: Tinción de ácido nucleico YOYO<sup>TM</sup>-1 yoduro (ThermoFisher Scientific), tinción de ácido nucleico YO-PRO<sup>TM</sup>-1 yoduro (ThermoFisher Scientific), tinción de proteína SYPRO<sup>TM</sup> Tangerine (ThermoFisher Scientific), tinción de proteína Kryptón<sup>TM</sup> (ThermoFisher Scientific), y tinción de ácido nucleico SYBR<sup>TM</sup> Green, tales como SYBR<sup>TM</sup> Green I y SYBR<sup>TM</sup> Green II (ThermoFisher Scientific).

La formulación de colorante concentrada puede consistir preferiblemente, esencialmente en, y más preferiblemente puede consistir solo en, la pluralidad de diferentes colorantes fluorogénicos y el primer medio líquido. Cuando el primer medio líquido sea un medio líquido orgánico, la formulación de colorante concentrada puede denominarse formulación de colorante concentrada orgánica. La formulación de colorante concentrada puede consistir preferiblemente esencialmente en, y más preferiblemente puede consistir solo en, el primer colorante fluorogénico, el segundo colorante fluorogénico, y el primer medio líquido. En aras de la brevedad, la pluralidad de diferentes colorantes fluorogénicos a veces en la presente memoria, simplemente se denomina los colorantes fluorogénicos.

Durante el segundo procesamiento preparatorio, se puede añadir suficiente diluyente líquido acuoso a la formulación de colorante concentrada para diluir el primer medio líquido, de manera que el medio líquido acuoso de la formulación de colorante diluida en agua tenga una relación en peso de agua a DMSO que típicamente será mayor y, a menudo, mucho mayor, que en la formulación de colorante concentrada. En algunas implementaciones, el medio líquido acuoso de la formulación de colorante diluida en agua puede tener una relación de peso relativamente grande de agua a

DMSO, cuya relación en peso puede ser, en algunas implementaciones, de al menos 10:1, al menos 25:1, al menos 50:1, al menos 75:1, o al menos 100:1. En algunas implementaciones, dicha relación en peso de agua a DMSO en la formulación de colorante diluida en agua puede ser hasta (no mayor de) 1000:1, 750:1, 500:1, 300:1 o 200:1. Un intervalo particularmente preferido para dicha relación de peso de agua a DMSO en la formulación de colorante diluida en agua para algunas implementaciones, cuando la relación de peso de agua a DMSO en la formulación de colorante diluida en agua sea relativamente grande, es que la relación de peso esté en un intervalo de 10:1 a 200:1. En algunas implementaciones, la formulación de colorante diluida en agua puede comprender al menos el 80 por ciento en peso de agua, al menos el 85 por ciento en peso de agua, al menos el 90 por ciento en peso de agua, al menos el 95 por ciento en peso de agua, o al menos el 97 por ciento en peso de agua. En algunas implementaciones, la formulación de colorante diluida en agua puede comprender no más del 99,8 por ciento en peso de agua, o no más del 99,5 por ciento en peso de agua y, frecuentemente, no más del 99,1 por ciento en peso de agua. El diluyente líquido acuoso puede ser, o incluir, un producto de agua purificado, y preferiblemente es una solución tamponada acuosa, tal como cualquiera de las usadas en el procesamiento de materiales biológicos. En algunas implementaciones preferidas, la solución tampón es una solución tampón de cloruro de sodio que contiene TRIS y EDTA. Una formulación acuosa de colorante diluida en agua de esta descripción, en la presente memoria a menudo se denomina simplemente una formulación de colorante diluida en agua, por brevedad. En algunas implementaciones, cuando la formulación de colorante diluida en agua se prepara con una relación de peso relativamente grande de agua a DMSO, la formulación de colorante diluida en agua puede tener un límite de concentración superior de DMSO de hasta el (no mayor del) 9 por ciento en peso, el 8 por ciento en peso, el 7 por ciento en peso, el 6 por ciento en peso, el 4 por ciento en peso, el 2 por ciento en peso, el 1 por ciento en peso, o el 0,5 por ciento en peso; aunque en tales implementaciones, la formulación de colorante diluida en agua puede tener, opcionalmente, un límite de concentración inferior de DMSO de al menos el 0,1 por ciento en peso, al menos el 0,2 por ciento en peso, al menos el 0,4 por ciento en peso, al menos el 0,8 por ciento en peso, al menos el 1 por ciento en peso, al menos el 2 por ciento en peso, el 3 por ciento en peso, el 5 por ciento en peso, o el 7 por ciento en peso, siempre que en un intervalo de concentración el límite de concentración superior sea mayor que el límite de concentración inferior del intervalo.

La consecución de la relación de peso deseada de agua a DMSO en la formulación de colorante diluida en agua implica diluir el primer medio líquido con el diluyente líquido acuoso en una relación de volumen grande del volumen añadido de diluyente líquido acuoso al volumen del primer medio líquido, para lograr relaciones en peso preferidas de agua a DMSO en la formulación de colorante diluida en agua. Para las implementaciones que usan una relación de peso relativamente grande de agua a DMSO, la relación de volumen de agua a DMSO puede ser de al menos 10:1, al menos 25:1, al menos 50:1, al menos 75:1, o al menos 100:1, y a menudo no es superior a 1000:1, 750:1, 500:1, 300:1 o 200:1, con un intervalo de 10:1 a 200:1 particularmente preferido para algunas implementaciones.

En algunas otras implementaciones, se ha descubierto que puede proporcionarse una estabilidad mejorada de la formulación de colorante diluida en agua, al preparar la formulación de colorante diluida en agua para que incluya una mayor proporción de DMSO a agua (o, por el contrario, una relación de peso más pequeña de agua a DMSO) que en las implementaciones que se acaban de analizar que contienen una relación de peso relativamente grande de agua a DMSO, y que también da como resultado muestras de fluido teñidas que tienen una mayor concentración de DMSO según se alimenta a un citómetro de flujo para la evaluación por citometría de flujo. Aunque incluso en las implementaciones en que el DMSO esté presente en una proporción más grande, el DMSO seguirá siendo típicamente un componente minoritario en una base molar, y también a menudo en base al peso, con respecto al agua. Como se apreciará, al ser una formulación acuosa, el agua será el componente presente en la formulación de colorante diluida en agua a la mayor concentración en una base molar, incluso en implementaciones que contengan una proporción relativamente grande de DMSO que las implementaciones analizadas anteriormente que tienen una relación de peso relativamente grande con respecto a DMSO. En algunas implementaciones en las que la formulación de colorante diluida en agua incluya una mayor concentración de DMSO, la formulación de colorante diluida en agua puede tener un límite de concentración inferior para DMSO, de al menos el 10 por ciento en peso, al menos el 12 por ciento en peso, al menos el 15 por ciento en peso, al menos el 17 por ciento en peso, o al menos el 20 por ciento en peso. Dicha formulación de colorante diluida en agua puede, en algunas implementaciones, tener un límite de concentración superior para DMSO, no mayor del 50 por ciento en peso, no mayor del 45 por ciento en peso, no mayor del 40 por ciento en peso, no mayor del 35 por ciento en peso, no mayor del 30 por ciento en peso, no mayor del 25 por ciento en peso, no mayor del 22 por ciento en peso, no mayor del 18 por ciento en peso, no mayor del 16 por ciento en peso, no mayor del 13 por ciento en peso o no mayor del 11 por ciento en peso, siempre que en un intervalo de concentración para DMSO, el límite de concentración superior del intervalo será mayor que el límite de concentración inferior del intervalo. Durante el segundo procesamiento preparatorio, el primer medio líquido puede diluirse con el diluyente líquido acuoso para preparar el medio líquido acuoso de la formulación de colorante diluida en agua para tener una relación en peso de agua a DMSO en algunas implementaciones, de al menos 10:7, al menos 10:6, al menos 10:5, al menos 10:4, al menos 10:3, al menos 10:2,5, al menos 10:2, o al menos 10:1,5. La estabilidad de la formulación de tinción parece aumentar generalmente con una concentración creciente de DMSO en la formulación de tinción diluida en agua, aunque a concentraciones de DMSO por encima de aproximadamente el 20 por ciento en peso, el DMSO puede comenzar a mostrar cierta actividad biocida que podría ser perjudicial para el material biológico en investigación y para una evaluación por citometría de flujo de ese material biológico. Aunque las concentraciones más altas de DMSO se pueden acomodar en la formulación de colorante diluida en agua porque la concentración de DMSO se diluirá hasta una concentración más baja en la muestra de fluido teñida final, cuando se usan concentraciones relativamente grandes de DMSO en la formulación de colorante diluida en agua, se aconseja el cuidado al introducir

lentemente el DMSO y dispersar rápidamente (p. ej., mediante mezcla vigorosa) el DMSO introducido en la muestra de fluido que se tiñe, para reducir o evitar los efectos perjudiciales de los impactos de concentración localizados en el material biológico dentro de la muestra de fluido. En algunas implementaciones preferidas, el medio líquido acuoso de la formulación de colorante diluida en agua se prepara para contener un porcentaje en peso de DMSO en un intervalo de desde el 10 por ciento en peso de DMSO al 30 por ciento en peso de DMSO, y en algunas implementaciones más preferidas, el medio líquido de la formulación de colorante diluida en agua se prepara para contener un porcentaje en peso de DMSO en un intervalo de desde el 15 por ciento en peso al 25 por ciento en peso. En algunas implementaciones, la muestra de fluido teñida puede incluir una concentración de DMSO de al menos el 0,5 por ciento en peso, al menos el 1 por ciento en peso, al menos el 2 por ciento en peso, al menos el 3 por ciento en peso, al menos el 4 por ciento en peso, al menos el 5 por ciento en peso, al menos el 6 por ciento en peso, o al menos el 7 por ciento en peso; y dicha muestra de fluido teñida puede, en algunas realizaciones, incluir una concentración de DMSO de hasta el (no mayor del) 30 por ciento en peso, el 25 por ciento en peso, el 20 por ciento en peso, el 15 por ciento en peso, el 10 por ciento en peso, o el 8 por ciento en peso.

Parte del DMSO en la formulación de colorante diluida en agua, y en la muestra de fluido teñida, se puede proporcionar en el primer medio líquido usado para disolver los colorantes fluorogénicos durante el primer procesamiento preparatorio, para preparar una formulación de colorante concentrada. Cuando la formulación de colorante diluida en agua se prepara para contener solo una pequeña concentración de DMSO, todo el DMSO para la formulación de colorante diluida en agua y para la muestra de fluido teñida final, puede proporcionarse de manera conveniente en dicho primer medio líquido. Parte del DMSO para la formulación de colorante diluida en agua, y para la muestra de fluido teñida, también se pueden proporcionar de fuentes alternativas de DMSO, que típicamente pueden ser el caso en el que la formulación de colorante diluida en agua sea para contener una mayor concentración de DMSO. Una fuente preferida para proporcionar DMSO para la formulación de colorante diluida en agua es incluir cierta cantidad de DMSO en el diluyente líquido acuoso utilizado para diluir el primer medio líquido de la formulación de colorante concentrada, durante el segundo procesamiento preparatorio. El diluyente líquido acuoso puede incluir el DMSO como componente minoritario en una base molar, y típicamente a una concentración porcentual en peso más baja que DMSO en el primer medio líquido en el que los colorantes fluorogénicos se disuelvan durante el primer procesamiento preparatorio. En algunas implementaciones, el diluyente líquido acuoso puede comprender DMSO a una concentración de al menos el 1 por ciento en peso, al menos el 2 por ciento en peso, al menos el 5 por ciento en peso, al menos el 7 por ciento en peso, al menos el 10 por ciento en peso, al menos el 12 por ciento en peso, al menos el 15 por ciento en peso, al menos el 17 por ciento en peso, o al menos el 20 por ciento en peso; aunque en algunas implementaciones el diluyente líquido acuoso puede incluir el DMSO a una concentración de hasta el (no mayor del) 50 por ciento en peso, el 45 por ciento en peso, el 40 por ciento en peso, el 35 por ciento en peso, el 30 por ciento en peso, el 25 por ciento en peso, el 22 por ciento en peso, el 18 por ciento en peso, el 15 por ciento en peso, el 13 por ciento en peso, el 11 por ciento en peso, el 8 por ciento en peso, o el 6 por ciento en peso.

En algunas implementaciones preferidas, la muestra de fluido teñida se prepara para incluir disacárido disuelto, típicamente disuelto en líquido acuoso de la muestra de fluido teñida. En algunas implementaciones, la muestra de fluido teñida puede incluir el disacárido disuelto a una concentración de al menos el 1 por ciento en peso, al menos el 2 por ciento en peso, al menos el 3 por ciento en peso, o al menos el 4 por ciento en peso. En algunas implementaciones, la muestra de fluido teñida puede incluir el disacárido disuelto a una concentración de hasta el (no mayor del) 15 por ciento en peso, no mayor del 12 por ciento en peso, no mayor del 10 por ciento en peso, o no mayor del 8 por ciento en peso. Cuando la muestra de fluido teñida comprende disacárido disuelto, un intervalo preferido para la concentración del disacárido disuelto en la muestra de fluido teñida para muchas implementaciones es del 3 por ciento en peso al 10 por ciento en peso. Aunque concentraciones más altas del disacárido pueden ser aceptables, a medida que aumentan las concentraciones del disacárido, las viscosidades de la solución también aumentan y pueden ser más difíciles de manejar y procesar de manera conveniente. El disacárido puede incluir solo un solo tipo de material de disacárido, o puede incluir una mezcla de múltiples materiales de disacáridos. El disacárido puede incluir, por ejemplo, uno o más de trehalosa, sacarosa, lactosa, lactulosa, melibiosa, melibilosa, celobiosa, nigerosa, isomaltosa, isomaltulosa, maltulosa, rutinosa,  $\beta$ -laminaribiosa, o maltosa, siendo la trehalosa generalmente un material de disacárido preferido.

El disacárido que se incluirá en la muestra de fluido teñida puede proporcionarse en cualquier forma conveniente, y puede introducirse en cualquier paso de procesamiento que lleve la muestra de fluido teñida final. Por ejemplo, parte o la totalidad del disacárido puede introducirse en una muestra de fluido antes y/o después de añadir tinción a la muestra de fluido.

En algunas implementaciones, la preparación de la muestra de fluido teñida puede incluir mezclar al menos una parte de la formulación de colorante diluida en agua, con una muestra de fluido preliminar que contenga el material biológico de interés para la evaluación, y en donde la muestra de fluido preliminar comprenda disacárido para proporcionar al menos una parte del disacárido disuelto en la muestra de fluido teñida. En algunas implementaciones, dicha muestra de fluido preliminar puede tener una concentración del disacárido de al menos el 1,5 por ciento en peso, al menos el 3 por ciento en peso, al menos el 4,5 por ciento en peso, o al menos el 6 por ciento en peso. En algunas implementaciones, dicha muestra de fluido preliminar puede tener una concentración de disacárido de hasta el (no mayor del) 22,5 por ciento en peso, no mayor del 18 por ciento en peso, no mayor del 15 por ciento en peso, o no mayor del 12 por ciento en peso. La muestra de fluido preliminar se puede preparar con el disacárido, al incluir

disacárido en líquido de dilución de muestra acuosa que se mezcla con material biológico de interés en la preparación de una muestra de fluido diluida. Por ejemplo, es común preparar una serie de diluciones de muestras de fluido preparadas a diferentes factores de dilución para la evaluación por citometría de flujo. En el proceso de preparación de dicha muestra de fluido diluida, el líquido de dilución de muestra acuosa, típicamente una solución tampón acuosa, puede incluir parte o la totalidad del disacárido que se va a incluir en la muestra de fluido teñida final. En algunas implementaciones, cuando dicho líquido de dilución de muestra acuosa incluye disacárido, la concentración de disacárido en el líquido de dilución de muestra acuosa puede ser de al menos el 1,5 por ciento en peso, al menos el 3 por ciento en peso, al menos el 4,5 por ciento en peso, o al menos el 6 por ciento en peso. En algunas implementaciones, una concentración de disacárido en el líquido de dilución de muestra acuosa puede ser de hasta el (no mayor del) 22,5 por ciento en peso, no mayor del 18 por ciento en peso, no mayor del 15 por ciento en peso, y no mayor del 12 por ciento en peso. Cuando una muestra de fluido preliminar y/o un líquido de dilución de muestra acuosa comprende disacárido, un intervalo preferido para la concentración del disacárido en la muestra de fluido preliminar y/o el líquido de dilución de muestra acuosa, para muchas implementaciones es del 4,5 por ciento en peso al 15 por ciento en peso, cuyo intervalo es particularmente preferido cuando todo, o esencialmente todo, el disacárido para el disacárido disuelto en el fluido teñido deba proporcionarse en una muestra de fluido preliminar que luego se tiñe para preparar la muestra de fluido teñida. Como se apreciará, debido a que una muestra de fluido preliminar típicamente se compondrá de una gran mayoría de líquido de dilución de muestra acuosa, la concentración de disacárido en una muestra de fluido preliminar puede típicamente estar muy cercana de, y a factores de dilución más grandes puede ser esencialmente igual a, la concentración del disacárido en el líquido de dilución de muestra acuosa utilizado para preparar una muestra de fluido preliminar.

En algunas implementaciones, parte o la totalidad del disacárido para el disacárido disuelto en la muestra de fluido teñida puede proporcionarse en la formulación de colorante diluida en agua, en cuyo caso, en algunas implementaciones, el diluyente líquido acuoso añadido al primer medio líquido de la formulación de colorante concentrada puede incluir disacárido. En algunas implementaciones, cuando la formulación de colorante diluida en agua incluye disacárido, el disacárido puede estar presente en la formulación de colorante diluida en agua a una concentración de al menos el 3 por ciento en peso, al menos el 6 por ciento en peso, al menos el 9 por ciento en peso, o al menos el 12 por ciento en peso. En algunas implementaciones, una concentración de disacárido en la formulación de colorante diluida en agua puede ser de hasta (no mayor del) el 45 por ciento en peso, no mayor del 36 por ciento en peso, no mayor del 30 por ciento en peso, o no mayor del 24 por ciento en peso. En algunas implementaciones, cuando el diluyente líquido acuoso para la preparación de la formulación de tinción incluye disacárido, el disacárido puede estar presente en el diluyente líquido acuoso a una concentración de al menos el 3 por ciento en peso, al menos el 6 por ciento en peso, o al menos el 9 por ciento en peso, o al menos el 12 por ciento en peso. En algunas implementaciones, una concentración de disacárido en el diluyente líquido acuoso puede ser de hasta (no mayor del) el 45 por ciento en peso, no mayor del 36 por ciento en peso, no mayor del 30 por ciento en peso, o no mayor del 24 por ciento en peso. Cuando una formulación de colorante diluida en agua y/o de diluyente líquido acuoso comprende disacárido, un intervalo preferido para la concentración del disacárido en la formulación de colorante diluida en agua y/o en el diluyente líquido acuoso es del 9 por ciento en peso al 30 por ciento en peso, cuyo intervalo es particularmente preferido cuando todo, o esencialmente todo, el disacárido para el disacárido disuelto en el fluido teñido se va a proporcionar en la formulación de colorante diluida en agua. Como se apreciará, debido a que una formulación de colorante diluida en agua típicamente estará compuesta por una gran mayoría de diluyente líquido acuoso, la concentración del disacárido en una formulación de colorante diluida en agua puede estar típicamente muy cerca de, y a menudo esencialmente igual a, la concentración del disacárido en el diluyente líquido acuoso utilizado para preparar la formulación de colorante diluida en agua.

En algunas implementaciones, todo el disacárido para el disacárido disuelto en la muestra de fluido teñida puede proporcionarse ya sea en una muestra de fluido preliminar a teñir, en cuyo caso el disacárido puede ser de uno o más de un líquido de dilución de muestra acuosa utilizado para preparar la muestra de fluido preliminar, o en una formulación de tinción diluida en agua, en cuyo caso el disacárido puede ser de uno o más de un diluyente líquido acuoso utilizado para preparar la formulación de tinción diluida en agua. Como puede apreciarse, las concentraciones de disacárido ilustrativas descritas anteriormente para usar en una muestra de fluido preliminar, líquido de dilución de muestra acuosa, formulación de colorante diluida en agua, o diluyente líquido acuoso, según sea el caso, pueden corresponder a algunas implementaciones preferidas en las que todo el disacárido para el disacárido disuelto en la muestra de fluido teñida puede proporcionarse ya sea en una muestra de fluido preliminar, o en una formulación de colorante diluida en agua, que se mezcle con la muestra de fluido preliminar (preferiblemente, en una relación de volumen de la muestra de fluido preliminar a la formulación de colorante diluida en agua de aproximadamente 2: 1) para preparar la muestra de fluido teñida que se someta a la citometría de flujo, aunque cuando se prepara una muestra de fluido teñida con una concentración muy alta de disacárido disuelto, concentraciones incluso más altas de disacárido que se requerirían en una única composición de fluido precursor (p. ej., la formulación de tinción diluida en agua o la muestra de fluido preliminar) pueden, para fines prácticos relacionados con los límites de solubilidad y/o altas viscosidades de solución para algunos disacáridos, llevar a la división de la alimentación total de disacárido entre múltiples fluidos precursores (p. ej., tanto en una formulación de tinción diluida en agua como en una muestra de fluido preliminar).

En algunas otras implementaciones, una parte del disacárido para el disacárido disuelto para la muestra de fluido teñida puede proporcionarse en la muestra de fluido preliminar, y otra parte del disacárido para dicho disacárido

disuelto en la muestra de fluido teñida puede proporcionarse en la formulación de colorante diluida en agua, ya sea motivada o no por consideraciones prácticas de procesamiento, como se indicó anteriormente. En tales otras implementaciones, la concentración del disacárido puede ser igual o diferente en la muestra de fluido preliminar y la formulación de tinción diluida en agua. Dichas concentraciones del disacárido en la muestra de fluido preliminar (y en el líquido de dilución de muestra acuosa) y en la formulación de tinción diluida en agua (y en el diluyente líquido acuoso) pueden, por ejemplo, cada una encontrarse en los intervalos de concentración resumidos anteriormente para la muestra de fluido preliminar y la formulación de colorante diluida en agua, o pueden encontrarse en diferentes intervalos ajustados a las proporciones relativas del disacárido proporcionadas en cada uno de ellos, siempre que las cantidades combinadas del disacárido proporcionen la concentración deseada del disacárido disuelto en la muestra de fluido teñida. Como ejemplo, la concentración de disacárido en una o ambas de la muestra de fluido preliminar (y del líquido de dilución de muestra acuosa) y de la formulación de tinción diluida en agua (y del diluyente líquido acuoso) puede encontrarse en niveles de concentración descritos anteriormente para la muestra de fluido teñida, es decir, una concentración de disacárido de al menos el 1 por ciento en peso, al menos el 2 por ciento en peso, al menos el 3 por ciento en peso, o al menos el 4 por ciento en peso y/o no superior al 15 por ciento en peso, no superior al 12 por ciento en peso, no superior al 10 por ciento en peso, o no superior al 8 por ciento en peso. Además, toda o una parte del disacárido para el disacárido disuelto en la muestra de fluido teñida puede proporcionarse desde una fuente distinta de una muestra de fluido preliminar o de una formulación de colorante diluida en agua. Como se apreciará, en algunas implementaciones, una muestra de fluido preliminar (y el líquido de dilución de muestra acuosa utilizado para hacer la muestra de fluido preliminar) y la formulación de colorante diluida en agua (y el líquido de diluyente acuoso utilizado para preparar la formulación de colorante diluida en agua) pueden todos tener concentraciones de disacárido que sean iguales, o aproximadamente iguales, que la concentración final del disacárido disuelto en la muestra de fluido teñida.

Se observa que el disacárido en una muestra de fluido preliminar (y el líquido de dilución de muestra acuosa utilizado para hacer la muestra de fluido preliminar) y en una formulación de colorante diluida en agua (y el líquido diluyente acuoso utilizado para preparar la formulación de colorante diluida en agua), se disolverá típicamente en líquido acuoso de la composición respectiva, aunque para mayor claridad de la descripción, el término “disacárido disuelto” se usa en la presente memoria principalmente en referencia al disacárido en la muestra de fluido teñida.

Cada uno de la pluralidad de diferentes colorantes fluorogénicos puede incluirse en la composición de colorante en polvo seco en cantidades tales como para proporcionar una concentración deseada para cada colorante fluorogénico en la formulación de colorante concentrada, y finalmente en la formulación de colorante diluida en agua. En términos de concentración molar, la formulación de colorante diluida en agua se puede preparar de manera que cada uno de la pluralidad de diferentes colorantes fluorogénicos (incluyendo cada uno del primer colorante fluorogénico en el segundo colorante fluorogénico) pueda tener independientemente una concentración dentro de un intervalo que tenga un límite inferior seleccionado del grupo que consiste en 0,1 micromoles por litro, 1 micromol por litro, 10 micromoles por litro, y 100 micromoles por litro, y un límite superior seleccionado del grupo que consiste en 2500 micromoles por litro, 2000 micromoles por litro, 1500 micromoles por litro, y 1000 micromoles por litro. En términos de concentración de peso a volumen, la formulación de colorante diluida en agua puede prepararse de manera que cada uno de la pluralidad de diferentes colorantes fluorogénicos (incluyendo cada uno del primer colorante fluorogénico y el segundo colorante fluorogénico) pueda tener independientemente una concentración dentro de un intervalo que tenga un límite inferior y seleccionado del grupo que consiste en 1 microgramo por mililitro, 10 microgramos por mililitro, 50 microgramos por mililitro, y un límite superior seleccionado del grupo que consiste en 1000 microgramos por mililitro, 500 microgramos por mililitro, y 250 microgramos por mililitro. Una concentración de peso a volumen de cada uno de la pluralidad de colorantes fluorogénicos (incluyendo cada uno del primer colorante fluorogénico y el segundo colorante fluorogénico) en la formulación de colorante concentrada, puede ser al menos 5 veces mayor, al menos 10 veces mayor, al menos 50 veces mayor, al menos 75 veces mayor, o al menos 100 veces mayor que una concentración de peso a volumen correspondiente en la formulación de colorante diluida en agua.

El primer procesamiento preparatorio comprende preferiblemente, después de mezclar la composición de colorante en polvo seco con el primer medio líquido, lo que permite que la mezcla resultante se asiente durante un tiempo de residencia (también denominado tiempo de incubación) antes de diluir el primer medio líquido con el diluyente líquido acuoso durante el segundo procesamiento preparatorio. El tiempo de residencia es preferiblemente al menos 6 minutos, más preferiblemente al menos 7 minutos, incluso más preferiblemente al menos 8 minutos, y aún más preferiblemente al menos 9 minutos. Típicamente, el tiempo de residencia no necesita durar más de 20 minutos, y preferiblemente no más de 15 minutos. Se prefiere un tiempo de residencia de aproximadamente 10 minutos para algunas implementaciones.

El método puede realizarse para preparar un lote de la formulación de colorante diluida en agua, que sea suficiente para teñir múltiples muestras de fluido para preparar múltiples muestras de fluido teñidas para la evaluación por citometría de flujo, y preferiblemente todas estas muestras de fluido teñidas se someterían a citometría de flujo dentro de las 4 horas después de completar la preparación de la formulación de colorante diluida en agua. El método puede incluir la preparación de una pluralidad de muestras de fluido teñidas, mediante el uso de diferentes alcuotas de la formulación de colorante diluida en agua. La citometría de flujo puede incluir alimentar, de cualquier manera conveniente, la muestra de fluido teñida al citómetro de flujo. Una pluralidad de tales muestras de fluido teñidas con un solo lote de la formulación de colorante diluida en agua, se pueden disponer en una placa de múltiples pocillos, y

retirarse secuencialmente de la placa de múltiples pocillos, y alimentarlas a un citómetro de flujo mediante un muestreador automático.

El citómetro de flujo puede ser cualquier citómetro de flujo configurado para evaluar partículas del tamaño de un virus mediante detección y análisis de respuestas de emisión fluorescente de la pluralidad de colorantes fluorogénicos. El citómetro de flujo puede ser de un tipo en el que la muestra de fluido teñida fluya a través de la celda de flujo del citómetro de flujo sin enfocar hidrodinámicamente la muestra de fluido teñida con un fluido envolvente. Sin embargo, en las implementaciones preferidas, el citómetro de flujo es de un tipo en el que la muestra de fluido teñida se enfoca hidrodinámicamente con un fluido envolvente introducido alrededor de la muestra de fluido que fluye antes de la introducción de la muestra de fluido teñida en la celda de flujo del citómetro de flujo. En la celda de flujo, la muestra de fluido teñida, preferiblemente en un estado hidrodinámicamente enfocado, se somete a uno o más estímulos para estimular una respuesta de emisión fluorescente de cada colorante fluorogénico (incluido el primer colorante fluorogénico en el segundo colorante fluorogénico) cuando se une a una partícula del tamaño de un virus no asociada teñida con dicho colorante fluorogénico, y detectar la firma de emisión fluorescente de cada uno de la pluralidad de colorantes fluorogénicos. El uno o más estímulos a los que se somete la muestra de fluido teñida en la celda de flujo, pueden incluir preferiblemente al menos una radiación de excitación. Dicha radiación de excitación puede ser de un intervalo de longitud de onda suficiente para estimular la respuesta de emisión fluorescente de al menos uno, y opcionalmente múltiples, de la pluralidad de colorantes fluorogénicos cuando se unen a una partícula del tamaño de un virus. El uno o más estímulos pueden incluir múltiples radiaciones de excitación diferentes que tengan diferentes intervalos de longitud de onda, para estimular respuestas de emisión fluorescentes de diferentes de la pluralidad de colorantes fluorogénicos. En el procesamiento de citometría de flujo preferido, el caudal de la muestra de fluido teñida, y preferiblemente en un estado hidrodinámicamente enfocado, a través de la celda de flujo se mantiene a un caudal muy bajo para mejorar la detección precisa de partículas del tamaño de un virus teñidas, y preferiblemente tal caudal de la muestra de fluido teñida a través de la celda de flujo, se encuentra en un intervalo que tenga un límite inferior de 300 nanolitros por minuto, 600 nanolitros por minuto, u 800 nanolitros por minuto, y un límite superior de 6000 nanolitros por minuto, 3000 nanolitros por minuto, o 2000 nanolitros por minuto, más preferiblemente en un intervalo de 600 nanolitros por minuto a 3000 nanolitros por minuto, más preferiblemente en un intervalo de 600 nanolitros por minuto a 2000 nanolitros por minuto. La citometría de flujo comprende preferiblemente detectar por separado cada una de la pluralidad de diferentes firmas de emisión fluorescente de la pluralidad de colorantes fluorogénicos diferentes, y correlacionar el tiempo de la detección de al menos una firma de emisión fluorescente de este tipo (p. ej., del primer colorante fluorogénico) y la detección de al menos otra firma de emisión fluorescente de este tipo (p. ej., del segundo colorante fluorogénico), para determinar un evento de detección indicativo de una aparición del paso a través de la celda de flujo de una partícula del tamaño de un virus no asociada teñida, con cada uno de los tiempos en que diferentes colorantes fluorogénicos para los que las firmas de emisión fluorescente se correlacionan en el tiempo (p. ej., una partícula del tamaño de un virus teñida tanto con el primer colorante fluorogénico como con el segundo colorante fluorogénico). Dicha correlación de tiempo también puede usarse para identificar una aparición de una partícula del tamaño de un virus que pase a través de la celda de flujo, que se tiña con uno de la pluralidad de colorantes fluorogénicos (p. ej., teñida con el segundo colorante fluorogénico) y no otro de la pluralidad de colorantes fluorogénicos (p. ej., no teñida con el primer colorante fluorogénico), por ejemplo, para identificar una partícula de tamaño de un virus con un colorante fluorogénico adjunto unido de forma no específica al contenido proteico, y no estar unido a otro colorante fluorogénico para tinción no específica de contenido de ácido nucleico, indicativo de una proteína que contiene partículas y que no contiene material genético. Un citómetro de flujo preferido configurado para la evaluación por citometría de flujo de partículas del tamaño de un virus teñidas con fluorescencia, es el citómetro de flujo Virus Counter® 3100.

También se describe un kit para partículas del tamaño de un virus no asociadas con tinción fluorescente con múltiples colorantes fluorogénicos para la evaluación por citometría de flujo para partículas del tamaño de un virus no asociadas en una muestra de fluido, comprendiendo el kit:

una composición de colorante en polvo seco en un primer recipiente sellado, comprendiendo la composición de colorante en polvo seco una mezcla en polvo seco de una pluralidad de diferentes colorantes fluorogénicos, teniendo cada uno una firma de emisión fluorescente diferente, y conteniendo cada uno al menos un grupo aromático susceptible a interacciones de apilamiento  $\pi$  en medios líquidos acuosos, incluyendo la pluralidad de diferentes colorantes fluorogénicos al menos un primer colorante fluorogénico con una primera firma de emisión fluorescente, y un segundo colorante fluorogénico con una segunda firma de emisión fluorescente que es diferente de la primera firma de emisión fluorescente;

un primer medio líquido en un segundo recipiente sellado, comprendiendo el primer medio líquido dimetilsulfóxido (DMSO), y comprendiendo preferiblemente al menos el 34 por ciento en moles de DMSO; y

un diluyente líquido acuoso en un tercer recipiente sellado; y

opcionalmente, con el primer recipiente sellado, el segundo recipiente sellado y el tercer recipiente sellado empaquetados en un recinto de empaquetado común.

Los recipientes sellados del primer, segundo y tercer recipientes sellados pueden tener cualquier configuración sellada, por ejemplo, recipientes flexibles, botellas, viales o bandejas sellados. El kit puede tener múltiples de uno o más del primer recipiente sellado, segundo recipiente sellado o tercer recipiente sellado. Por ejemplo, el kit puede tener una pluralidad de diferentes partes de la composición en polvo seco contenida en una pluralidad correspondiente de diferentes primeros recipientes sellados. El recinto de empaquetado común puede ser, por ejemplo, una caja, bolsa o recipiente flexible. El kit puede incluir uno o más reactivos u otros componentes además de la composición de colorante en polvo seco, el medio líquido que contiene DMSO, y el diluyente líquido acuoso.

Un segundo aspecto de la presente invención se orienta a una composición de tinción fluorogénica para la tinción fluorescente de partículas del tamaño de un virus no asociadas, con múltiples colorantes fluorogénicos para la evaluación por citometría de flujo para las partículas del tamaño de un virus no asociadas teñidas, en una muestra de fluido, comprendiendo la composición de tinción fluorogénica:

una pluralidad de colorantes fluorogénicos diferentes que tienen cada uno una firma de emisión fluorescente diferente y cada una contiene al menos un grupo aromático susceptible a apilamiento  $\pi$ , incluyendo la pluralidad de diferentes colorantes fluorogénicos al menos un primer colorante fluorogénico con una primera firma de emisión fluorescente, y un segundo colorante fluorogénico con una segunda firma de emisión fluorescente que es diferente de la primera firma de emisión fluorescente; y

un medio líquido acuoso en el que se disuelven la pluralidad de diferentes colorantes fluorogénicos, comprendiendo el medio líquido acuoso un disacárido disuelto en el medio líquido acuoso.

La descripción proporcionada en la presente memoria se realiza principalmente en el contexto de procesos y composiciones que usan DMSO en un primer medio líquido para disolver colorantes fluorogénicos de una composición de colorante en polvo seco, para preparar una formulación de colorante concentrada, y preparar la formulación de colorante diluida en agua durante el segundo procesamiento preparatorio para incluir DMSO como componentes minoritarios, pero a una concentración significativa. Dicho procesamiento, kits para facilitar dicho procesamiento, y composiciones preparadas y sometidas a la citometría de flujo después de dicho procesamiento, son generalmente implementaciones preferidas del objeto de esta descripción.

También se describe un método para la evaluación por citometría de flujo de una muestra de fluido para partículas del tamaño de un virus no asociadas teñidas con múltiples colorantes fluorogénicos susceptibles a interacciones de apilamiento  $\pi$  en líquidos acuosos, comprendiendo el método:

el primer procesamiento preparatorio para preparar una formulación de colorante concentrada con una pluralidad de diferentes colorantes fluorogénicos, cada uno con una firma de emisión fluorescente diferente, y conteniendo cada uno al menos un grupo aromático susceptible a interacciones de apilamiento  $\pi$  en líquidos acuosos, comprendiendo el primer procesamiento preparatorio disolver los colorantes fluorogénicos en un primer medio líquido de una composición de colorante en polvo seco con una mezcla en polvo seco de la pluralidad de diferentes colorantes fluorogénicos, en donde el primer medio líquido comprende un componente líquido orgánico y la pluralidad de diferentes colorantes fluorogénicos incluye al menos un primer colorante fluorogénico con una primera firma de emisión fluorescente y un segundo colorante fluorogénico con una segunda firma de emisión fluorescente diferente de la primera firma de emisión fluorescente;

después del primer procesamiento preparatorio, el segundo procesamiento preparatorio, mientras que los colorantes fluorogénicos permanecen en solución para preparar una formulación de colorante diluida en agua que comprende la pluralidad de diferentes colorantes fluorogénicos disueltos en un medio líquido acuoso, comprendiendo el segundo procesamiento preparatorio diluir el primer medio líquido con diluyente líquido acuoso;

preparar una muestra de fluido teñido para la evaluación por citometría de flujo, que comprende mezclar al menos una parte de la formulación de colorante diluida en agua, con una muestra de material biológico a evaluar por citometría de flujo para detectar la presencia de partículas del tamaño de un virus no asociadas; y

después de la preparación, someter la muestra de fluido teñida a citometría de flujo en un citómetro de flujo para detectar y contar las apariciones de las partículas del tamaño de un virus no asociadas teñidas con tanto el primer colorante fluorogénico como el segundo colorante fluorogénico;

en donde la muestra de fluido teñida, como se preparó durante la preparación, comprende un disacárido disuelto.

También se describe un kit para partículas del tamaño de un virus no asociadas con tinción fluorescente con múltiples colorantes fluorogénicos para la evaluación por citometría de flujo para partículas del tamaño de un virus no asociadas en una muestra de fluido, comprendiendo el kit:

una composición de colorante en polvo seco en un primer recipiente sellado, comprendiendo la composición de colorante en polvo seco una mezcla en polvo seco de una pluralidad de diferentes colorantes fluorogénicos, teniendo cada uno una firma de emisión fluorescente diferente, y conteniendo cada uno al menos un grupo aromático

susceptible a interacciones de apilamiento  $\pi$  en medios líquidos acuosos, incluyendo la pluralidad de diferentes colorantes fluorogénicos al menos un primer colorante fluorogénico con una primera firma de emisión fluorescente, y un segundo colorante fluorogénico con una segunda firma de emisión fluorescente que es diferente de la primera firma de emisión fluorescente;

5 un primer medio líquido en un segundo recipiente sellado, comprendiendo el primer medio líquido un líquido orgánico, en donde la pluralidad de diferentes colorantes fluorogénicos son solubles en el primer medio líquido para su reconstitución en forma líquida para usar en la tinción;

10 un diluyente líquido acuoso en un tercer recipiente sellado, para diluir el primer medio líquido después de la pluralidad de diferentes colorantes fluorogénicos disueltos en el mismo;

un líquido de dilución de muestra acuosa para preparar muestras de fluido diluidas, con material biológico a teñir para la evaluación por citometría de flujo, teniendo el líquido de dilución de muestra acuosa una composición diferente a la del diluyente líquido acuoso y conteniéndose en un cuarto recipiente sellado; y

15 un disacárido a disolverse en líquido acuoso de muestras de fluido teñidas; y

opcionalmente con el primer recipiente sellado, el segundo recipiente sellado, el tercer recipiente sellado y el cuarto recipiente sellado empaquetados en un recinto de empaquetado común.

### Breve descripción de los dibujos

25 La Figura 1 es un diagrama de bloques de proceso generalizado, que ilustra una realización de un método de esta descripción para la evaluación por citometría de flujo de una muestra de fluido para partículas del tamaño de un virus no asociadas teñidas con múltiples colorantes fluorogénicos susceptibles a interacciones de apilamiento  $\pi$  en líquido acuoso.

30 La Figura 2 ilustra una realización del funcionamiento de un citómetro de flujo para realizar una evaluación por citometría de flujo en una muestra de fluido teñida para partículas del tamaño de un virus, como parte de un método de esta descripción.

35 La Figura 3 ilustra una realización de un kit de esta descripción para partículas del tamaño de un virus no asociadas con tinción fluorescente con múltiples colorantes fluorogénicos, para la evaluación por citometría de flujo para las partículas del tamaño de un virus no asociadas.

40 La Figura 4 es un gráfico de la concentración de partículas de virus medida frente al factor de dilución de la muestra para los resultados de la citometría de flujo para muestras de baculovirus teñidas mediante el uso de formulaciones de colorante diluidas en agua preparadas mediante el uso de DMSO o acetonitrilo en el Ejemplo 2.

45 La Figura 5 es un gráfico de la concentración de partículas de virus medida frente al factor de dilución de la muestra para los resultados de la citometría de flujo para las muestras del virus de la influenza a/Hong Kong/8/1968, teñidas mediante el uso de formulaciones de colorante diluidas en agua preparadas mediante el uso de DMSO o acetonitrilo en el Ejemplo 2.

50 La Figura 6 es un gráfico de la concentración de partículas de virus medida frente al factor de dilución de la muestra para los resultados de la citometría de flujo, los resultados de las muestras del virus de la influenza B/Brisbane/60/2008, teñidas mediante el uso de formulaciones de colorante diluidas en agua preparadas mediante el uso de DMSO o acetonitrilo en el Ejemplo 2.

La Figura 7 es un gráfico de la concentración de partículas de virus medida frente al factor de dilución de la muestra para los resultados de la citometría de flujo para las muestras del Herpes Simplex Virus-1, teñidas mediante el uso de formulaciones de colorante diluidas en agua preparadas mediante el uso de DMSO o acetonitrilo en el Ejemplo 2.

55 La Figura 8 es un gráfico de la concentración de partículas de virus medida frente al factor de dilución de la muestra para los resultados de la citometría de flujo para muestras del virus Cowbone Ridge, teñidas mediante el uso de formulaciones de colorante diluidas en agua preparadas mediante el uso de DMSO o acetonitrilo en el Ejemplo 2.

60 La Figura 9 es un gráfico de la concentración de partículas de virus medida frente al factor de dilución de la muestra para los resultados de la citometría de flujo para muestras del lentivirus, teñidas mediante el uso de formulaciones de colorante diluidas en agua preparadas mediante el uso de DMSO o acetonitrilo en el Ejemplo 2.

65 La Figura 10 es un gráfico de la concentración de virus medida para los resultados de la citometría de flujo de muestras del baculovirus teñidas mediante el uso de formulaciones de colorante diluidas en agua preparadas mediante el uso de DMSO de un recipiente de almacenamiento después de aberturas sucesivas en el Ejemplo 6.

La Figura 11 es un gráfico de la concentración de virus medida para los resultados de la citometría de flujo de muestras del baculovirus teñidas mediante el uso de formulaciones de colorante diluidas en agua preparadas mediante el uso de DMSO de un recipiente de almacenamiento después de aberturas sucesivas en el Ejemplo 6.

5 La Figura 12 es un gráfico de la concentración de virus medida para los resultados de la citometría de flujo de muestras del baculovirus teñidas mediante el uso de formulaciones de colorante diluidas en agua preparadas mediante el uso de DMSO después de la exposición en un entorno húmedo para diferentes períodos de tiempo en el Ejemplo 6.

10 La Figura 13 es un gráfico del recuento de la concentración de partículas de virus para pruebas de citometría de flujo en el Ejemplo 6.

15 La Figura 14 es un diagrama de bloques de proceso generalizado, que ilustra otra realización de un método de esta descripción, para la evaluación por citometría de flujo de una muestra de fluido para partículas del tamaño de un virus no asociadas teñidas con múltiples colorantes fluorogénicos susceptibles a interacciones de apilamiento  $\pi$  en líquido acuoso.

20 La Figura 15 ilustra otra realización de un kit de esta descripción para partículas del tamaño de un virus no asociadas con tinción fluorescente con múltiples colorantes fluorogénicos para la evaluación por citometría de flujo para las partículas del tamaño de un virus no asociadas.

### Descripción detallada

25 Se hace referencia a la Figura 1 con un diagrama de flujo de bloques de proceso generalizado que ilustra una realización de un método de esta descripción para la evaluación por citometría de flujo de la muestra de fluido para partículas del tamaño de un virus no asociadas teñidas con múltiples colorantes fluorogénicos susceptibles a apilamiento  $\pi$  en líquidos acuosos. El procesamiento ilustrado en la Figura 1 incluye el primer procesamiento preparatorio 102 para preparar una formulación 104 de colorante concentrada de materias primas que incluyen una composición 106 de colorante en polvo seco y un primer medio líquido 108, que en este ejemplo se ha preparado previamente para incluir al menos una mayoría por moles de DMSO. Según un método de esta descripción, la 30 composición 106 de colorante en polvo seco incluye una mezcla en polvo seco de una pluralidad de diferentes colorantes fluorogénicos, cada uno con una firma de emisión fluorescente diferente y cada uno contiene al menos un grupo aromático susceptible a las interacciones de apilamiento  $\pi$  en líquido acuoso. Durante el primer procesamiento preparatorio 102, la composición 106 de colorante en polvo seco se combina y mezcla con el primer medio líquido 108 para disolver una pluralidad de diferentes colorantes fluorogénicos de la composición 106 de colorante en polvo seco en el primer medio líquido 108. Disolver los colorantes fluorogénicos de la mezcla en polvo seco de la forma en polvo seco en el primer medio líquido 108 se puede asistir por medios mecánicos, tales como mediante agitación, sacudida, 35 agitación con vórtex, o centrifugación de la mezcla. Como se apreciará, la composición 106 de colorante en polvo seco incluirá al menos dos colorantes fluorogénicos diferentes con diferentes firmas de emisión fluorescente, pero la composición 106 de colorante en polvo seco puede incluir más de dos colorantes fluorogénicos diferentes que tengan cada uno una firma de emisión fluorescente diferente con respecto a la firma de emisión fluorescente de cada uno de los otros colorantes fluorogénicos. En una alternativa de procesamiento preferida, un primer colorante fluorogénico es un colorante para la tinción no específica de ácido nucleico. La formulación 104 de colorante concentrada resultante del primer procesamiento preparatorio incluye la pluralidad de diferentes colorantes fluorogénicos disueltos en el primer medio líquido 108. En el procesamiento ilustrativo mostrado en la Figura 1, el primer medio líquido 108 se ha 40 preparado previamente a una composición deseada, sin embargo, en un procesamiento alternativo, cuando el primer medio líquido incluye uno o más componentes diferentes de DMSO, dicho primer medio líquido puede prepararse *in situ* durante el primer procesamiento preparatorio 102 a través de la mezcla de múltiples tales componentes (p. ej., mezclar DMSO con solución tampón acuosa y/u otro disolvente orgánico) antes o después de mezclarse con la composición 106 de colorante en polvo seco.

50 El procesamiento ilustrado en la Figura 1 incluye, después del primer procesamiento preparatorio 102, el segundo procesamiento preparatorio 110 para preparar una formulación 112 de colorante diluida en agua, con la pluralidad de diferentes colorantes fluorogénicos de la formulación 104 de colorante concentrada disuelta en un medio líquido acuoso. Es importante destacar que, durante el segundo procesamiento preparatorio, la pluralidad de colorantes fluorogénicos en la formulación 104 de colorante concentrada permanece en solución mientras dura el segundo procesamiento preparatorio. En otras palabras, durante el segundo procesamiento preparatorio 110, dichos colorantes fluorogénicos no se precipitan, ni siquiera temporalmente, durante el segundo procesamiento preparatorio 110, y el medio líquido en el que se disuelven los colorantes fluorogénicos se convierte del primer medio líquido, preferiblemente un medio líquido orgánico, a la formulación 112 de colorante diluida en agua, mientras que los colorantes fluorogénicos permanecen en un estado disuelto. Como se muestra en la Figura 1, se proporciona un diluyente 114 líquido acuoso (p. ej., solución tampón acuosa) al segundo procesamiento preparatorio 110, y se mezcla con la formulación 104 de colorante concentrada, para diluir el primer medio líquido 108 con el diluyente 114 líquido acuoso hasta un grado en el que después del segundo procesamiento preparatorio 110 el medio líquido en el que se disuelven los colorantes fluorogénicos se garantiza que sea de naturaleza acuosa, en otras palabras, se compone de al menos una mayoría 60 por moles de agua, preferiblemente con una relación en peso de agua a DMSO de al menos 10:1, o tal relación más grande de peso según se expuso anteriormente para algunas implementaciones cuando la formulación 112 de

colorante diluida en agua deba incluir una relación de peso relativamente grande de agua a DMSO, y de otra manera con una relación menor de peso de agua a DMSO para algunas otras implementaciones cuando la formulación 112 de colorante diluida en agua deba incluir una mayor concentración de DMSO, como se expuso anteriormente. El mezclado del diluyente 114 líquido acuoso con la formulación de colorante concentrada sigue preferiblemente un tiempo de retención o incubación adecuada, después de mezclar la composición de colorante 106 en polvo seco con el medio 108 líquido orgánico. En el procesamiento que se muestra en la Figura 1, el diluyente líquido acuoso se muestra como una sola adición, sin embargo, el diluyente líquido acuoso puede en realizaciones alternativas incluir múltiples adiciones de diferentes alineaciones de diluyente líquido acuoso, que pueden o no tener cada una la misma composición. Cuando la formulación 112 de colorante diluida en agua incluye una concentración mayor de DMSO, como se expuso anteriormente, se puede proporcionar DMSO además de la incluida en el primer medio líquido 108, por ejemplo, como un componente molar minoritario en el diluyente 114 líquido acuoso.

Con referencia continua a la Figura 1, la realización del método ilustrativo incluye el procesamiento para preparar una muestra 116 de fluido teñida para la evaluación por citometría de flujo. Una muestra 120 de fluido teñida resultante está entonces lista para la evaluación por citometría de flujo. Durante el procesamiento para preparar una muestra 116 de fluido teñida, al menos una parte de la formulación 112 de colorante diluida en agua se mezcla con una muestra de material biológico 118, para evaluarse mediante citometría de flujo para detectar la presencia de partículas del tamaño de un virus no asociadas. La muestra de material biológico 118 puede estar de manera conveniente en forma de una composición fluida con material biológico a investigar disuelta o suspendida en un líquido acuoso (p. ej., solución tampón acuosa). Dicha composición fluida puede ser el resultado del procesamiento previo para purificar y preparar el material biológico a investigar, en una forma lista para la evaluación por citometría de flujo, excepto para teñir el material. Como se apreciará, la formulación 112 de colorante diluida en agua se puede preparar como un lote de tamaño suficiente para proporcionar múltiples alícuotas para teñir múltiples muestras de material biológico para la evaluación por citometría de flujo, en cuyo caso el procesamiento de preparación de una muestra 116 de fluido teñida puede realizarse en una pluralidad de distintas muestras de material biológico 118 mediante el uso de diferentes alícuotas de la formulación 112 de colorante diluida en agua, para preparar una pluralidad de muestras 120 de fluido teñidas.

Como se muestra adicionalmente en la Figura 1, la realización ilustrativa ilustrada incluye el procesamiento para someter una muestra de fluido teñida a la citometría 122 de flujo. Durante este procesamiento, la muestra 120 de fluido teñida se introduce y procesa a través de un citómetro de flujo para la evaluación por citometría de flujo para detectar la presencia de partículas del tamaño de un virus no asociadas objetivo, y para detectar y contar las apariciones del virus al menos de partículas de tamaño de un virus no asociadas teñidas con múltiples colorantes fluorogénicos (p. ej., un primer colorante fluorogénico para la tinción de ácido nucleico no específica, y un segundo colorante fluorogénico para la tinción de proteínas no específica). Durante la evaluación por citometría de flujo, un flujo controlado de la muestra 120 de fluido teñida se somete en una celda de flujo del citómetro de flujo, a uno o más estímulos de excitación, tales como luz de uno o más láseres, para provocar la respuesta de emisión fluorescente respectiva de cada colorante fluorogénico con el que se tiña una partícula que pase a través del citómetro de flujo. La luz proveniente de la celda de flujo se detecta mediante uno o más detectores de luz para identificar la presencia de una respuesta de emisión fluorescente de cada uno de dichos colorantes fluorogénicos. La detección simultánea de múltiples respuestas de emisión fluorescente diferentes indica el paso de una partícula teñida con los múltiples diferentes colorantes fluorogénicos, y tal detección simultánea puede contarse como una aparición de una partícula del tamaño de un virus teñida con propiedades indicadas por dichos múltiples colorantes fluorogénicos. Las respuestas de emisión fluorescente de los colorantes fluorogénicos pueden detectarse por separado mediante fotodetectores independientes, cada uno configurado para la detección de la firma de emisión fluorescente específica del colorante fluorogénico objetivo. Las firmas de emisión fluorescente detectada pueden procesarse mediante un sistema de análisis de datos para identificar eventos de detección indicativos de una partícula del tamaño de un virus teñida con el colorante fluorogénico respectivo, y para contar y determinar una concentración de tales partículas del tamaño de virus.

Como puede apreciarse, el procesamiento ilustrativo ilustrado en la Figura 1 puede incluir el procesamiento preparatorio antes del primer procesamiento preparatorio 102. De manera similar, cada uno del primer procesamiento preparatorio 102, el segundo procesamiento preparatorio 110 y el procesamiento para preparar una muestra 116 de fluido teñida, puede incluir múltiples subpasos, que pueden incluir el procesamiento además del descrito anteriormente en la preparación de la formulación 104 de colorante concentrada, en la preparación de la formulación 112 de colorante diluida en agua, o en la preparación de la muestra 120 de fluido teñida que se someta a citometría de flujo. Como ejemplo, durante el procesamiento para preparar una muestra 116 de fluido teñida, pueden añadirse formulaciones de tinción adicionales a la muestra 112 de fluido además de la composición de colorante 114 en polvo seco, por ejemplo para añadir por separado una tinción de fluoróforo, que puede mezclarse en la muestra de fluido en forma de una formulación líquida de tinción. Dicha tinción de fluoróforo puede, por ejemplo, ser una tinción de anticuerpos fluorescente con una molécula de tinción fluorescente conjugada con un anticuerpo específico para unirse a un epítipo dirigido en una partícula del tamaño de un virus dirigida. Dicha tinción de anticuerpos fluorescente puede ser, por ejemplo, de un tipo como se describe en la solicitud de patente número "US-15/558.107", en la actualidad emitida como patente n.º "US-10.161.850", y la publicación de solicitud de patente correspondiente "US-2018/0052163 A1". Dicha tinción de anticuerpos fluorescente puede tener una firma de respuesta de emisión diferente a cada uno de los colorantes fluorogénicos, y puede detectarse en un canal de fotodetección separado del citómetro de flujo.

Con referencia continua a la Figura 1, cuando la muestra 120 de fluido teñida se prepara para que contenga disacárido disuelto, parte o todo el disacárido puede incluirse en el diluyente 114 líquido acuoso utilizado en el segundo procesamiento preparatorio 110 y/o en una muestra de fluido preliminar que contiene el material biológico 118 al que se añade la formulación 112 de colorante diluida en agua, para preparar la muestra 120 de fluido teñida. En una variación del procesamiento que se muestra en la Figura 1, cuando la muestra 120 de fluido teñida incluye disacárido disuelto, el primer procesamiento preparatorio 102 y el segundo procesamiento preparatorio 110 pueden realizarse mediante el uso de uno o más componentes líquidos orgánicos diferentes de DMSO, aunque se prefiere el uso de DMSO, como se describió anteriormente. Por ejemplo, el primer medio líquido 108 puede incluir uno o más componentes líquidos orgánicos (p. ej., acetonitrilo) en lugar de DMSO, y si el diluyente 114 líquido acuoso incluye como componente molar minoritario un componente o componentes líquidos orgánicos, dichos componentes o componentes líquidos orgánicos pueden ser diferentes de DMSO (p. ej., acetonitrilo).

Ahora se hace referencia a la Figura 14, que muestra un diagrama de flujo de bloques de proceso generalizado, que ilustra otra realización de un método de esta descripción. El procesamiento ilustrado en la Figura 14 es el mismo que el ilustrado en la Figura 1, excepto que también incluye un paso 150 para preparar una muestra de fluido preliminar que contiene el material biológico 118, al que se añade la muestra de fluido preliminar, la formulación 112 de colorante diluida en agua, durante el paso 116 para preparar la muestra 120 de fluido teñida. Como se muestra en la Figura 14, en el paso 150 para preparar una muestra de fluido preliminar, una composición preliminar 152 que contiene el material biológico se diluye con un líquido 154 de dilución de muestra acuosa, para preparar la muestra de fluido preliminar que contiene el material biológico 108 que luego se procesa en el paso 116 para preparar la muestra 120 de fluido teñida. Cuando la muestra 120 de fluido teñida se prepara para incluir disacárido disuelto; parte o la totalidad del disacárido para su inclusión en la muestra 120 de fluido teñida se puede proporcionar en el líquido 154 de dilución de muestra acuosa.

Ahora se hace referencia a la Figura 2, que ilustra un ejemplo de detección de partículas del tamaño de un virus teñidas con múltiples colorantes fluorogénicos, durante citometría de flujo, por ejemplo, durante el procesamiento para someter la muestra 120 de fluido teñida a citometría de flujo en el paso 122 ilustrada en la Figura 1, y analizada anteriormente. La Figura 2 muestra componentes parciales de un citómetro 128 de flujo, que incluye una celda 130 de flujo y un sistema 138 de detección y análisis de luz. Como se muestra en la Figura 2, un flujo de dicha muestra 120 de fluido teñida, a través de la celda 130 de flujo, se somete en la celda 130 de flujo a la radiación 134 de excitación desde una fuente de luz (no mostrada) del citómetro 128 de flujo. Dicha fuente de luz puede ser, por ejemplo, un láser, un LED u otra fuente de luz. Como se ilustra en la Figura 2, la muestra 120 de fluido teñida incluye partículas 124 del tamaño de un virus, y la muestra de fluido teñida se muestra fluyendo a través de una celda 130 de flujo de un citómetro de flujo, en la dirección de la flecha 135 de flujo. En el ejemplo ilustrado en la Figura 2, la muestra 120 de fluido teñida se ha centrado hidrodinámicamente con un fluido envolvente 136, antes de su introducción en la celda 130 de flujo. Como se ilustra en la Figura 2, el fluido envolvente 136 se muestra como un fluido distinto con respecto a la muestra 120 de fluido teñida. Como puede apreciarse, la diferenciación entre dicho fluido envolvente 136 y la muestra 120 de fluido teñida, puede no ser tan clara como se ilustra en la Figura 2. El sistema 138 de detector y análisis de luz en la Figura 2, se ilustra para incluir dos fotodetectores para detectar por separado intervalos de longitud de onda de radiación asociados con las diferentes firmas de emisión fluorescente de dos colorantes fluorogénicos diferentes, como consecuencia de la excitación por la radiación 134 de excitación. La Figura 2 también muestra un primer gráfico 142 de series de tiempo con una salida ilustrativa (C1) de un primer fotodetector que detecta la respuesta de emisión fluorescente de un primer colorante fluorogénico tiñendo una partícula 124 del tamaño de un virus, y un segundo gráfico 144 de series de tiempo con una salida ilustrativa (C2) de un segundo fotodetector que detecta la respuesta de emisión fluorescente de un segundo colorante fluorogénico tiñendo una partícula 124 del tamaño de un virus. Los gráficos 142 y 144 de series de tiempo son gráficos de la tensión proveniente del fotodetector respectivo frente al tiempo, y con los picos de tensión indicados en los tiempos  $t_1$ ,  $t_2$  y  $t_3$ , lo que indica la detección de dicha partícula 124 del tamaño de un virus teñida con un colorante fluorogénico. En este ejemplo, un primer colorante fluorogénico puede ser un colorante fluorogénico para ácido nucleico no específico, y un segundo colorante fluorogénico puede ser un colorante fluorogénico para la tinción de proteínas no específica. El segundo gráfico 144 de series de tiempo se ilustra con tres picos de tensión en los tiempos  $t_1$ ,  $t_2$  y  $t_3$ , indicativos del paso a través de la celda 130 de flujo de tres partículas 124 del tamaño de un virus con el segundo contenido proteico de tinción de colorante fluorogénico de tales partículas 124 del tamaño de un virus. El primer gráfico 142 de series de tiempo se ilustra con un pico de tensión en el tiempo  $t_2$ , indicativo del paso a través de la celda 130 de flujo de una partícula 124 del tamaño de un virus con el primer contenido de colorante fluorogénico con tinción de ácido nucleico de dicha partícula 124 del tamaño de un virus. La coincidencia en el tiempo  $t_2$  de un pico de tensión tanto en el primer gráfico 142 de serie de tiempo como en el segundo gráfico 144 de serie de tiempo, indica el paso a través de la celda 130 de flujo de una partícula 124 del tamaño de un virus que contiene tanto contenido de ácido nucleico como contenido proteico, por ejemplo, tal como puede ser el caso de una partícula de virus intacta, o virión. La aparición de picos de tensión en  $t_1$  y  $t_3$  en el segundo gráfico 144 de series de tiempo sin picos de tensión correspondientes en el primer gráfico 142 de series de tiempo, indica el paso a través de la celda de flujo de partículas 124 del tamaño de un virus, incluyendo el contenido proteico, y no incluyendo el contenido de ácido nucleico, tal como puede ser el caso de una partícula similar a un virus, exosoma o fragmento de partícula, incluyendo contenido proteico, pero no incluyendo material genético. En realizaciones alternativas, el sistema 138 de detector y análisis de luz puede incluir fotodetectores para detectar firmas de emisión fluorescente de más de dos colorantes fluorogénicos diferentes, y/o para detectar una o más tinciones de anticuerpos fluorescentes, indicativas de la presencia de un epítipo particular en una partícula del tamaño de un virus objetivo.

Aunque el citómetro 128 de flujo se ilustra como que incluye una única fuente de luz que proporciona una única radiación 134 de excitación para estimular múltiples respuestas de emisión fluorescente diferentes de diferentes colorantes fluorogénicos, dicho citómetro 128 de flujo puede incluir múltiples fuentes de luz diferentes, cada una de las cuales proporciona una radiación de excitación diferente en un intervalo de longitud de onda diferente, donde las respuestas de emisión fluorescente de diferentes colorantes fluorogénicos y/o tinciones de anticuerpos, se estimulan mediante diferentes intervalos de longitud de onda de radiación de excitación. Además, aunque el procesamiento en la Figura 2 se muestra mediante el uso de una muestra 120 de fluido teñida hidrodinámicamente, dicho fluido teñido 120 puede procesarse, de manera alternativa, a través de un citómetro de flujo en el que las muestras no se enfoquen hidrodinámicamente, aunque se prefieren los sistemas enfocados hidrodinámicamente. En una operación preferida, un caudal de la muestra 120 de fluido teñida enfocada hidrodinámicamente a través de la celda 130 de flujo, puede ser muy bajo, preferiblemente de 6000 nanolitros por minuto o inferior, más preferiblemente de 3000 nanolitros por minuto o inferior, más preferiblemente en un intervalo que tenga un límite inferior de 300 nanolitros por minuto, 600 nanolitros por minuto, u 800 nanolitros por minuto, y un límite superior de 6000 nanolitros por minuto, 3000 nanolitros por minuto, o 2000 nanolitros por minuto, intervalo que es preferiblemente de 600 nanolitros por minuto a 3000 nanolitros por minuto, y es aún más preferiblemente de 600 nanolitros por minuto a 2000 nanolitros por minuto.

Ahora se hace referencia a la Figura 3, que ilustra una realización ilustrativa de un kit 200 que incluye una pluralidad de primeros recipientes sellados en forma de viales sellados 202, conteniendo cada uno una composición en polvo seco con una mezcla en polvo seco de una pluralidad de diferentes colorantes fluorogénicos, teniendo cada uno una firma de emisión fluorescente diferente, y conteniendo cada uno contiene al menos un grupo aromático susceptible a interacciones de apilamiento pi en medios líquidos acuosos. Cada vial sellado 202 puede incluir una cantidad de la composición en polvo seco para preparar una formulación de tinción diluida en agua, suficiente para teñir una serie de muestras de fluidos para procesarse simultáneamente para la evaluación por citometría de flujo. La composición en polvo seco y los colorantes fluorogénicos en la composición en polvo seco, pueden tener cualquiera o cualquier combinación de las características descritas anteriormente. Como se muestra en la Figura 3, la pluralidad de viales sellados 202 dentro del kit 200 son por conveniencia de la fabricación y envasado contenido dentro de una bolsa 204. El kit 200 incluye un segundo recipiente sellado en forma de una primera botella sellada 206 que contiene un primer medio líquido que comprende preferiblemente al menos el 34 por ciento en moles de DMSO, y más preferiblemente una mayoría en moles de DMSO. El primer medio líquido se proporciona en una cantidad suficiente para proporcionar alícuotas del primer medio líquido para usar para preparar lotes de formulación de colorante concentrados, para toda la composición en polvo seco en los viales 202. El primer medio líquido puede tener cualquiera o cualquier combinación de las características descritas anteriormente. El primer medio líquido puede formularse para usar directamente para mezclarse con y disolver los colorantes fluorogénicos de la composición en polvo seco durante el primer procesamiento preparatorio, o formularse para mezclarse con uno o más componentes adicionales (p. ej., tampón acuoso y/u otro líquido disolvente orgánico) para preparar una mezcla de medio líquido para usar como primer medio líquido final para disolver los colorantes fluorogénicos durante el primer procesamiento preparatorio. El kit 200 también incluye un tercer recipiente sellado en forma de una segunda botella sellada 208 que contiene diluyente líquido acuoso, por ejemplo, en forma de solución tampón acuosa, en cantidad suficiente para proporcionar alícuotas del diluyente líquido acuoso para usar para preparar lotes de formulación de colorante diluida en agua, para toda la composición en polvo seco en los viales 202. La solución tampón puede tener cualquiera o cualquier combinación de las características descritas anteriormente. El kit 200 incluye los viales 202 dentro de la bolsa 204, la primera botella 206 y la segunda botella 208, empaquetados todos en un recinto 210 de empaque común, por ejemplo, una caja o bolsa de empaque común. En implementaciones alternativas, el kit 200 puede incluir dentro del recinto 210 de empaque común, uno o más componentes además de los ilustrados en la Figura 3 y expuestos anteriormente. Con referencia continua a la Figura 3, cuando la muestra de fluido teñida a preparar con el kit 200 es para incluir disacárido disuelto, parte o la totalidad de dicho disacárido puede incluirse en el diluyente líquido acuoso en la segunda botella sellada 208 y/o en otro componente reactivo (p. ej., líquido de dilución de muestra acuosa) que pueda incluirse con el kit 200 o proporcionarse por separado del kit 200. Ahora se hace referencia a la Figura 15, que ilustra otra realización ilustrativa de un kit 220. Como se ilustra en la Figura 15, el kit 220 incluye los viales sellados 202, la bolsa 204, la primera botella sellada 206, la segunda botella sellada 208 y el recinto 210 de empaque común, como se ilustra y describe en relación con la Figura 3. Además, el kit 220 incluye un cuarto recipiente sellado en forma de una tercera botella sellada 222 que contiene líquido de dilución de muestra acuosa para preparar una muestra de fluido diluida, por ejemplo, para preparar una serie de diluciones de muestras de fluidos con el material biológico diluido en diferentes factores de dilución para la evaluación por citometría de flujo. Tal líquido de dilución de muestra acuosa puede ser, por ejemplo, una solución tampón acuosa. Cuando se va a usar el kit para preparar muestras de fluido teñidas que incluyen disacárido disuelto, parte o todo el disacárido que se incluirá en las muestras de fluido teñida puede incluirse en el diluyente líquido acuoso en la segunda botella sellada 208 y/o en el líquido de dilución de la muestra acuosa en la tercera botella sellada 222.

En cada una de las realizaciones 200 y 220 de kits ilustrativos ilustradas en las Figuras 3 y 15, respectivamente, cuando el kit respectivo se va a usar para preparar muestras de fluido teñidas que incluyan disacárido disuelto, en una variación del kit el primer medio líquido en la primera botella sellada 206 puede estar libre de DMSO, y puede incluir en su lugar uno u otros componentes líquidos orgánicos alternativos (p. ej., acetoniitrilo).

## Ejemplos

Los kits de reactivos Combo Dye® (Sartorius Stedim Biotech) incluyen consumibles para usar para teñir muestras de fluido con múltiples colorantes fluorogénicos, incluyendo un primer colorante fluorogénico para la tinción de ácido nucleico no específica y un segundo colorante fluorogénico para la tinción de proteínas no específica, para la evaluación por citometría de flujo para cuantificar partículas de virus libres (viriones) en la muestra de fluido. Los componentes de un ejemplo de un kit de reactivos tradicional Combo Dye® incluyen viales con alícuotas de una composición de colorante en polvo seco que incluye una mezcla en polvo seco de un primer colorante fluorogénico de POPO™-3 yoduro (Thermo Fischer Scientific) para la tinción de ácido nucleico, y un segundo colorante fluorogénico de SYPRO™ Red (Thermo Fischer Scientific) para la tinción de proteínas. El kit ilustrativo también incluye un recipiente con acetonitrilo a partir del cual se pueden retirar alícuotas del acetonitrilo y añadir a viales que contienen la composición de colorante en polvo seco, para disolver los colorantes fluorogénicos de la mezcla en polvo seco en el acetonitrilo en un primer paso de preparación de una formulación de colorante acuosa que se usa para teñir muestras de fluido para la evaluación por citometría de flujo. El kit ilustrativo también incluye una solución tampón de una preparación de tinción acuosa usada para añadir a y diluir la solución de acetonitrilo/colorante en los viales para preparar una formulación de colorante acuosa en los viales para usar para teñir una serie de muestras de fluido que contienen material biológico para someterse a evaluación por citometría de flujo para partículas del tamaño de un virus no asociadas. El kit de ejemplo también incluye otros componentes para proporcionar un conjunto completo de consumibles para analizar muestras mediante el uso del citómetro de flujo Virus Counter® 3100 (Sartorius Stedim Biotech), que incluye fluido envolvente, fluido de lavado, tampón de dilución de muestras, fluido de lavado entre muestras, fluido de verificación de limpieza, y estándar de validación de rendimiento. El tampón de dilución de muestra y el tampón de preparación de tinción en el kit ilustrativo es un tampón de fosfato de sodio y el tampón de preparación de tinción en el kit ilustrativo es un tampón de fosfato de sodio similar con Tris-EDTA añadido, estando cada solución tampón en un pH de aproximadamente 7,4.

En los ejemplos siguientes, todas las pruebas de evaluación por citometría de flujo se realizaron mediante el citómetro de flujo Virus Counter® 3100, y los reactivos utilizados para preparar muestras de fluido diluidas para la evaluación por citometría de flujo, para preparar formulaciones de colorante acuosas para teñir las muestras de fluido diluidas, y para el funcionamiento del citómetro de flujo Virus Counter® 3100, fueron los reactivos de dicho kit ilustrativo Combo Dye®, excepto el DMSO, que se utilizó en algunas pruebas en lugar de acetonitrilo en la preparación de formulaciones de colorante acuosas para teñir las muestras antes de la citometría de flujo. Todas las muestras de fluido en los factores de dilución especificados se prepararon como muestras de 100 microlitros, a las que se añadieron 50 microlitros de formulación acuosa de colorante para la tinción, y la muestra teñida con 150 microlitros resultante se sometió a evaluación por citometría de flujo. Los recuentos de partículas de virus se identifican mediante el citómetro de flujo a partir de la detección de picos coincidentes de las firmas de emisión fluorescente, tanto de la tinción de ácido nucleico como de la tinción de proteínas. Los resultados cuantitativos en términos de recuentos de partículas de virus se indican a continuación como valores de concentración de partículas de virus por mililitro (vp/mL) de la muestra preparada antes de añadir la formulación acuosa de colorante, y no con respecto al volumen de la muestra de fluido teñida que incluye la formulación acuosa de colorante añadida. Para cada prueba de serie de dilución (o para cada prueba de dilución de punto único), se prepararon tres muestras de fluido que contenían virus, y se tiñeron con una formulación de colorante acuosa preparada mediante el uso de acetonitrilo o DMSO. También se preparó una muestra de fluido en blanco que incluía la formulación de colorante diluida en agua al volumen de muestra teñida mediante el uso del mismo tampón de dilución de la muestra, pero que no contenía virus. Las tres muestras de fluido teñidas que contenían virus y la muestra en blanco se sometieron a citometría de flujo, y los resultados del recuento de partículas de virus reflejados a continuación son de una media aritmética (promedio) de los resultados de la citometría de flujo de las muestras de fluido que contienen virus, corregidos por el fondo mediante la resta de los recuentos de partículas de fondo obtenidos de los resultados de la citometría de flujo de la muestra en blanco. Los valores para c.v. para cada factor de dilución se calcularon a partir de la desviación estándar de los recuentos de partículas de virus divididos por el resultado de concentración promedio. La preparación de las formulaciones acuosas de colorante y la tinción de las muestras de fluido para la citometría de flujo, se realizó generalmente de la siguiente manera: Se añadieron cinco microlitros de un primer medio líquido (ya sea acetonitrilo o DMSO, excepto en el Ejemplo 6 mediante el uso de una mezcla de DMSO y agua) a un vial que contenía 2,8 microlitros de la composición de colorante en polvo seco con los múltiples colorantes fluorogénicos. A continuación, la mezcla en el vial se agitó con vórtex brevemente para ayudar a la disolución de la mezcla en polvo seco de los colorantes fluorogénicos en el primer medio líquido. A continuación, la mezcla se dejó asentar durante un tiempo de incubación de 5 a 15 minutos, después de lo cual la mezcla se diluyó mediante la adición de 500 microlitros de solución tampón de preparación de tinción, y esa mezcla diluida se agitó con vortex brevemente para preparar la formulación de colorante acuosa utilizada para teñir las muestras de fluido para la evaluación por citometría de flujo. Como se apreciará, cada uno de dichos lotes de formulación de colorante acuosa preparado es suficiente para teñir 10 muestras de fluido de 100 microlitros en volumen para la evaluación por citometría de flujo. Las muestras de fluido se tiñeron generalmente dentro de las 4 horas de preparación de la formulación de colorante acuosa. Después de la tinción, las muestras se dejaron asentar durante un tiempo de aproximadamente 30 minutos, mientras se protegieron de la luz antes de someterse a la citometría de flujo. Excepto por el Ejemplo 1 a continuación, los tiempos de incubación fueron de 5 minutos cuando se usó acetonitrilo como primer medio líquido, y de 10 minutos cuando se usó DMSO como primer medio líquido.

## Ejemplo 1: Precisión de comparación con diferentes tiempos de incubación

Se prepararon una serie de diluciones de muestras de fluido que contenían el baculovirus, con factores de dilución de 10, 100, 1000 y 10.000. Se prepararon formulaciones acuosas de colorante según el procedimiento resumido anteriormente, con el tiempo de incubación para disolver la mezcla de colorante en polvo seco en acetonitrilo, variando de 5 a 15 minutos, antes de la dilución con solución tampón de preparación de tinción. Cada muestra de fluido preparada (100 microlitros) con el baculovirus se tiñó agregando 50 microlitros de la formulación de colorante acuoso, para preparar un primer conjunto de muestras de fluido de baculovirus teñidas para la evaluación por citometría de flujo. Se preparó un segundo conjunto de muestras de baculovirus teñidas mediante el uso de el mismo conjunto de factores de dilución, por el mismo procedimiento que se usó para preparar el primer conjunto de muestras teñidas, excepto el uso de DMSO en lugar de acetonitrilo para disolver inicialmente la mezcla en polvo seco de los colorantes fluorogénicos durante la preparación de la formulación de colorante acuosa, y mediante el uso de un tiempo de incubación de 5 o 10 minutos.

Las muestras de fluido teñidas para cada serie de dilución de cada conjunto de muestras, y las muestras en blanco correspondientes, se sometieron a evaluación por citometría de flujo para la cuantificación de partículas de baculovirus libres en las muestras de fluido teñidas. Los resultados de la citometría de flujo para las pruebas de acetonitrilo se resumen en la Tabla 1, y para las pruebas de DMSO se resumen en la Tabla 2.

Tabla 1

| Pruebas de acetonitrilo                    |                    |                                                                     |                                                                                |                                 |
|--------------------------------------------|--------------------|---------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| Tiempo de incubación de acetonitrilo (min) | Factor de dilución | Concentración de partículas de virus (vp/mL) como valor logarítmico | Concentración de partículas de virus por mililitro (vp/mL) como valor numérico | Coeficiente de variación (c.v.) |
| 5                                          | 10                 | 8,007                                                               | $1,0 \times 10^8$                                                              | 31,25 %                         |
| 5                                          | 100                | 7,638                                                               | $4,3 \times 10^7$                                                              | 32,03 %                         |
| 5                                          | 1.0000             | 6,218                                                               | $1,7 \times 10^6$                                                              | 49,83 %                         |
| 5                                          | 10.0000            | 4,964                                                               | $9,2 \times 10^4$                                                              | 19,53 %                         |
| 10                                         | 10                 | 7,815                                                               | $6,5 \times 10^7$                                                              | 24,95 %                         |
| 10                                         | 100                | 7,433                                                               | $2,7 \times 10^7$                                                              | 21,16 %                         |
| 10                                         | 1.0000             | 5,808                                                               | $6,4 \times 10^5$                                                              | 28,99 %                         |
| 10                                         | 10.0000            | 4,487                                                               | $3,1 \times 10^4$                                                              | 167,15 %                        |
| 15                                         | 10                 | 7,787                                                               | $6,1 \times 10^7$                                                              | 27,15 %                         |
| 15                                         | 100                | 7,236                                                               | $1,7 \times 10^7$                                                              | 20,87 %                         |
| 15                                         | 1.0000             | 5,665                                                               | $4,6 \times 10^5$                                                              | 44,85 %                         |
| 15                                         | 10.0000            | 5,268                                                               | $1,9 \times 10^5$                                                              | 337,33 %                        |

Tabla 2

| Pruebas de DMSO                     |                    |                                                                               |                                                                                          |                                 |
|-------------------------------------|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| Tiempo de incubación con DMSO (min) | Factor de dilución | Concentración corregida de partículas de virus (vp/mL) como valor logarítmico | Concentración corregida de partículas de virus por mililitro (vp/mL) como valor numérico | Coeficiente de variación (c.v.) |
| 5                                   | 10                 | 7,322                                                                         | $2,1 \times 10^7$                                                                        | 23,47 %                         |
| 5                                   | 100                | 7,634                                                                         | $4,3 \times 10^7$                                                                        | 26,76 %                         |
| 5                                   | 1.0000             | 6,487                                                                         | $3,1 \times 10^6$                                                                        | 44,32 %                         |
| 5                                   | 10.0000            | 5,507                                                                         | $3,2 \times 10^5$                                                                        | 47,52 %                         |
| 10                                  | 10                 | 7,428                                                                         | $2,7 \times 10^7$                                                                        | 38,45 %                         |
| 10                                  | 100                | 7,497                                                                         | $2,8 \times 10^7$                                                                        | 1,97 %                          |
| 10                                  | 1.0000             | 6,435                                                                         | $2,7 \times 10^6$                                                                        | 18,47 %                         |
| 10                                  | 10.0000            | 5,626                                                                         | $4,2 \times 10^5$                                                                        | 70,16 %                         |

La incubación prolongada en presencia de acetonitrilo no mejoró de forma reproducible el c.v. de las mediciones tomadas dentro del intervalo lineal de la muestra. Sin embargo, extender la incubación a diez minutos en DMSO de

manera mejoró de manera consistente y notable los c.v. de las mediciones tomadas dentro de ese mismo intervalo de factores de dilución. Por lo tanto, parece que aunque un tiempo de incubación superior a 5 minutos no es beneficioso para el uso de acetonitrilo, es beneficioso para el uso de DMSO, y en todas las pruebas en los siguientes ejemplos se utilizó un tiempo de incubación de 10 minutos para las pruebas mediante el uso de DMSO, y se utilizó un tiempo de incubación de 5 minutos para las pruebas mediante el uso de acetonitrilo.

Ejemplo 2: Comparación de precisión vial a vial dentro de un lote de composición de colorante en polvo seco

Para evaluar el impacto del cambio de disolvente en la precisión vial a vial y los recuentos virales, se utilizaron tres viales de la composición de colorante en polvo seco del mismo lote de polvo fabricado para preparar formulaciones de colorante acuosas para teñir muestras de virus mediante el uso de acetonitrilo, y tres otros viales de la composición de colorante en polvo seco del mismo lote de polvo fabricado para preparar formulaciones de colorante acuosas para teñir muestras de virus mediante el uso de DMSO. Cada vial se utilizó para teñir muestras de fluido de una serie de dilución de la muestra de virus. Se eligió la serie de dilución para cruzar el intervalo dinámico del instrumento de citometría de flujo (de aproximadamente  $5 \times 10^5$  a aproximadamente  $1 \times 10^9$  partículas de virus por mililitro). El límite superior de detección del instrumento se determina mediante la coincidencia de recuentos, así como la agregación de partículas de virus. El límite inferior del instrumento se establece mediante estadística. Generalmente, se espera una precisión mayor en la parte media del intervalo dinámico. Para controlar los errores en el pipeteo, se preparó la serie de dilución como lotes grandes que luego se dividieron en alícuotas para la tinción. Se realizó la serie de pruebas comparativas en muestras de los siguientes virus: baculovirus (Kemp Bio), influenza A/Hong Kong/8/1968 (A/Hong Kong; ViraPur lote L1503), influenza B/Brisbane/60/2008 (BBrisbane; ViraPur lote H1329B), Herpes Simplex Virus-1 (HSV-1; muestra de demostración AGTC), virus Cowbone Ridge (CRV; ATCC VR-1253, lote 214005), y lentivirus (Essen, lote LDA052217).

Los resultados de la citometría de flujo para pruebas comparativas mediante el uso de DMSO frente al acetonitrilo, para preparar la formulación de colorante acuosa para la tinción de muestras, se resumen en la Figura 4 y la Tabla 3 para el baculovirus, en la Figura 5 y la Tabla 4 para la influenza A/Hong Kong/8/1968, en la Figura 6 y la Tabla 5 para la influenza B/Brisbane/60/2008, en la Figura 7 y la Tabla 6 para el Herpes Simplex Virus-1, en la Figura 8 y en la Tabla 7 para el virus Cowbone Ridge, y en la Figura 9 y la Tabla 8 para el lentivirus. Para cada virus probado, la figura correspondiente muestra un gráfico de la concentración de las partículas de virus en la muestra de fluido del análisis de citometría de flujo frente al factor de dilución. Los datos por encima del límite inferior de detección se representan en las Figuras 4-9 con barras de error que representan dos desviaciones estándar. No se observó ninguna diferencia en el título mayor a dos desviaciones estándar en ninguna condición en ninguna muestra. Para cada virus probado, la tabla correspondiente muestra el % de c.v. calculado para la concentración corregida de partículas de virus para las tres pruebas en cada factor de dilución probado. Para el baculovirus, la influenza B/Brisbane/60/2008 y el virus Cowbone Ridge, se observaron valores mejorados de c.v. en todos los factores de dilución en la serie de dilución, mediante el uso de DMSO con respecto al uso de acetonitrilo. En particular, se observaron valores mejorados de c.v. mediante el uso de DMSO en la parte media de la serie de dilución para todos los virus probados, donde el Virus Counter® 3100 tiende a producir los datos más fiables. Los resultados indican que el uso de DMSO para disolver inicialmente la composición de colorante en polvo seco proporciona, inesperada y sorprendentemente, un rendimiento superior en general para todos los diferentes virus probados.

Tabla 3

| Pruebas de baculovirus           |      |      |      |
|----------------------------------|------|------|------|
| Factor de dilución               | 10   | 100  | 1000 |
| Pruebas de acetonitrilo c.v. (%) | 53,3 | 63,5 | 54,1 |
| Pruebas de DMSO c.v. (%)         | 25,3 | 12,1 | 43,3 |

Tabla 4

| Pruebas de influenza A/Hong Kong/8/1968 |     |      |      |
|-----------------------------------------|-----|------|------|
| Factor de dilución                      | 10  | 100  | 1000 |
| Pruebas de acetonitrilo c.v. (%)        | 1,9 | 56,3 | 16,9 |
| Pruebas de DMSO c.v. (%)                | 6,4 | 27,1 | 27,6 |

Tabla 5

| Pruebas de influenza B/Brisbane/60/2008 |      |      |      |
|-----------------------------------------|------|------|------|
| Factor de dilución                      | 10   | 100  | 1000 |
| Pruebas de acetonitrilo c.v. (%)        | 10,2 | 17,6 | 45,8 |

| Pruebas de influenza B/Brisbane/60/2008 |     |      |      |
|-----------------------------------------|-----|------|------|
| Factor de dilución                      | 10  | 100  | 1000 |
| Pruebas de DMSO c.v. (%)                | 3,5 | 12,3 | 23,0 |

Tabla 6

| Pruebas de Herpes Simplex Virus-1 |      |      |      |
|-----------------------------------|------|------|------|
| Factor de dilución                | 10   | 100  | 1000 |
| Pruebas de acetonitrilo c.v. (%)  | 18,6 | 69,6 | 69,6 |
| Pruebas de DMSO c.v. (%)          | 72,7 | 20,3 | 50,0 |

5 Tabla 7

| Pruebas de virus Cowbone Ridge   |     |      |        |
|----------------------------------|-----|------|--------|
| Factor de dilución               | 100 | 1000 | 10.000 |
| Pruebas de acetonitrilo c.v. (%) | 5,4 | 27,1 | 24,1   |
| Pruebas de DMSO c.v. (%)         | 4,9 | 6,6  | 6,1    |

Tabla 8

| Pruebas de lentivirus            |      |      |       |
|----------------------------------|------|------|-------|
| Factor de dilución               | 10   | 100  | 1000  |
| Pruebas de acetonitrilo c.v. (%) | 24,5 | 65,0 | 32,6  |
| Pruebas de DMSO c.v. (%)         | 19,4 | 7,5  | 106,0 |

10 Para evaluar adicionalmente el rendimiento vial a vial de la composición de colorante en polvo seco mediante el uso de DMSO frente al acetonitrilo, se compararon los valores de c.v. para los recuentos de concentración media obtenidos para muestras diluidas en el intervalo de  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^7$  partículas de virus por mililitro de intervalo. Una alta precisión en los resultados es particularmente deseable dentro de dicho intervalo de concentración en la parte media del intervalo dinámico del citómetro de flujo Virus Counter® 3100. Como se ve en las Figuras 4-9, dichos datos se

15 obtuvieron para el baculovirus en un factor de dilución de 100, para la Influenza B/Brisbane/60/2008 en un factor de dilución de 100, para el virus Cowbone Ridge en un factor de dilución de 10.000, y para el lentivirus en un factor de dilución de 100. En los casos de la influenza A/Hong Kong/8/1968 y la Influenza A/Hong Kong/8/1968, esta región se perdió en la serie de dilución. En todos esos casos, los valores de c.v. para pruebas mediante el uso de DMSO son

20 todos inferiores al 20 %, lo que es notable e importante en términos de rendimiento de precisión. Estos resultados para el DMSO se resumen en la Tabla 9. Además, es notable que los valores de c.v. para todas estas pruebas resumidas en la Tabla 9, son significativamente inferiores a los valores correspondientes de c.v. para las pruebas correspondientes mediante el uso de acetonitrilo en esos factores de dilución para esos virus.

25 Tabla 9

| Pruebas con la concentración media de partículas de $1 \times 10^6$ a $1 \times 10^7$ vp/mL |                    | Resultados para pruebas de DMSO                                                        |        | Pruebas de acetonitrilo correspondientes |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|--------|------------------------------------------|
| Virus                                                                                       | Factor de dilución | Recuento medio de concentración de partículas de virus mediante el uso de DMSO (vp/mL) | % c.v. | % c.v.                                   |
| Baculovirus                                                                                 | 100                | $4,76 \times 10^6$                                                                     | 12,1   | 63,5                                     |
| BBrisbane                                                                                   | 100                | $2,89 \times 10^6$                                                                     | 12,3   | 17,6                                     |
| CRV                                                                                         | 10.000             | $1,71 \times 10^6$                                                                     | 6,1    | 24,1                                     |
| Lentivirus                                                                                  | 100                | $4,66 \times 10^6$                                                                     | 7,5    | 65,0                                     |

## Ejemplo 3: Comparación de precisión vial a vial entre diferentes lotes de composición de colorante en polvo seco

La prueba según el procedimiento del Ejemplo 2, que compara el rendimiento de citometría de flujo mediante el uso de DMSO frente al acetonitrilo en la preparación de formulaciones de colorante acuosas para la tinción de muestras, se realizó mediante el uso de tres lotes diferentes de la composición de colorante en polvo seco, que se fabricaron en diferentes lotes en diferentes fechas. Los diferentes lotes de composición de colorante en polvo seco se identifican a continuación como Lote n.º 1, Lote n.º 2 y Lote n.º 3. Las pruebas se realizaron en muestras de baculovirus e influenza B/Brisbane/60/2008. La serie de dilución incluyó factores de dilución de 10, 100 y 1000. Los resultados por lote de polvo se resumen para pruebas de baculovirus en la Tabla 10, y para las pruebas de virus influenza B/Brisbane/60/2008 en la Tabla 11. No se observaron cambios estadísticamente significativos en los recuentos de concentración de partículas de virus entre los diferentes lotes de composición de colorante en polvo seco. Notablemente, como se ve en las Tablas 10 y 11, para cada uno de los virus probados, las pruebas que usan DMSO en la preparación de las formulaciones acuosas de colorante mostraron mayormente perfiles de c.v. mejorados por todos los diferentes lotes de composición de colorante en polvo seco con respecto a las pruebas mediante el uso de acetonitrilo. Los c.v. generalmente se mantuvieron equivalentes o mejoraron cuando se utilizó DMSO con respecto al acetonitrilo, y los recuentos de partículas de virus no mostraron un cambio estadísticamente significativo.

Tabla 10

| Pruebas de baculovirus          |            |      |      |            |      |      |            |      |      |
|---------------------------------|------------|------|------|------------|------|------|------------|------|------|
| Lote de colorante en polvo seco | Lote n.º 1 |      |      | Lote n.º 2 |      |      | Lote n.º 3 |      |      |
| Factor de dilución              | 10         | 100  | 1000 | 10         | 100  | 1000 | 10         | 100  | 1000 |
| Acetonitrilo % c.v.             | 53,3       | 63,5 | 54,1 | 11         | 36,2 | 31,2 | 77,5       | 103  | 195  |
| DMSO % c.v.                     | 25,3       | 12,1 | 43,3 | 12,4       | 8,9  | 35,6 | 19,6       | 35,5 | 16,2 |

Tabla 11

| Pruebas de influenza B/Brisbane/60/2008 |            |      |      |            |      |      |            |     |      |
|-----------------------------------------|------------|------|------|------------|------|------|------------|-----|------|
| Lote de colorante en polvo seco         | Lote n.º 1 |      |      | Lote n.º 2 |      |      | Lote n.º 3 |     |      |
| Factor de dilución                      | 10         | 100  | 1000 | 10         | 100  | 1000 | 10         | 100 | 1000 |
| Acetonitrilo % c.v.                     | 58,8       | 18,8 | 85,2 | 10,2       | 17,6 | 45,8 | 23,9       | 9,3 | 24,2 |
| DMSO % c.v.                             | 3,7        | 13   | 14,4 | 3,5        | 12,3 | 23   | 15,5       | 9,2 | 29,5 |

Para resumir los resultados del Ejemplo 2 y del Ejemplo 3, se evaluó la precisión vial a vial de la citometría de flujo mediante el uso de DMSO frente a acetonitrilo para preparar formulaciones de colorante acuosas mediante el uso de seis especies virales diferentes y tres lotes de la composición de colorante en polvo seco. No se observó ningún cambio estadísticamente significativo en los recuentos de partículas de virus, y o bien una precisión equivalente o mejorada en regiones del intervalo dinámico del instrumento, donde las partículas de virus se pueden cuantificar de manera más fiable, se observaron mediante el uso de DMSO.

## Ejemplo 4: Comparación de la precisión muestra a muestra

Las diluciones de un solo punto de las muestras de baculovirus e influenza B/Brisbane/60/2008 se realizaron en un factor de dilución de 100, y se tiñeron con formulaciones acuosas de colorante preparadas mediante el uso de DMSO o acetonitrilo para disolver inicialmente la composición de colorante en polvo seco. Las muestras de dilución para cada disolvente para cada virus se tiñeron mediante el uso de polvo de un solo vial de la composición de colorante en polvo seco. Los resultados de citometría de flujo para las muestras teñidas se resumen en la Tabla 12. Como se muestra en la Tabla 12, para las muestras tanto de baculovirus como de influenza B/Brisbane/60/2008, se encontró que el c.v. muestra a muestra era menor para las muestras teñidas con formulaciones de colorante acuoso preparadas mediante el uso de DMSO. Como se puede apreciar, debido al diseño de la prueba, no es posible comentar si las diferencias observadas en el título (recuentos de concentración) son resultado del método de preparación acuosa de colorante o de la variabilidad entre los viales de composición de colorante en polvo seco utilizados para las pruebas de los virus de baculovirus e influenza B/Brisbane/60/2008, respectivamente.

Tabla 12

|              | Baculovirus                                |        | Influenza B/Brisbane/60/2008               |        |
|--------------|--------------------------------------------|--------|--------------------------------------------|--------|
|              | Concentración media $\pm 1 \sigma$ (vp/mL) | % c.v. | Concentración media $\pm 1 \sigma$ (vp/mL) | % c.v. |
| Acetonitrilo | $6,93 \times 10^5 \pm 7,60 \times 10^4$    | 11,0   | $1,29 \times 10^6 \pm 1,26 \times 10^5$    | 9,3    |
| DMSO         | $1,99 \times 10^6 \pm 6,00 \times 10^4$    | 3,0    | $9,77 \times 10^5 \pm 5,42 \times 10^4$    | 5,5    |

## Ejemplo 5: Comparación de precisión entre diferentes instrumentos y personal

Las pruebas de dilución única, como se describe en el Ejemplo 4, se realizaron en un solo punto de dilución para muestras de lentivirus (con un factor de dilución de 100) y virus Cowbone Ridge (con un factor de dilución de 10.000) en cuatro instrumentos de citómetro de flujo Virus Counter® 3100 diferentes ubicados en la misma instalación. Para cada prueba de virus para cada primer medio líquido (DMSO y acetonitrilo), todas las muestras se tiñeron mediante el uso de una formulación acuosa de colorante preparada a partir de un solo vial de composición de colorante en polvo seco. Cada instrumento se asignó a un operador diferente, y cada operador llevó a cabo el experimento independientemente según el mismo procedimiento. Uno de los instrumentos produjo consistentemente resultados aproximadamente diez veces por debajo de los otros (instrumento etiquetado 3062 en las tablas de datos). Esto podría haberse causado o por un mal lote de composición de colorante en polvo seco o por un instrumento que tenga rendimiento deficiente. Sin embargo, la investigación reveló que el lote utilizado para la prueba realizada en el instrumento 3062 se había utilizado previamente para otros experimentos sin tal caída anómala de diez veces en los recuentos. Por lo tanto, se concluyó que el instrumento 3062 probablemente había experimentado o un problema de óptica o fluídico que le hizo subestimar las muestras de recuento en aproximadamente un orden de magnitud. Los resultados se resumen en la Tabla 13 para el lentivirus, y en la Tabla 14 para el virus Cowbone Ridge, incluyendo los resultados para el instrumento 3062. En términos de precisión, en todos los casos, menos en uno, los valores c.v. para muestras de ambos virus teñidos con formulaciones acuosas de colorante preparadas mediante el uso de DMSO fueron efectivamente equivalentes o inferiores a aquellas muestras teñidas con formulaciones acuosas de colorante preparadas mediante el uso de acetonitrilo. La única excepción se observó en los datos del virus Cowbone Ridge tomados en el instrumento 3056, pero incluso para esa anomalía, el c.v. mediante el uso de DMSO fue razonablemente bajo (19,9 %). Nuevamente, debido a cómo se diseñaron las pruebas, no es posible comentar si las diferencias observadas en los recuentos de concentración entre las diferentes pruebas reflejadas son el resultado del método de preparación de la formulación acuosa de colorante o de la variabilidad entre diferentes viales de la composición de colorante en polvo seco usada en las diferentes pruebas.

Tabla 13

| Lentivirus                        |                                            |        |                                            |        |
|-----------------------------------|--------------------------------------------|--------|--------------------------------------------|--------|
|                                   | Pruebas de acetonitrilo                    |        | Pruebas de DMSO                            |        |
| Instrumento de citómetro de flujo | Concentración media $\pm 1 \sigma$ (vp/mL) | % c.v. | Concentración media $\pm 1 \sigma$ (vp/mL) | % c.v. |
| 3026                              | $6,95 \times 10^8 \pm 7,38 \times 10^7$    | 10,6   | $5,37 \times 10^8 \pm 4,13 \times 10^7$    | 7,7    |
| 3056                              | $1,1 \times 10^9 \pm 1,50 \times 10^8$     | 13,2   | $5,5 \times 10^8 \pm 6,90 \times 10^7$     | 12,6   |
| 3060                              | $3,46 \times 10^8 \pm 1,76 \times 10^7$    | 5,1    | $5,9 \times 10^8 \pm 3,52 \times 10^7$     | 6,0    |
| 3062                              | $9,29 \times 10^7 \pm 5,23 \times 10^6$    | 5,6    | $7,6 \times 10^7 \pm 1,60 \times 10^6$     | 2,1    |

Tabla 14

| Virus Cowbone Ridge               |                                            |        |                                               |        |
|-----------------------------------|--------------------------------------------|--------|-----------------------------------------------|--------|
|                                   | Pruebas de acetonitrilo                    |        | Pruebas de DMSO                               |        |
| Instrumento de citómetro de flujo | Concentración media $\pm 1 \sigma$ (vp/mL) | % c.v. | Concentración media $\pm 1 \sigma$ (vp/mL)    | % c.v. |
| 3026                              | $2,09 \times 10^{10} \pm 5,36 \times 10^9$ | 25,7   | $1,7 \times 10^{10} \pm 3,54 \times 10^9$     | 20,8   |
| 3056                              | $3,04 \times 10^{10} \pm 3,79 \times 10^9$ | 12,5   | $2,28 \times 10^{10} \pm 4,52 \times 10^9$    | 19,9   |
| 3060                              | $2,77 \times 10^{10} \pm 6,76 \times 10^9$ | 24,4   | $2,16 \times 10^{10} \pm 4,24 \times 10^{10}$ | 19,6   |
| 3062                              | $3,24 \times 10^9 \pm 2,96 \times 10^8$    | 9,1    | $4,36 \times 10^9 \pm 8,88 \times 10^8$       | 10,3   |

## Ejemplo 6: Estabilidad del reactivo DMSO

El DMSO es altamente higroscópico y es susceptible a la absorción de humedad de la atmósfera cuando se expone al entorno ambiental, ya sea durante una operación de tinción o cuando se abra entre usos un recipiente de reactivo con DMSO. Se realizaron pruebas para evaluar los posibles impactos de la absorción de agua en el reactivo de DMSO en la preparación de tinción, y el rendimiento de citometría de flujo y la precisión. En las pruebas, se adicionaron viales nuevos de DMSO anhidro a los que se añadió agua para proporcionar concentraciones de agua del 5, 10, 20, 25 y 33 % v/v (volumen de agua añadida con respecto al volumen total de la mezcla de agua/DMSO). A continuación, se evaluó la precisión muestra a muestra de la citometría de flujo en muestras del virus influenza B/Brisbane/60/2008 teñidas con formulaciones de colorante acuosas preparadas a partir de la composición de colorante en polvo seco con el uso de las diferentes muestras de DMSO alteradas como primer medio líquido para el primer procesamiento preparatorio para disolver la composición de colorante en polvo seco antes de la dilución con tampón para formar la

formulación de colorante acuosa final utilizada para teñir las muestras de fluido que contienen virus. Los resultados de la citometría de flujo para las muestras teñidas se resumen en la Tabla 15. Como se ve en la Tabla 15, los valores de c.v. permanecieron al 20 % o menos para todas las adiciones de agua probadas, excepto por la prueba con el contenido de agua al 33 % en peso. La Tabla 15 también resume el contenido de DMSO en cada medio líquido probado en % DMSO en moles.

Tabla 15

| % de agua (v/v) | % de contenido de DMSO en moles | Concentración media $\pm 1 \sigma$ (vp/mL) | % c.v. |
|-----------------|---------------------------------|--------------------------------------------|--------|
| 0               | 100                             | $9,56 \times 10^6 \pm 1,92 \times 10^6$    | 20     |
| 5               | 83                              | $1,01 \times 10^7 \pm 8,21 \times 10^5$    | 8      |
| 10              | 70                              | $9,33 \times 10^6 \pm 1,37 \times 10^6$    | 15     |
| 20              | 50                              | $9,87 \times 10^6 \pm 1,15 \times 10^6$    | 12     |
| 25              | 43                              | $1,14 \times 10^7 \pm 9,86 \times 10^5$    | 9      |
| 33              | 34                              | $6,20 \times 10^6 \pm 1,48 \times 10^6$    | 24     |

Para evaluar el efecto de reabrir los viales, se realizaron pruebas en las que las muestras de baculovirus e influenza B/Brisbane/60/2008 se tiñeron mediante el uso de formulaciones acuosas de colorante preparadas mediante el uso de DMSO retirado de un vial después de cada cinco aberturas sucesivas del vial en la preparación de formulaciones de colorante acuosas a partir de la composición de colorante en polvo seco. Antes de la primera abertura, el vial contenía DMSO anhidro. Las pruebas se realizaron en tres muestras con el mismo factor de dilución para cada virus, y con una muestra en blanco para la corrección de la concentración. Los resultados de la citometría de flujo en términos de concentraciones de partículas de virus medidas después de cada abertura secuencial del vial de DMSO se resumen en la Figura 10 para el baculovirus, y en la Figura 11 para la influenza B/Brisbane/60/2008, que muestran gráficos de la concentración de partículas de virus para las muestras de fluido teñidas mediante el uso de DMSO retirado del vial con cada abertura sucesiva del vial. Todas las muestras estaban al mismo factor de dilución (100), y no se observó un cambio estadísticamente significativo en los recuentos de partículas de virus para las diferentes aberturas sucesivas del vial, como se ve en las Figuras 10 y 11. Cabe observar que estos experimentos se realizaron en Arvada, Colorado, EE. UU., donde la humedad relativa es a menudo muy baja, y puede no ser indicativo de las condiciones en regiones más húmedas.

Para evaluar adicionalmente los efectos de la apertura repetida de recipientes de DMSO en entornos más húmedos, se realizaron pruebas adicionales en las que dos viales que contenían inicialmente 1 mL de DMSO anhidro se colocaron en una cámara de humedad que consistía en dos toallas de papel húmedas en una bolsa de plástico con cierre hermético de cuatro pulgadas por seis pulgadas. Un vial se dejó sellado y el otro se volvió a abrir múltiples veces durante el transcurso del estudio. Ambos viales se pesaron en una balanza analítica Mettler AE240, primero antes de colocarlos en la cámara de humedad, y luego a intervalos de 1, 2, 4 y 24 horas. En cada intervalo de tiempo, se extrajeron 5  $\mu$ L de DMSO del vial abierto, y se utilizaron para disolver la composición de colorante en polvo seco y para preparar una formulación de colorante acuosa para teñir muestras de virus. Para tener en cuenta esta pérdida de volumen, las mediciones de peso se realizaron de cada vial sin sellado tanto antes como después de la extracción de los 5  $\mu$ L de volumen. La masa previa a la extracción en el momento de cada retirada de DMSO se comparó con la masa posterior a la extracción del punto de tiempo anterior. La masa de los viales sellados y los abiertos jamás cambió en más del 1 %, como se resume en la Figura 12. Se observó que las etiquetas en los viales de DMSO se saturaron con agua durante el transcurso del estudio, aunque durante el intervalo de dos a cuatro horas la etiqueta en el vial sellado se secó. Esto se debió a cómo reposaba el vial en la cámara de humedad durante el intervalo, y se observó en la pérdida de masa a la que el vial se sometió durante ese tiempo. Al volver a la cámara de humedad, el vial se colocó en una posición donde la etiqueta fue capaz de volver a saturarse y, por lo tanto, la masa del vial aumentó de nuevo (como se ve en la Figura 12). Para evaluar el rendimiento de la tinción, se utilizaron formulaciones acuosas de colorante preparadas mediante el uso de cada muestra de DMSO retirada, para teñir muestras de baculovirus en cada punto de tiempo, y los resultados del análisis de citometría de flujo de las muestras teñidas se resumen en la Figura 13, que muestra un gráfico del recuento de concentración de partículas de virus para muestras teñidas con formulación de colorante acuoso preparada mediante el uso de DMSO para cada punto de tiempo de exposición a la cámara de humedad. Todas las muestras se diluyeron por el mismo factor de dilución (100). No se observaron cambios estadísticamente significativos en los recuentos de partículas de virus. A partir de estos resultados, las DMSO anhidras según se envasaron en viales para kits de reactivo de tinción parecen suficientemente estables para el almacenamiento y una apertura repetida, y para usar en entornos húmedos.

#### Ejemplo 7: Estabilidad de la formulación de tinción diluida en agua

Se preparan tres formulaciones de colorante concentradas a un volumen total de 5 microlitros en DMSO, una que contiene solo tinción POPO™-3 yoduro (Formulación 1 de colorante concentrada), una que contiene solo tinción SYPRO™ Red (Formulación 2 de colorante concentrada), y la tercera que contiene tanto tinción POPO™-3 yoduro

como tinción SYPRO™ Red (Formulación 3 de colorante concentrada). Cada formulación de colorante concentrada contenía una cantidad de cada tinción respectiva, comparable a la cantidad de la tinción contenida en una composición de colorante en polvo seco de 2,8 microlitros de un colorante combinado de un vial del kit de reactivos típico Combo Dye®. Las formulaciones de colorante concentradas con solo un único colorante fluorogénico se prepararon mediante dilución de la formulación líquida del fabricante con DMSO hasta un volumen total de 5 microlitros, y la formulación de colorante concentrada que contenía colorantes fluorogénicos se prepara a partir de una composición de colorante en polvo seco mediante reconstitución en 5 microlitros de DMSO. Una primera parte de cada formulación de colorante concentrada se diluye entonces 500:1 v/v con solución tampón de preparación acuosa de tinción regular (sin DMSO añadido), para preparar una formulación de colorante diluida en agua, y una segunda parte de cada formulación de colorante concentrada se conserva en un vial sellado.

Para probar la estabilidad de las formulaciones de colorante diluidas en agua, cada formulación de colorante diluida en agua se sometió a espectroscopía de absorción inmediatamente después de la preparación (tiempo cero), y en tiempos de 20 minutos, 60 minutos y 240 minutos después de la preparación para la evaluación de la longitud de onda espectral de la absorbancia máxima y el valor de absorbancia máxima. A los 240 minutos, se usó la segunda parte conservada de cada formulación de colorante concentrada para preparar en ese momento una formulación nueva de colorante diluida en agua, y cada formulación de colorante diluida recién preparada también se sometió a evaluación por espectroscopía de absorción. Los resultados se resumen en la Tabla 16, que resume la longitud de onda de absorbancia máxima, y en la Tabla 17, que resume el valor de absorbancia máximo para la absorción de las evaluaciones de espectroscopía. Como se ve en las Tablas 16 y 17, después de la dilución en agua, las mezclas de colorante mostraron un cambio en la longitud de onda de la absorbancia máxima hacia la parte roja del espectro (longitud de onda más larga) y con una magnitud reducida de la absorbancia máxima, y estos efectos son mucho más pronunciados en las mezclas de colorante que contienen SYPRO™ Red, lo que indica un problema particular con ese colorante, que se cree que está asociado con su alto nivel de hidrofobicidad. Los resultados para las formulaciones de colorante diluidas en agua recién preparadas después de la formulación de colorante concentrada asentada durante 240 minutos, muestran resultados generalmente más comparables a los probados en el tiempo cero en la serie de tiempo, lo que sugiere que los desplazamientos espectrales son atribuidos principalmente a la exposición a la solución tampón acuosa utilizada para preparar las formulaciones de colorante diluidas en agua.

Tabla 16

| Formulación de colorante concentrada | Longitud de onda de absorbancia máxima (nm)                              |            |            |             |                                        |
|--------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|------------|------------|-------------|----------------------------------------|
|                                      | Formulaciones de colorante diluidas en tiempos después de la preparación |            |            |             | Formulación nueva de colorante diluida |
|                                      | 0 minutos                                                                | 20 minutos | 60 minutos | 240 minutos |                                        |
| 1                                    | 517                                                                      | 524        | 530        | 528         | 518                                    |
| 2                                    | 487                                                                      | 514        | 530        | 540         | 471                                    |
| 3                                    | 514                                                                      | 534        | 543        | 540         | 511                                    |

Tabla 17

| Formulación de colorante concentrada | Valor máximo de absorbancia (unidades de absorbancia)                    |            |            |             |                                        |
|--------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|------------|------------|-------------|----------------------------------------|
|                                      | Formulaciones de colorante diluidas en tiempos después de la preparación |            |            |             | Formulación nueva de colorante diluida |
|                                      | 0 minutos                                                                | 20 minutos | 60 minutos | 240 minutos |                                        |
| 1                                    | 069                                                                      | 063        | 0,037      | 0,044       | 0,107                                  |
| 2                                    | 372                                                                      | 274        | 0,205      | 0,1         | 0,352                                  |
| 3                                    | 496                                                                      | 296        | 0,205      | 0,202       | 0,507                                  |

Se realizan pruebas adicionales similares a las anteriores en formulaciones de colorante diluidas preparadas a partir de una formulación de colorante concentrada correspondiente a la Formulación 3 de colorante, que contiene tanto la tinción POPO™-3 yoduro como la tinción SYPRO™ Red, excepto que en algunas de las pruebas las formulaciones de colorante diluidas en agua se preparan mediante el uso de una solución acuosa de tampón de tinción modificada preparada mediante la adición de una cantidad de DMSO a la solución de tampón de tinción acuosa regular, para preparar una serie de composiciones acuosas de solución de tampón de tinción sin nada de DMSO (solución tampón regular), con el 15 % en volumen de DMSO, con el 20 % en volumen de DMSO, con el 30 % en volumen de DMSO, y con el 50 % en volumen de DMSO. Cada formulación de colorante diluida en agua se somete a una evaluación por espectroscopía de absorbancia en el momento en que la preparación se completa, y a los 60 y 120 minutos después de la preparación, para determinar la longitud de onda de absorbancia máxima y el valor de absorbancia máxima, y los resultados se resumen en la Tabla 18, que resume la longitud de onda de absorbancia máxima, y en la Tabla 19, resume el valor de absorbancia máximo para la absorción de las evaluaciones de espectroscopía. Como se ve en las

Tablas 18 y 19, los cambios identificados previamente en la longitud de onda de absorbancia máxima a una longitud de onda más larga a lo largo del tiempo, esencialmente se eliminaron para todas las pruebas, incluyendo DMSO en la solución tampón de tinción acuosa utilizada para preparar las formulaciones de colorante diluidas en agua. La disminución dependiente del tiempo en el valor de absorbancia máxima es menor para todas las pruebas que utilizan DMSO, siendo la disminución dependiente del tiempo esencialmente retirada para las pruebas en las que la solución tampón de tinción acuosa se prepara con el 20 % o más de DMSO.

Tabla 18

| % de volumen de DMSO en el tampón de tinción | Longitud de onda de absorbancia máxima (nm)                              |            |             |
|----------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|------------|-------------|
|                                              | Formulaciones de colorante diluidas en tiempos después de la preparación |            |             |
|                                              | 0 minutos                                                                | 60 minutos | 120 minutos |
| 0                                            | 511                                                                      | 526        | 537         |
| 15                                           | 553                                                                      | 553        | 553         |
| 20                                           | 553                                                                      | 553        | 553         |
| 30                                           | 548                                                                      | 548        | 548         |
| 50                                           | 554                                                                      | 554        | 554         |

Tabla 19

| % de volumen de DMSO en el tampón de tinción | Valor máximo de absorbancia (nm)                                         |            |             |
|----------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|------------|-------------|
|                                              | Formulaciones de colorante diluidas en tiempos después de la preparación |            |             |
|                                              | 0 minutos                                                                | 60 minutos | 120 minutos |
| 0 %                                          | 0,467                                                                    | 0,265      | 0,179       |
| 15 %                                         | 0,521                                                                    | 0,421      | 0,403       |
| 20 %                                         | 0,583                                                                    | 0,556      | 0,584       |
| 30 %                                         | 0,671                                                                    | 0,71       | 0,704       |
| 50 %                                         | 0,807                                                                    | 0,727      | 0,801       |

## Ejemplo 8: Recuentos de partículas en blanco

Se prepararon formulaciones de colorante concentradas tanto con tinción POPO™-3 yoduro como con tinción SYPRO™ Red, en 5 microlitros de DMSO a partir de 2,8 microlitros de composición de colorante en polvo seco, y se diluyó entonces 500:1 en volumen con tampón de preparación acuosa de tinción regular (sin DMSO añadido), para preparar una formulación de colorante diluida en agua, con ambos colorantes fluorogénicos. A continuación, se prepararon tres muestras de fluido en blanco replicadas que no contenían partículas para su evaluación, añadiendo 50 microlitros de la formulación de colorante diluida en agua a 100 microlitros de tampón de dilución de muestra regular, para preparar una muestra de fluido en blanco de 150 microlitros de volumen. Las muestras de fluido en blanco se sometieron a evaluación por citometría de flujo, y los recuentos de partículas se evaluaron por separado en el canal 1 de detección (detectar la emisión de firma de la tinción de POPO™-3 yoduro) y en el canal 2 de detección (detectar la firma de emisión de tinción de SYPRO™ Red) del citómetro de flujo Virus Counter® 3100, para determinar un recuento de partículas en blanco de fondo por separado para cada colorante fluorogénico. Los recuentos promedio de partículas en blanco en el canal 1 de detección (tinción de POPO™-3 yoduro) fueron relativamente bajos, del orden de 10<sup>5</sup> recuentos de partículas en blanco por mililitro, mientras que los recuentos de partículas en blanco promedio en el canal 2 de detección (tinción de SYPRO™ Red) fueron del orden de 10<sup>7</sup> recuentos de partículas en blanco por mililitro.

Se realizaron pruebas adicionales en las que dicha formulación de colorante concentrada con ambos colorantes fluorogénicos se diluye con tampón de preparación acuosa de tinción modificado, para preparar formulaciones de colorante diluidas en agua. El tampón de preparación acuosa modificado de preparación de tinción se prepara con la misma composición que el tampón de preparación acuosa de tinción regular, excepto que también incluye el 15 % p/v de azúcar disuelta, que cuando se diluye a una relación de dilución de volumen de 1:2 con tampón de dilución de muestra para preparar la muestra de fluido en blanco, da como resultado que la muestra de fluido en blanco contiene el 5 % p/v de azúcar disuelta, según se alimenta al citómetro de flujo. Los azúcares probados incluyen un monosacárido (galactosa), disacáridos (sacarosa, lactosa y trehalosa), y trisacáridos (maltotriosa y rafinosa). Se descubrió que la galactosa monosacárido aumentaba perjudicialmente los recuentos en blanco en el canal 1 de detección. Las trisacáridos maltotriosa y rafinosa no mejoraron el rendimiento del recuento de partículas en blanco, y

con que la maltotriosa aumentaba los recuentos en blanco en el canal 2 de detección. Todos los disacáridos sacarosa, lactosa y trehalosa probados redujeron significativamente los recuentos de partículas en blanco en el canal 2 de detección, presentando la trehalosa la mayor reducción.

## REIVINDICACIONES

1. Una composición de tinción fluorogénica para la tinción fluorescente de partículas del tamaño de un virus no asociadas, con múltiples colorantes fluorogénicos para la evaluación por citometría de flujo para las partículas del tamaño de un virus no asociadas teñidas en una muestra de fluido, comprendiendo la composición de tinción fluorogénica:
  - una pluralidad de diferentes colorantes fluorogénicos que tienen cada uno una firma de emisión fluorescente diferente y cada una contiene al menos un grupo aromático susceptible a apilamiento  $\pi$ , incluyendo la pluralidad de colorantes fluorogénicos diferentes al menos un primer colorante fluorogénico con una primera firma de emisión fluorescente, y un segundo colorante fluorogénico con una segunda firma de emisión fluorescente que es diferente de la primera firma de emisión fluorescente; y un medio líquido acuoso en el que se disuelve la pluralidad de diferentes colorantes fluorogénicos, comprendiendo el medio líquido acuoso un disacárido disuelto en el medio líquido acuoso.
2. La composición de tinción fluorogénica de la reivindicación 1, que comprende el disacárido en una concentración de al menos el 1 por ciento en peso, y no superior al 45 por ciento en peso.
3. La composición de tinción fluorogénica de una cualquiera de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el disacárido comprende trehalosa.
4. La composición de tinción fluorogénica de una cualquiera de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el disacárido comprende uno o más de un miembro seleccionado del grupo que consiste en trehalosa, sacarosa, lactosa, lactulosa, melibiosa, melibilosa, celobiosa, nigerosa, isomaltosa, isomaltulosa, maltulosa, rnuosa,  $\beta$ -laminaribiosa, y maltosa.
5. La composición de tinción fluorogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el medio líquido acuoso comprende óxido de sulfuro de dimetilo (DMSO).
6. La composición de tinción fluorogénica de la reivindicación 5, en donde el medio líquido acuoso comprende el DMSO a una concentración de al menos el 1 por ciento en peso.
7. La composición de tinción fluorogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el primer colorante fluorogénico es para la tinción de ácido nucleico no específica, y el segundo colorante fluorogénico es para la tinción de proteínas no específica.
8. La composición de tinción fluorogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde cada uno del primer colorante fluorogénico y el segundo colorante fluorogénico es un colorante de cianina.
9. Un método para la evaluación por citometría de flujo de una muestra de fluido para partículas del tamaño de un virus no asociadas teñidas con múltiples colorantes fluorogénicos susceptibles a interacciones de apilamiento  $\pi$  en líquido acuoso, comprendiendo el método:
  - preparar una muestra de fluido teñida para la evaluación por citometría de flujo, que comprende mezclar al menos una parte de la composición de tinción fluorogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, con una muestra de material biológico a evaluar por citometría de flujo para detectar la presencia de las partículas del tamaño de un virus no asociadas;
  - después de la preparación, someter la muestra de fluido teñida a citometría de flujo en un citómetro de flujo para detectar y contar las apariciones de partículas no asociadas del tamaño de un virus teñidas tanto con el primer colorante fluorogénico como con el segundo colorante fluorogénico.
10. Un método para la evaluación por citometría de flujo de una muestra de fluido para partículas del tamaño de un virus no asociadas teñidas con múltiples colorantes fluorogénicos susceptibles a interacciones de apilamiento  $\pi$  en líquido acuoso, comprendiendo el método:
  - someter una muestra de fluido teñido a la evaluación de citometría de flujo para las partículas del tamaño de un virus, en donde la muestra de fluido teñida comprende:
    - material biológico para evaluarse por citometría de flujo para detectar la presencia de las partículas del tamaño de un virus no asociadas;
    - una pluralidad de diferentes colorantes fluorogénicos que tienen cada uno una firma de emisión fluorescente diferente y cada una contiene al menos un grupo aromático susceptible a apilamiento  $\pi$ , incluyendo la pluralidad de diferentes colorantes fluorogénicos al menos un primer colorante fluorogénico con la primera firma de emisión fluorescente, y

un segundo colorante fluorogénico con una segunda firma de emisión fluorescente que es diferente de la primera característica de emisión fluorescente; y  
un líquido acuoso en el que se dispersa el material biológico y colorantes fluorogénicos;

- 5 en donde la evaluación por citometría de flujo comprende someter la muestra de fluido teñida a citometría de flujo en un citómetro de flujo para detectar y contar las apariciones de las partículas no asociadas del tamaño de un virus teñidas tanto con el primer colorante fluorogénico como con el segundo colorante fluorogénico; y  
en donde el líquido acuoso de la muestra de fluido teñida comprende disacárido disuelto.
- 10 11. El método de una cualquiera de la reivindicación 9 o la reivindicación 10, en donde la muestra de fluido teñida comprende una concentración del disacárido disuelto de al menos el 0,5 por ciento en peso, y no más del 15 por ciento en peso.
- 15 12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 9-11, en donde la muestra de fluido teñida tiene una concentración de DMSO de al menos el 0,5 por ciento en peso, y no mayor del 30 por ciento en peso.
- 20 13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 9-12, en donde las partículas del tamaño de un virus no asociadas tienen un tamaño en un intervalo de 10 nanómetros a un micrómetro.
- 25 14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 9-13, en donde la citometría de flujo comprende:  
enfocar hidrodinámicamente con un fluido envolvente un flujo de la muestra de fluido teñida; y  
hacer fluir la muestra de fluido teñida enfocada hidrodinámicamente a través de una celda de flujo  
en la que la muestra de fluido teñida enfocada hidrodinámicamente que fluye se somete a radiación  
de excitación para estimular una respuesta de emisión fluorescente de cada uno del primer colorante  
fluorogénico y el segundo colorante fluorogénico, en las partículas del tamaño de un virus no  
asociadas teñidas con el primer colorante fluorogénico y el segundo colorante fluorogénico; y  
30 detectar tanto la primera firma de emisión fluorescente como la segunda firma de emisión  
fluorescente; y en donde, el flujo comprende mantener un caudal de la muestra de fluido teñida  
enfocada hidrodinámicamente a través de la celda de flujo, en un intervalo de 300 nanolitros por  
minuto a 6000 nanolitros por minuto.
- 35 15. El método de la reivindicación 14, en donde la citometría de flujo comprende detectar por separado cada una de la primera firma de emisión fluorescente y la segunda firma de emisión fluorescente, y la detección correlacionada en el tiempo de la primera firma de emisión fluorescente, y la detección de la segunda firma de emisión fluorescente, para determinar un evento de detección indicativo de una aparición de dicha partícula del tamaño de un virus no asociada teñida tanto con el primer colorante fluorogénico como con el segundo colorante fluorogénico.

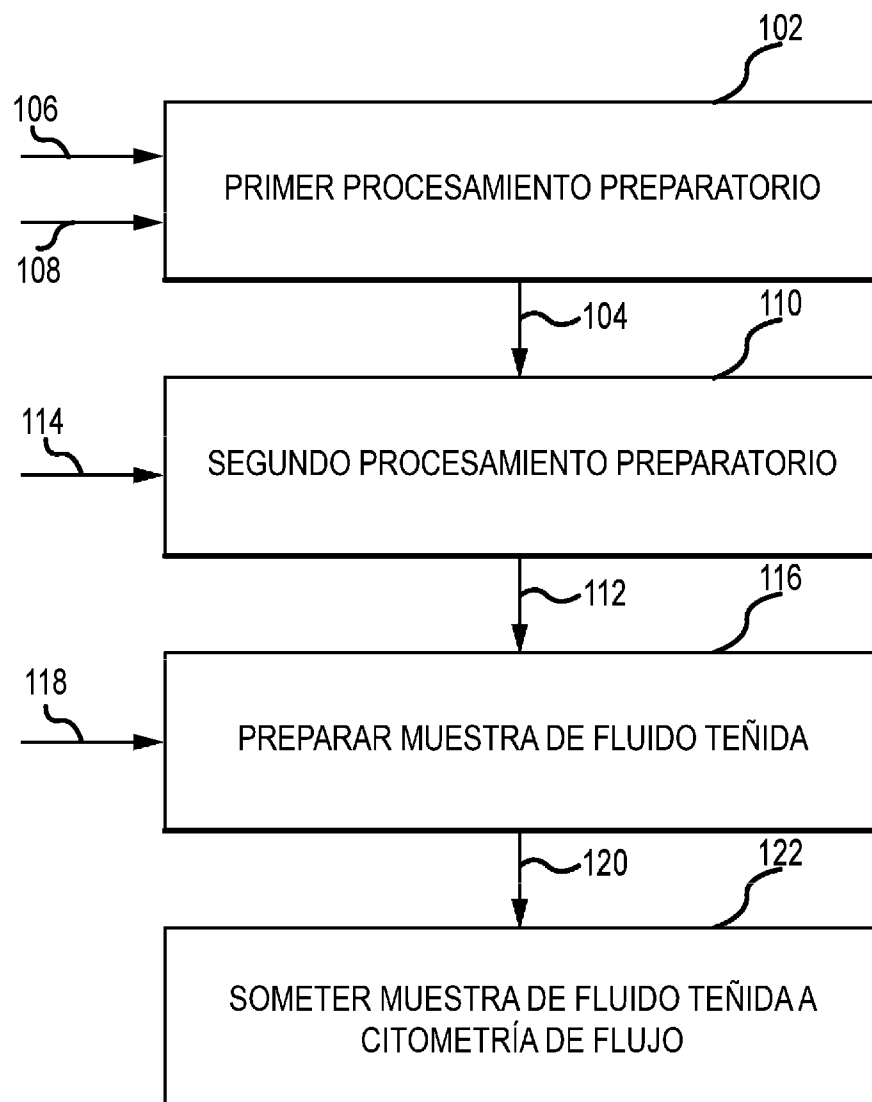


Figura 1

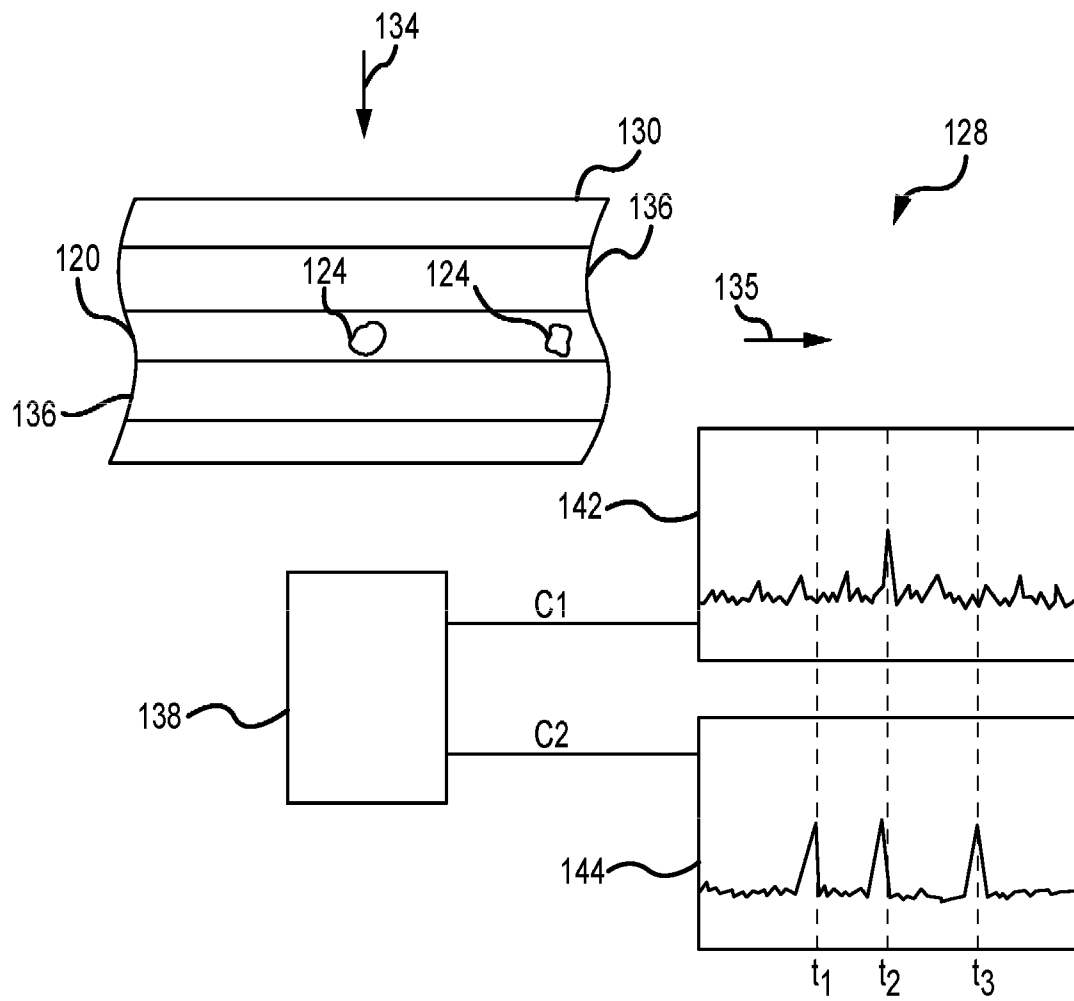


Figura 2

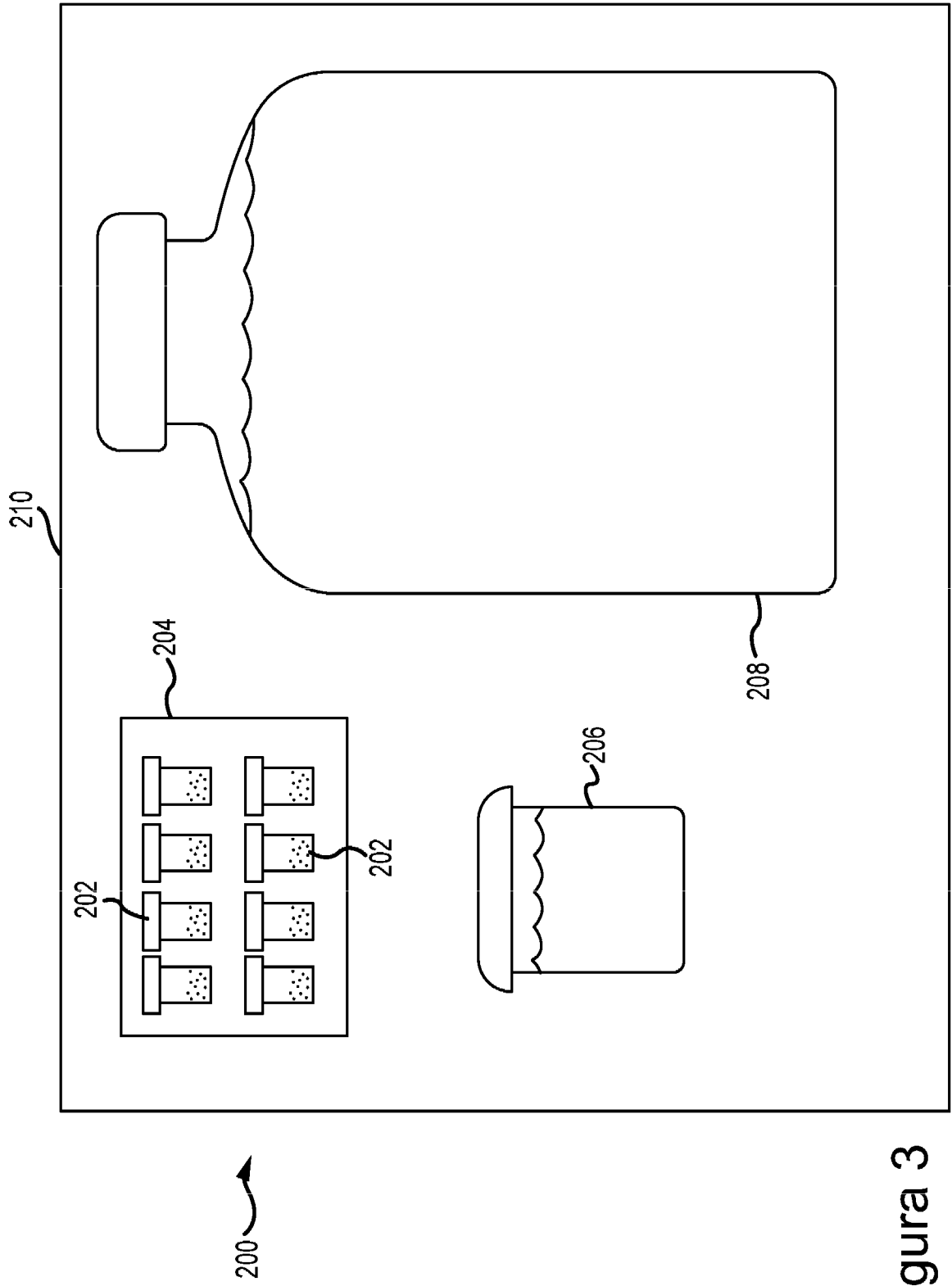


Figure 3

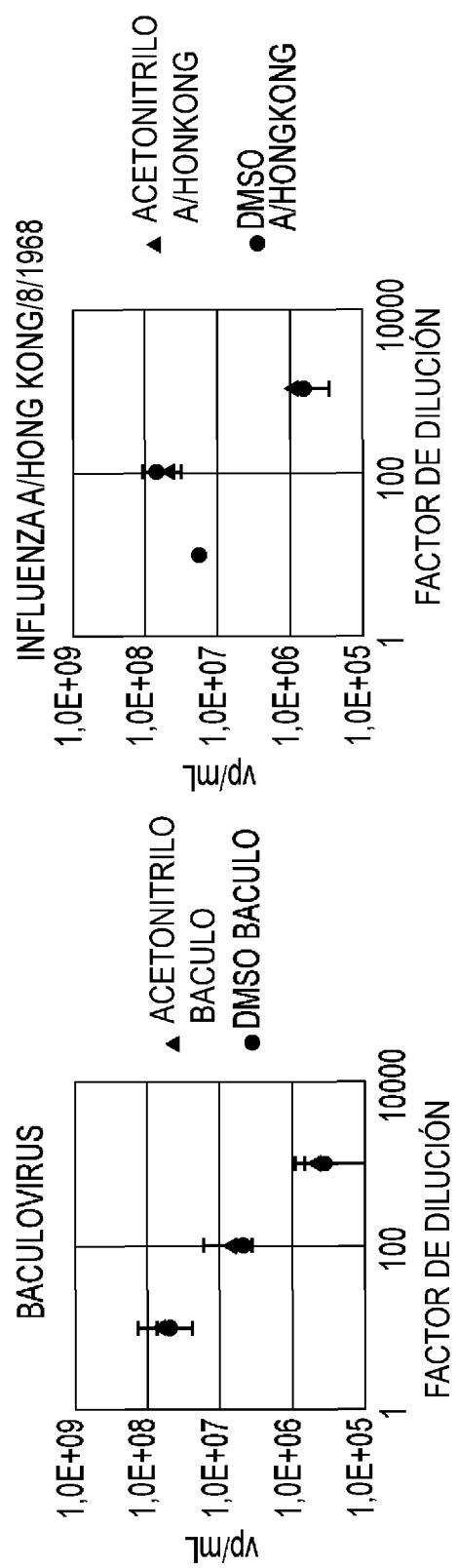


Figura 5

Figura 4

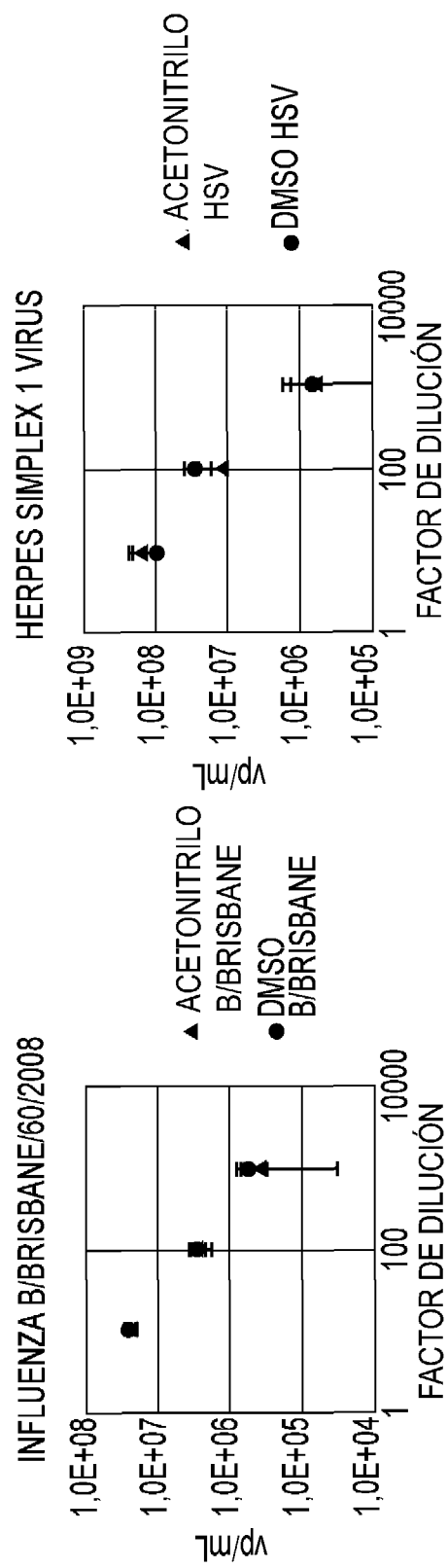


Figura 6

Figura 7

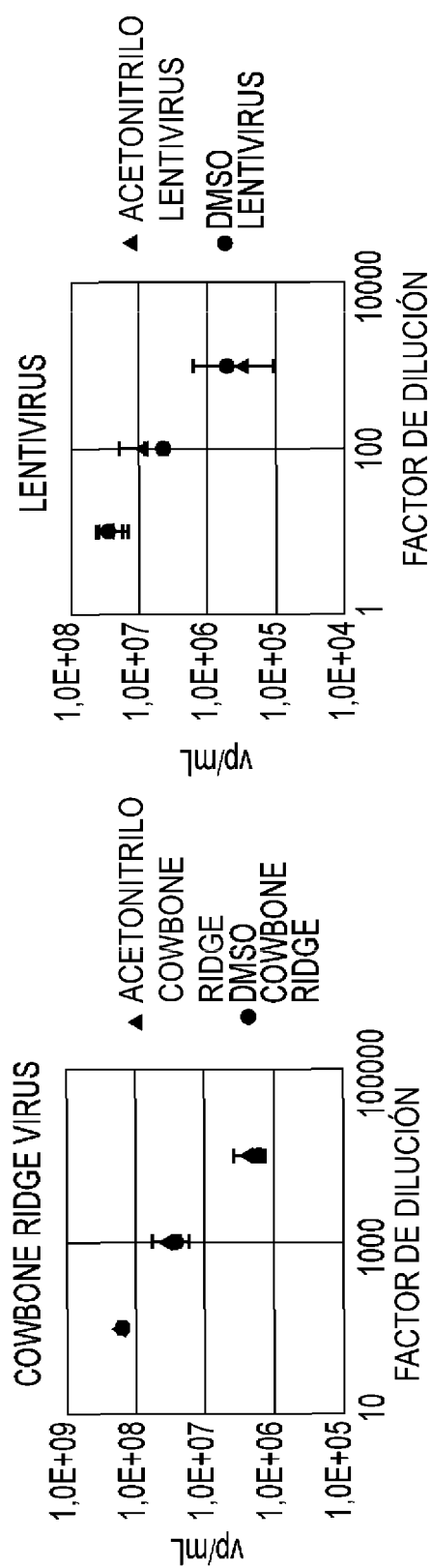


Figura 8

Figura 9

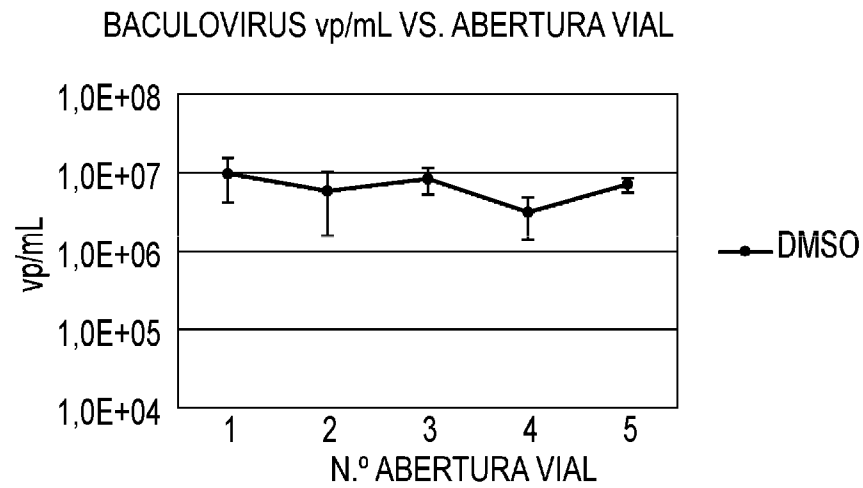


Figura 10

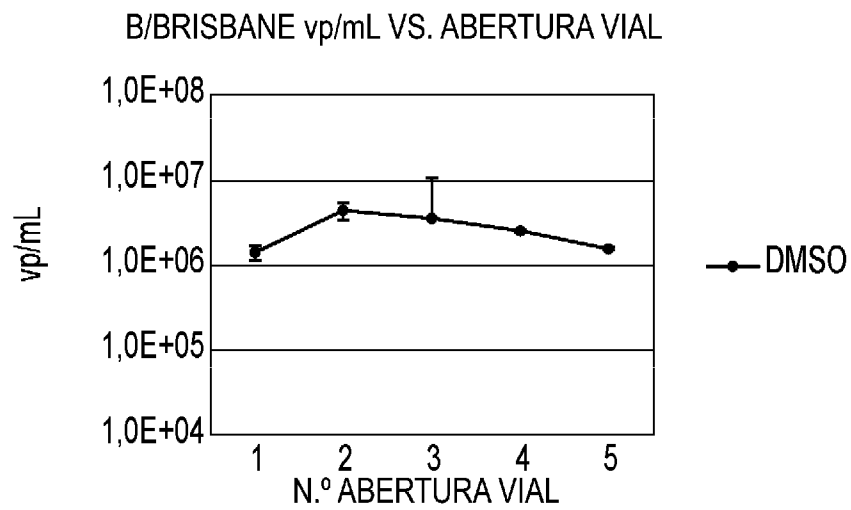


Figura 11

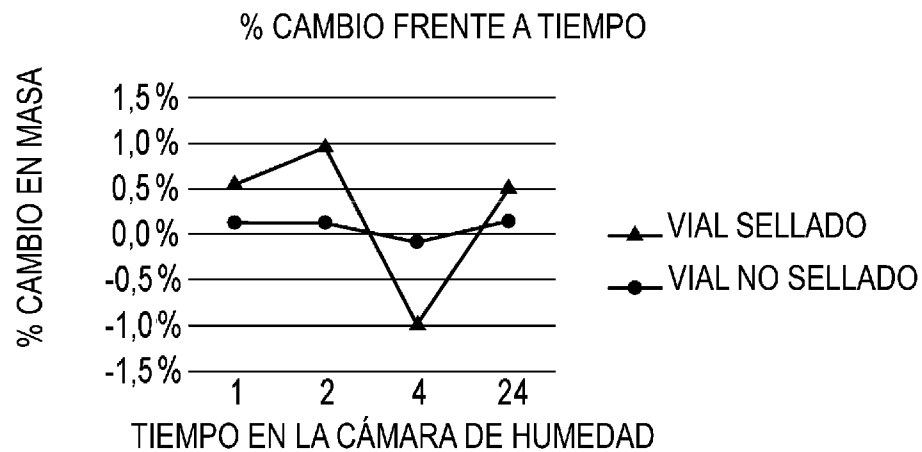


Figura 12

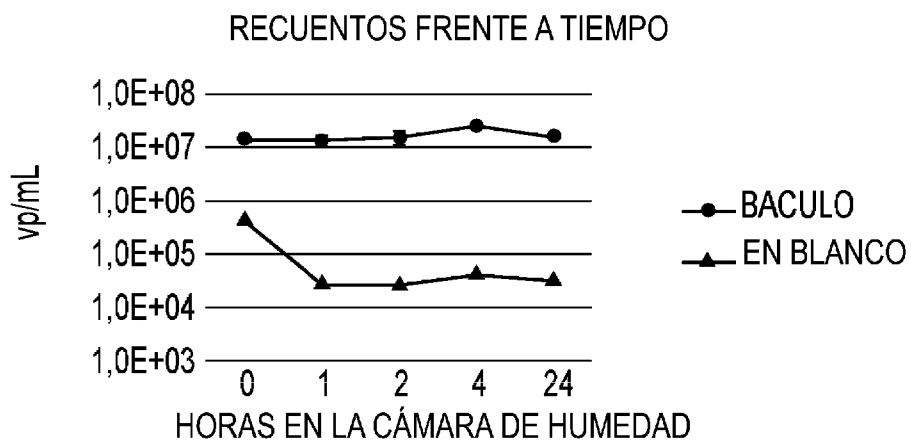


Figura 13

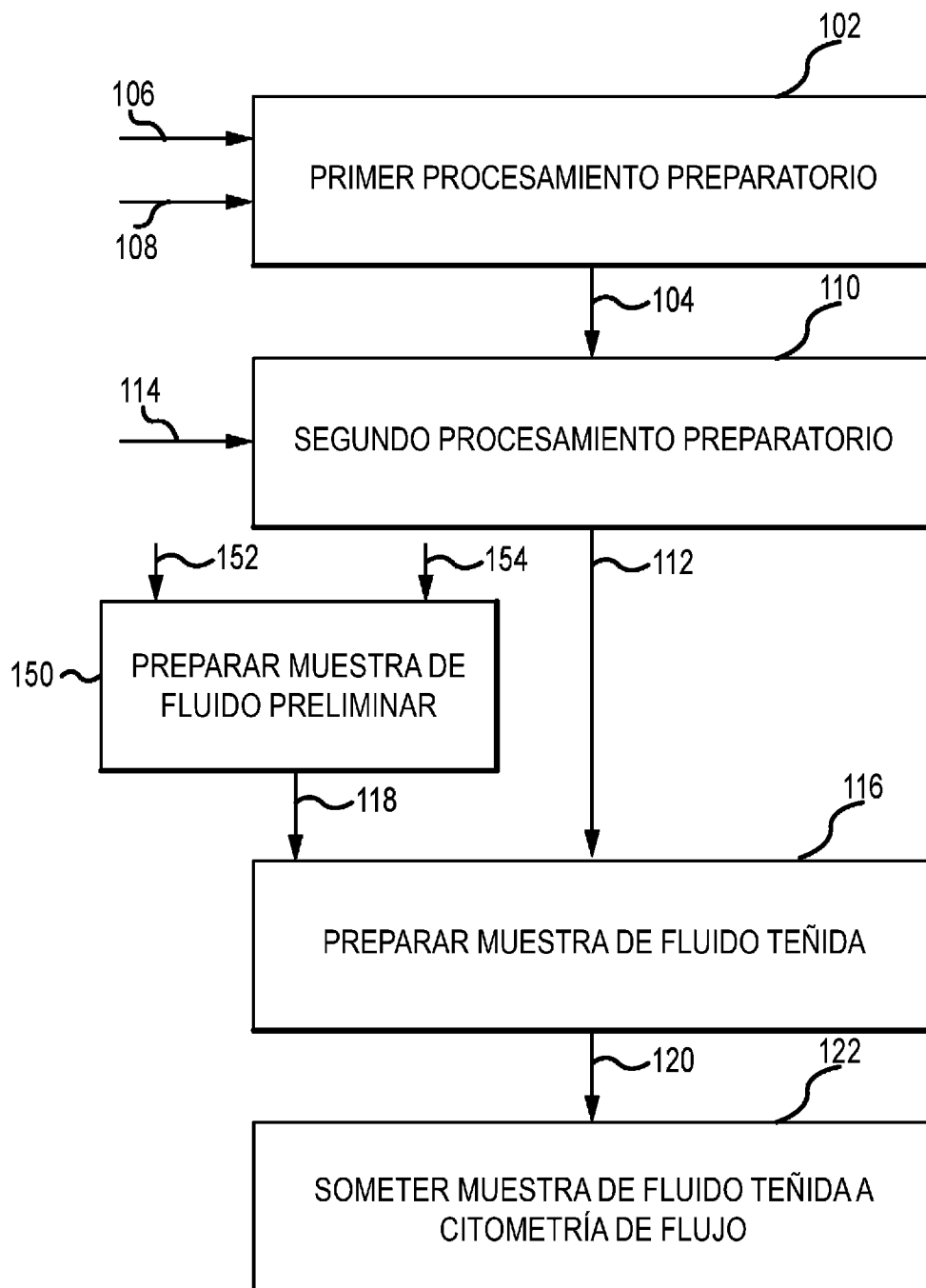


Figura 14

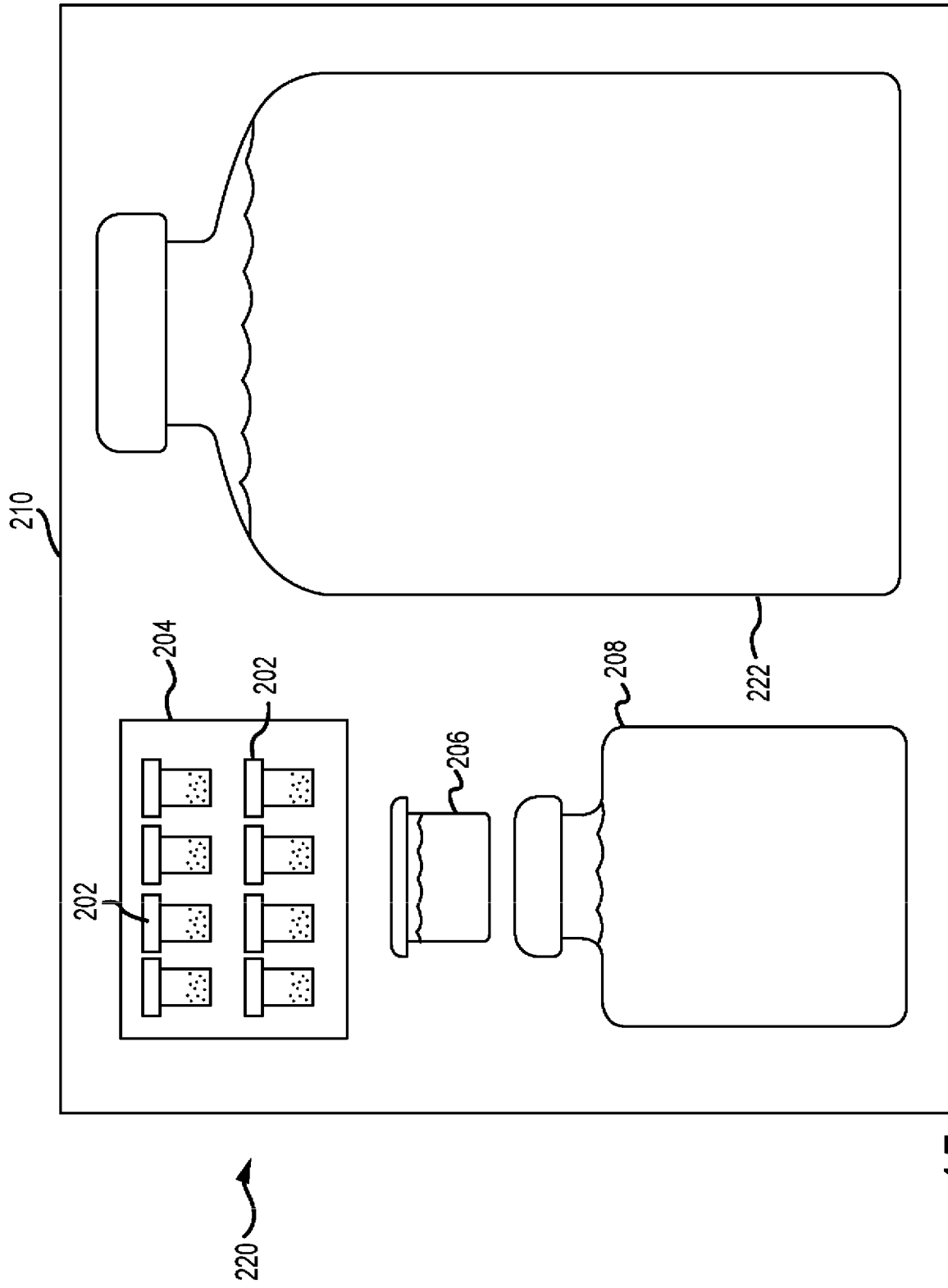


Figura 15