

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 278**

51 Int. Cl.:
G06F 19/10 (2011.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08871115 .5**
96 Fecha de presentación: **23.10.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2212820**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.08.2010**

54 Título: **Medición de una población de ácidos nucleicos, en particular mediante PCR en tiempo real**

30 Prioridad:
25.10.2007 FR 0707508

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.05.2012

73 Titular/es:
**BIO-RAD PASTEUR
3, BOULEVARD RAYMOND POINCARÉ
92430 MARNES LA COQUETTE, FR**

72 Inventor/es:
**JAHAN, Virginie y
KAMINSKI, Karine**

74 Agente/Representante:
Espiell Volart, Eduardo María

ES 2 380 278 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

Medición de una población de ácidos nucleicos, en particular mediante pcr en tiempo real

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de medición de una cantidad inicial de ácidos nucleicos contenidos en una muestra de interés y sometida a una amplificación. La invención encuentra especialmente una aplicación ventajosa en el seguimiento terapéutico de las enfermedades infecciosas, pero también en el ámbito de la genética y de la oncología, y de un modo más general, cualquiera que sea el ámbito de aplicación, como por ejemplo el ámbito veterinario, el agroalimentario, y el ámbito vegetal.

10 El ámbito en cuestión es el de las técnicas de amplificación génica que permiten determinar una cantidad inicial de una secuencia de ácidos nucleicos de interés presentes en una muestra y especialmente las técnicas de amplificación que permiten la cuantificación en tiempo real, como la técnica de la PCR (reacción en cadena de la polimerasa, en inglés "Polymerase Chain Reaction") en tiempo real, por ejemplo.

15 La presente invención encuentra una aplicación ventajosa pero no limitante en la determinación de la cantidad inicial de ácidos nucleicos en una muestra sometida a una reacción de PCR en tiempo real para evaluar el número de copias de ácidos nucleicos de agentes infecciosos (virus, bacterias, levaduras, etc.) presentes en una muestra biológica (suero, plasma, sangre, expectoraciones, etc.). Esta técnica puede funcionar con ADN o ARN. Aquí se hará referencia en general, y salvo indicación contraria, al ADN, sin estar restringida a este ácido nucleico.

20 La PCR hace intervenir unas variaciones de temperatura que permiten la disociación del ADN en dos cadenas ("desnaturalización"), y la hibridación de un cebador sobre cada cadena del ADN desnaturalizado. Cada cebador es pues específico, y complementario de una de las dos cadenas del ADN. La acción de una ADN polimerasa da lugar a la síntesis de nuevas cadenas complementarias de cada cadena utilizada inicialmente como matriz. Esto constituye una serie de etapas de "desnaturalización / hibridación / síntesis de cadenas", que se repite cíclicamente.

La PCR en tiempo real es una técnica que permite la amplificación y detección simultánea de una o varias secuencias diferentes de ácidos nucleicos diana. La detección se puede llevar a cabo a lo largo del tiempo y puede ser cuantitativa.

25 La técnica de la PCR cuantitativa en tiempo real hace intervenir uno o varios marcadores de ADN, por ejemplo fluorescentes, que permiten la cuantificación de la secuencia nucleica (o las secuencias nucleicas) a detectar. En general esta técnica utiliza la comparación de la muestra a analizar con un patrón, o con una gama de patrones. Un patrón es una muestra que contiene una cantidad conocida de ácidos nucleicos. En principio se somete a los mismos tratamientos que la muestra a analizar. Tanto para la muestra de interés como para el patrón, la fluorescencia varía proporcionalmente con la cantidad de ácidos nucleicos presentes en la muestra antes y durante la reacción. Esto se explicará de manera detallada más adelante en la siguiente descripción.

30 Por otra parte, la PCR cuantitativa en tiempo real se desarrolla en varias fases, en las que las dinámicas de reacción son diferentes, como se verá a continuación. Por consiguiente, en general se utilizan varios puntos de medición, con el fin de realizar un seguimiento de la dinámica de reacción.

35 Todo esto hace que las técnicas de PCR en tiempo real para la cuantificación de una muestra de interés sean difíciles de poner en práctica, lo cual afecta a la generalización de su utilización, en el caso de que su interés sea manifiesto.

La presente invención permite mejorar la situación.

40 Para este fin, la invención viene a introducir un procedimiento de medición de la cantidad de ácidos nucleicos de una secuencia diana en una muestra de interés, que comprende las etapas de:

- a. Someter la muestra de interés a un tratamiento de amplificación, con un lote de reactivos que comprenden al menos un marcador de ácido(s) nucleico(s) específico para dicha secuencia diana, comportando dicho tratamiento de amplificación unos ciclos de ampliación sucesivos (i; de 1 a n),
- 45 b. Medir una magnitud física (F_i) representativa de la evolución del marcador durante al menos una parte de los ciclos de amplificación,
- c. Expresar un parámetro (F_0) representativo de la magnitud física del marcador de ácido(s) nucleico(s) antes de cualquier ciclo de amplificación, utilizando las mediciones tomadas en la etapa b.,
- 50 d. Estimar el número inicial ($N_0^{mues.}$) de ácido(s) nucleico(s) de la secuencia diana con la ayuda de una ley de conversión, que comprende unos parámetros contextuales, y aplicada a dicho parámetro (F_0) expresado en la etapa c.,

En la etapa d., dichos parámetros contextuales son los parámetros de referencia pre-registrados, son parámetros sensiblemente independientes de al menos una parte de las condiciones experimentales.

Los parámetros de referencia anteriormente mencionados se determinan de antemano basándose en el comportamiento de al menos una muestra de referencia del mismo formato biológico que la muestra de interés y del número inicial conocido N_0^{ref} de ácido(s) nucleico(s).

5 Según un modo de realización, la ley de conversión de la etapa d., se puede aplicar directamente, sin necesidad de corrección para la ejecución en paralelo de las etapas a., b. y c. para al menos un calibrador.

10 Este modo de realización simplifica por tanto la puesta en práctica del procedimiento para el operario final reduciendo los tiempos de funcionamiento y también da lugar a una reducción significativa de los costes de los reactivos, no despreciables, especialmente en el ámbito de la salud pública. Además, gracias a los parámetros de referencia pre-registrados, se evita una manipulación de elementos que habitualmente acompañan a una reacción de amplificación. En particular se evita la utilización de muestras patrón, lo que permite aumentar el número de pocillos disponibles para someter a ensayo las muestras a analizar (ganancia de espacio).

15 Otro modo de realización prevé que la etapa d. comprenda una corrección del número inicial ($N_0^{mues.}$) estimado. Esta corrección se funda en una ejecución de antemano de las etapas a., b. y c. para al menos un calibrador (EQC) del número inicial de ácido(s) nucleico(s) y del parámetro (F_0^{EQC}) representativo de la magnitud física del marcador de ácido(s) nucleico(s) antes de cualquier ciclo de amplificación conocido.

Esta corrección del número inicial ($N_0^{mues.}$) estimado se puede llevar a cabo mediante las siguientes etapas:

- establecer una ley correctora entre:

- dicho parámetro conocido (F_0^{EQC}) representativo de la magnitud física del marcador de ácido(s) nucleico(s) antes de cualquier ciclo de amplificación, en primer lugar y,
- 20 • el parámetro expresado efectivamente ($F_0^{EQCmedido}$) representativo de la magnitud física del marcador de ácido(s) nucleico(s) antes de cualquier ciclo de amplificación por el calibrador,

- aplicar dicha ley correctora a la citada ley de conversión que comporta los parámetros contextuales de la etapa d., para la estimación de dicho número inicial ($N_0^{mues.}$) de ácido(s) nucleico(s) de la secuencia diana presente en el muestra de interés.

25 Para la corrección anteriormente mencionada, el calibrador (EQC) de un número inicial conocido se funda en una sustancia biológica capaz de formar un control positivo para la muestra de interés.

En este modo de realización, la corrección no genera pues la adición de tubos de reacción suplementarias, lo cual es ventajoso en relación a las técnicas de cuantificación conocidas de la técnica anterior.

En la etapa c. del procedimiento la expresión del parámetro (F_0) hace intervenir al menos:

- 30 - un parámetro relativo a la basculación entre una primera fase de rendimiento de amplificación constante y una segunda fase de rendimiento de amplificación no constante,
- un parámetro relativo al rendimiento de amplificación constante en dicha primera fase, y
- un parámetro relativo al rendimiento de amplificación no-constante en dicha segunda fase.

El marcador de ácidos nucleicos puede ser un marcador fluorescente.

35 La muestra de interés puede ser una muestra biológica susceptible

de comprender un agente patógeno.

La reacción de amplificación utilizada puede ser una Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en tiempo real.

40 Los parámetros de referencia presentan preferiblemente la ventaja de ser independientes de al menos uno de los elementos del grupo de las siguientes condiciones experimentales: aparato utilizado, tipo de aparato utilizado, operario, período de validez del lote de reactivos, modo de extracción de los ácidos nucleicos de la secuencia diana.

Según otro modo de realización y en el marco de un tratamiento de amplificación denominado PCR multiplex, la muestra de interés puede comprender varias secuencias diana distintas a cuantificar.

45 La presente invención igualmente se refiere a un aparato para medir el nivel de ácidos nucleicos de al menos una secuencia diana en una muestra de interés, que comprende:

- a. Un elemento de soporte para soportar al menos una muestra que comprende un lote de reactivos y la secuencia diana con al menos un marcador de ácido(s) nucleico(s) específico para dicha secuencia diana,

- b. Una unidad de amplificación para someter la muestra de interés a un tratamiento de amplificación que comprende unos ciclos de amplificación sucesivos (i ; de 1 a n),
- c. Una unidad de medición para medir una magnitud física (F_i) representativa de la evolución de dicho marcador durante al menos una parte de los ciclos de amplificación,
- 5 d. Una unidad de tratamiento que comprende una memoria y dispuesta para:
- i. expresar un parámetro (F_0) representativo de la magnitud física del marcador de ácido(s) nucleico(s) antes de uno cualquiera de los ciclos de amplificación, en base a las mediciones de la magnitud física,
- 10 ii. estimar el número inicial ($N_0^{\text{mues.}}$) de ácido(s) nucleico(s) de una secuencia diana presente en la muestra de interés con la ayuda de una ley de conversión, en base a parámetros contextuales,
- e. Un controlador organizado, cuando una muestra de interés se recibe en el elemento de soporte, para la aplicación de la unidad de amplificación y la unidad de medición a dicha muestra recibida, y para hacer una llamada a la unidad de tratamiento con las mediciones obtenidas por dicha unidad de medición.

15 En este aparato, los parámetros contextuales estimados con la unidad de tratamiento son los parámetros de referencia sensiblemente independientes de al menos una parte de las condiciones experimentales y pre-registrados en la unidad de tratamiento.

20 La presente invención igualmente proporciona un producto de programa informático que comprende instrucciones para la puesta en práctica del procedimiento anteriormente mencionado. Este programa está destinado para ser almacenado en una memoria de la unidad de tratamiento en el aparato descrito anteriormente. Además, la invención se refiere a un soporte para el almacenamiento de datos, que comprende las instrucciones para la puesta en práctica del procedimiento descrito anteriormente.

Otras ventajas y características de la invención aparecerán con la lectura de la descripción detallada que sigue y los gráficos anexos, en los cuales:

- La Figura 1 muestra una curva de la evolución de una reacción en cadena por la polimerasa (PCR),
- 25 - La Figura 2 muestra las mediciones de fluorescencia emitida en función del número de ciclo PCR,
- La Figura 3 se refiere a la técnica anterior para la determinación de la población inicial de ácidos nucleicos de una secuencia diana en una muestra de interés y presenta una curva de regresión establecida a partir del procedimiento de los Ct,
- 30 - La Figura 4 se refiere a la determinación de una magnitud física (F_0) representativa de la cantidad inicial de una secuencia diana presente en una muestra de interés (técnica anterior),
- La Figura 5 muestra una recta patrón trazada a partir de muestras de referencia del mismo formato biológico que la muestra a analizar,
- La Figura 6 presenta de una manera esquemática y funcional un aparato para cuantificar una población inicial de una muestra de interés,
- 35 - La Figura 7 muestra una curva de precisión de un procedimiento de cuantificación según la técnica anterior, y
- La Figura 8 muestra una curva de precisión de un ejemplo de realización de la invención.

40 Los dibujos y la descripción que siguen contienen, en esencia, los elementos de carácter cierto. Por tanto pueden servir no sólo para comprender mejor la presente invención, sino también para contribuir a su definición, si fuese el caso.

45 Ahora se verá con mayor detalle las técnicas que permiten cuantificar la población de ácidos nucleicos presentes en una muestra de interés. Por muestra de interés se define esencialmente una muestra para analizar. Esta muestra de interés puede ser pues cualquier extracción biológica (en particular fluidos corporales), susceptibles de contener al menos una secuencia diana de ácidos nucleicos a cuantificar. Por población (o población de interés) de ácidos nucleicos se define de manera general la cantidad de una o varias secuencias diana presentes en una muestra de interés.

Por regla general, la población de ácidos nucleicos presentes en la muestra de interés es demasiado baja para permitir su cuantificación de una manera simple por una medición directa. Por tanto, la muestra de interés se somete a un tratamiento de amplificación con el fin de amplificar la o las secuencias diana a cuantificar.

50 El tratamiento de amplificación consiste, por una parte, en extraer la o las secuencias diana a partir de la

muestra de interés por los procedimientos de extracción clásicos conocidos en la materia, y por otra, en someter a la o las secuencias diana a aplicaciones sucesivas de una reacción de amplificación. Por tanto se comprenderá que la muestra de interés varía con el desarrollo del tratamiento de amplificación. Partiendo de una extracción biológica en bruto (sangre o suero, en particular), la muestra de interés se somete a varias etapas de reacción (extracción, purificación, lavado, etc.) que implican diversos reactivos químicos y / o biológicos. Por lo tanto, la composición bioquímica de la muestra de interés no es invariable con el desarrollo del tratamiento de amplificación. La persona experta sabrá distinguir la composición bioquímica a la vista de la descripción y en particular sabrá diferenciar entre:

- 5 - la muestra de interés denominada en bruto, que define la extracción biológica en bruto principalmente como una extracción de sangre, de suero, o una extracción de piel,
- 10 - la muestra de interés denominada extraída, que define una muestra después de la extracción y purificación de los ácidos nucleicos que comprenden una o varias secuencias diana a cuantificar,
- 15 - la muestra de interés denominada reactiva, que define la muestra acondicionada para someterse a aplicaciones sucesivas de una reacción de amplificación; comprendiendo la muestra una o varias secuencias diana a cuantificar, y un lote de reactivos necesarios para aplicar dicha sucesión de aplicaciones de una reacción de amplificación a la muestra (detallado a continuación).

La sucesión de aplicaciones de una reacción de amplificación puede ser, por ejemplo, la técnica denominada PCR en tiempo real. Sin embargo, la invención no se limita necesariamente a esta técnica y se podría aplicar a cualquier tratamiento de amplificación (y, en particular, se podría aplicar a la LCR "reacción en cadena de la ligasa").

20 La técnica de la PCR en tiempo real tiene su aplicación en particular en el diagnóstico y seguimiento terapéutico para la evaluación del número de copias de agentes patógenos (por ejemplo, del virus de la hepatitis B: el VHB, el virus de la hepatitis C: el VHC o incluso del virus de la inmunodeficiencia humana: VIH) en una extracción de fluidos corporales (por ejemplo, suero, plasma o sangre) de un individuo.

25 En la PCR, la cuantificación se realiza al final de la reacción, por lo general en gel de agarosa. Se basa en el número de ácidos nucleicos presentes al final de la reacción de amplificación de una secuencia diana, y en la comparación con una o varias secuencias de ácidos nucleicos presentes en una muestra patrón o una gama de muestras patrón y de las que se conocen la o las concentraciones iniciales.

Cuando se utiliza una sola muestra patrón, generalmente se co-amplifica en paralelo con la secuencia diana a detectar. De un modo general, estos procedimientos son bastante precisos, y poco sensibles, dando como resultado una cuantificación insatisfactoria. El desarrollo de la PCR en tiempo real ha supuesto una mayor precisión y sensibilidad.

30 Cuando se realiza una PCR en tiempo real, la cuantificación se lleva a cabo durante la reacción de amplificación. Se utilizan marcadores, por ejemplo, marcadores fluorescentes, específicos para la secuencia diana a amplificar. Actualmente existen diferentes sistemas que hacen intervenir los marcadores fluorescentes. Entre estos sistemas podemos citar los descritos en las patentes US 5.210.015, US 5.487.972, US 5.723.591, US 5.118.801, US 5.925.517 y US 6.150.097. La fluorescencia emitida durante la reacción, y más específicamente emitida después de cada ciclo de amplificación varía proporcionalmente a la cantidad de productos de la PCR, a saber, con la cantidad de ácidos nucleicos, o más precisamente con la o las secuencias diana. Consecuentemente, mediante este procedimiento teóricamente se puede medir la totalidad de la cinética de reacción. En la práctica, la medición sólo es posible desde el momento en el que la medida - fluorescencia - se distingue del ruido de fondo.

40 Muy brevemente, por ciclo de amplificación o ciclo de la PCR, se entiende una fase durante la cual la muestra de interés se somete a variaciones de temperatura en presencia de un cierto número de reactivos (dNTPs, polimerasa, cebadores, etc.). Las variaciones de temperatura permiten, en un primer momento la desnaturalización de la doble cadena de ADN mediante la ruptura de las estructuras secundarias, de tal manera que las dos cadenas se separan. A continuación, las variaciones de temperatura permiten la hibridación de los cebadores de ADN específicos para la secuencia diana, presentes en el medio de reacción, y la activación de las polimerasas que llevarán a cabo la síntesis de nuevas cadenas de ADN (dicha cadena se denomina "amplicón" y es complementaria a la secuencia diana). En la PCR en tiempo real, el conjunto de las secuencias diana se detecta en cada nuevo ciclo por los marcadores fluorescentes.

50 En la Figura 1 está representado el diagrama esquemático de una curva de amplificación por PCR en tiempo real, con los índices de ciclos de la PCR en el eje de abscisas y las cantidades de fluorescencia emitida en el eje de ordenadas (en unidades arbitrarias [u.a.]). La fluorescencia se mide en cada ciclo de la PCR.

La cantidad de fluorescencia F_n varía en función del número n de los ciclos de la PCR ya realizados. En esta evolución se distinguen sucesivamente:

- una primera parte BDF en la que las medidas de la fluorescencia se confunden sustancialmente con el ruido de fondo del aparato de medición de dicha fluorescencia,
- 55 - una segunda parte EXP en la que las cantidades de fluorescencia medidas crecen de manera

sensiblemente exponencial,

- una tercera parte LIN en la que el crecimiento de las cantidades de fluorescencia medidas se reduce sustancialmente y globalmente se comporta de un modo sensiblemente lineal, y
- una cuarta parte PLA en la que las medidas de fluorescencia alcanzan una fase de meseta (efecto de saturación).

5

Durante la primera y segunda partes definidas anteriormente, la cinética de la reacción responde a una ley exponencial. Con el transcurso de estos ciclos, la población de interés (cantidad de secuencia diana) crece constantemente de modo exponencial. Esto define una fase exponencial sensiblemente estacionaria de la reacción de amplificación.

10

Los ciclos siguientes durante las fases tercera y cuarta, ya no obedecen a una cinética de tipo exponencial. En efecto, el crecimiento de la población de interés compite con los fenómenos de amortiguación, en particular la limitación de dNTPs, en marcadores fluorescentes y la degradación de la actividad enzimática de la polimerasa. En última instancia, se alcanzará una fase de meseta. Se trata de una fase no estacionaria de la reacción de amplificación.

15

Para estimar la cantidad inicial desconocida de ácidos nucleicos de una secuencia diana en una muestra de interés se han descrito diversas técnicas. El documento "Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves", de R. G. Rutledge y C. Côté, en la revista científica *Nucleic Acids Research*, 2003, vol. 31, N° 16 describe un procedimiento que consiste en utilizar varias muestras con ácidos nucleicos en cantidades iniciales conocidas, denominados "patrones" para determinar, por interpolación, la cantidad inicial de ácidos nucleicos presentes en la muestra de interés. La Figura 2 se refiere a esta técnica anterior.

20

Como se ha mencionado anteriormente, al representar la cantidad de fluorescencia medida F_n en función del número de ciclos de la PCR, se distingue una primera parte BDF en la que las medidas de fluorescencia se confunden con el ruido de fondo del aparato de medición de la fluorescencia. Durante el transcurso de la reacción de la PCR, la fluorescencia alcanza un umbral de fluorescencia que se distingue del ruido de fondo. Generalmente este umbral es prefijado arbitrariamente por el operario y está situado significativamente por encima del ruido de fondo.

25

Se comprueba que cuanto mayor es la cantidad inicial de ácidos nucleicos de una secuencia diana en una muestra de interés, antes se puede distinguir la fluorescencia del ruido de fondo. Esto está directamente relacionado con el hecho de que cuanto mayor es la cantidad inicial de ácidos nucleicos de una secuencia diana, antes se alcanza una cantidad de producto de la PCR suficientemente importante para permitir la obtención de una señal distinguible del ruido de fondo.

30

En la Figura 2, se representan diferentes patrones de cantidades iniciales de ácidos nucleicos de una secuencia conocida. Se entiende que la población inicial en el patrón St_1 es mayor que en el patrón St_2 , la cual es mayor que la del patrón St_3 , y así sucesivamente. En vista de lo anterior, el ciclo de distinción de la fluorescencia se produce más pronto para el patrón St_1 que para el patrón St_2 el cual se produce incluso antes que el ciclo de distinción del patrón St_3 , y así sucesivamente.

35

Por lo tanto, al establecer un umbral SEU de fluorescencia distinto del ruido de fondo BDF y común para todos los patrones, se observa que el número Ct_1 de ciclos de la PCR necesarios para que el patrón St_1 alcance ese umbral prefijado es en consecuencia inferior al número Ct_2 de ciclos de la PCR necesarios para que el patrón St_2 alcance ese umbral, el cual es inferior al número Ct_3 de ciclos de la PCR necesarios para que el patrón St_3 alcance ese umbral, etc.

40

Esta observación se ha aprovechado en la técnica anterior para establecer una dependencia como la representada en la Figura 3 entre el número de ciclos Ct_1, Ct_2, Ct_3, Ct_4 , para varios patrones de cantidades iniciales conocidas, $N_0^{St1}, N_0^{St2}, N_0^{St3}, N_0^{St4}$. Esta dependencia se puede visualizar por medio de una curva, llamada curva de regresión REG. Así, al representar los ciclos Ct_1, Ct_2 , etc. en la ordenada y el logaritmo de las cantidades iniciales N_0^{St1}, N_0^{St2} , etc. en la abscisa, se obtiene la curva de regresión REG. En este caso, se trata más concretamente de una recta de regresión. Esta recta REG servirá entonces para la determinación de la cantidad inicial de ácidos nucleicos de una secuencia diana en una muestra de interés.

45

Así, en la Figura 2 se representa una muestra de interés de la cantidad inicial desconocida INT, en la que se distingue un ciclo Ct_{INT} . Mediante la proyección del ciclo Ct_{INT} sobre la curva / recta de regresión REG, se podrá determinar entonces el número inicial N_0^{INT} de la población de la muestra de interés (véase Figura 3).

50

Este procedimiento, aunque ampliamente difundido, presenta no obstante un cierto número de inconvenientes, de los que los 3 principales son:

- Estar totalmente basado en el criterio del operario para la determinación del valor del umbral SEU de fluorescencia que se distingue del ruido de fondo. Además es difícil distinguir con precisión dicho umbral debido a que las mediciones de fluorescencia en esta región (normalmente en la transición BDF / EXP) están muy próximas al ruido de fondo BDF,

- Precisar la utilización de varias muestras patrón de las que se conocen las cantidades iniciales de ácidos nucleicos de una o varias secuencias, lo que convierte este procedimiento en un proceso costoso en tiempo y en reactivos,
- Reconocer que el rendimiento de amplificación de la población de ácidos nucleicos es la misma para todas las muestras patrón y para la muestra de interés; en caso de que la muestra de interés contenga unos inhibidores de la PCR, la estimación de la población inicial será falsa, puesto que será demasiado baja.

5

10

15

Para abordar los inconvenientes anteriormente mencionados y para aportar otras ventajas y en particular la utilización de un solo patrón, la patente EP1700245 introduce un procedimiento puesto en práctica por medios informáticos de cuantificación absoluta y / o relativa de una población inicial de ácidos nucleicos en una muestra de interés. En este procedimiento, la muestra se somete a aplicaciones sucesivas de una reacción de amplificación de una población de interés (una o varias secuencias diana). La amplificación puede ser una PCR o cualquier otra técnica de amplificación, ya que es posible seguir la variación del rendimiento de la reacción correspondiente a esta amplificación. En efecto, la deducción de la cantidad inicial de ácidos nucleicos en la muestra utiliza el hecho de que en el marco de las reacciones de amplificación de una cantidad de ácidos nucleicos, el rendimiento bascula a menudo de una eficacia constante a una eficacia no constante. Para definir esta basculación BAS, durante el transcurso de la amplificación se identifican las medidas experimentales representativas del número real de la población, para finalmente deducir el número inicial en la muestra de interés.

20

25

En la PCR en tiempo real, la basculación BAS anteriormente mencionada corresponde sensiblemente a la basculación del rendimiento de amplificación observado entre la fase constante y la fase no constante, ambas definidas anteriormente. Esta basculación normalmente se sitúa aquí, entre la fase exponencial (parte EXP) y la fase lineal (parte LIN). Mediante esta basculación los inventores de la presente solicitud han podido introducir (EP1700245) el procedimiento de cuantificación para una población de ácidos nucleicos presentes en una muestra de interés mencionada anteriormente. Para poder determinar con precisión la basculación BAS es necesario utilizar casi todos los puntos de medición de la curva de amplificación. Por esta razón, la PCR en tiempo real es particularmente adecuada para la puesta en práctica de este procedimiento.

30

35

La Figura 4 se refiere a la determinación de la cantidad inicial de ácidos nucleicos de una secuencia diana según la patente EP1700245, que también incluye una magnitud F_0 , que corresponde al valor de la fluorescencia para la población de la muestra de interés considerada antes de la amplificación. Esta magnitud F_0 , no medible, debido a que se encuentra por debajo del ruido de fondo BDF, es teórica, pero sensiblemente representativa de la población inicial. La determinación del parámetro F_0 es el origen de una precisión superior en comparación con la técnica anterior. En efecto, la cuantificación de la cantidad inicial de una población de ácidos nucleicos en la técnica anterior se realiza estableciendo un umbral de fluorescencia en la fase exponencial EXP, normalmente al final de la parte BDF (procedimiento Ct). Como se ha detallado anteriormente, es difícil establecer el umbral con precisión. Por esta razón, el procedimiento descrito en la patente EP1700245 utiliza casi todos los puntos de la curva de amplificación, lo que resulta en una precisión superior a los procedimientos conocidos.

Para este fin, en primer lugar es necesario formular las siguientes hipótesis:

- durante los primeros ciclos de amplificación en la parte exponencial EXP, el rendimiento de la reacción es sensiblemente constante, y
- el rendimiento de la reacción disminuye a partir de un cierto número de ciclos de amplificación; esta disminución tiene lugar durante la tercera y cuarta parte, a saber, la parte lineal LIN y la parte de meseta PLA, respectivamente.

40

45

Cabe señalar que el ruido de fondo es un problema experimental, ya que en teoría la fase exponencial se inicia desde el primer ciclo. La disminución del rendimiento puede tener diversas explicaciones tales como las mencionadas anteriormente, y en particular la degradación de los reactivos de reacción (ADN polimerasas, dNTPs, cebadores, etc.) o incluso la inhibición por los productos formados durante la reacción.

50

En cualquier caso, la determinación del factor F_0 generalmente requiere una transición que va desde un rendimiento constante, correspondiente a una situación de crecimiento por amplificación, a un rendimiento no constante. Para un rendimiento no constante se entiende que puede tratarse de un rendimiento decreciente o creciente. Para la puesta en práctica de la invención, es suficiente con detectar una basculación del rendimiento de una fase constante a una fase no constante.

Para un rendimiento E_n de la reacción de amplificación en el ciclo n y constante hasta el ciclo k , se puede escribir:

$$E_k = E_{k-1} = E_{k-2} = \dots = E_0, \text{ en donde } E_0 \text{ es el valor del rendimiento de la fase constante.}$$

55

El tamaño de la población de interés (una o varias secuencias diana) para un ciclo de amplificación viene dado por la relación: $N_{n+1} = N_n + E_n \cdot N_n$, en la que:

- N_n es el tamaño de la población de interés después de una amplificación del índice n en amplificaciones sucesivas,
 - N_{n+1} es el tamaño de la población de interés tras una amplificación que sigue a una amplificación del índice n en amplificaciones sucesivas, y
- 5
- E_n es el rendimiento de la reacción de amplificación del índice n .

Por inducción, esta ecuación se puede escribir como: $N_{n+1} = (1 + E_0)^{n+1} \cdot N_0$, en donde N_0 es el tamaño inicial de la población de interés.

Una vez superada la fase constante, es decir cuando el índice $n + 1$ supera la región de basculación, la relación se convierte en: $N_{n+1} = N_0 \times (1 + E_0)^{C_{eep}} \times \text{función}(C_{eep}, n + 1)$, en donde:

- 10
- el índice C_{eep} representa el índice de basculación, propiamente dicho, entre la fase exponencial y la fase lineal; por tanto se entiende que $(C_{eep}-1)$ es el último índice de la reacción de amplificación durante la cual el rendimiento es todavía constante,
 - el término *función* $(C_{eep}, n + 1)$ es una función particular que caracteriza a la fase no constante del rendimiento y que depende al menos del índice de basculación C_{eep} y del índice real de la amplificación de $n + 1$.
- 15

Se debe destacar que el índice de basculación C_{eep} y el número inicial N_0 de la población de interés están vinculados mediante esta relación.

Al eliminar el ruido de fondo, y con un cierto número de compensaciones consecutivas y de relaciones estadísticas, será posible determinar la fluorescencia inicial teórica F_0 antes del primer ciclo de amplificación. La patente EP1700245 describe con más detalle la determinación de la magnitud F_0 .

20

En la presente descripción, el parámetro F_0 hace referencia a una señal fluorescente. Sin embargo, la invención no está limitada de ningún modo a dicha naturaleza. En efecto, para la puesta en práctica de la invención puede servir cualquier otra magnitud física medible antes del primer ciclo de amplificación y representativa de la cantidad inicial de ácidos nucleicos de una secuencia diana. No obstante, por razones de simplicidad y comprensión, la siguiente descripción se limitará al modo de realización que utiliza una señal fluorescente. La señal fluorescente en el sentido de la presente descripción es emitida después de la hibridación del marcador fluorescente a la secuencia diana de ácidos nucleicos (procedimiento denominado "balizas moleculares"). En consecuencia, solamente la o las secuencias diana y los amplicones, asociados con el marcador fluorescente, emiten dicha señal fluorescente.

25

En base al principio de que la fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de ácidos nucleicos presentes en la muestra analizada, antes y durante la reacción de amplificación, resulta:

30

$$F_0 = k \times N_0^p, \text{ siendo } k \text{ una constante real y estando } p \text{ próximo a } 1.$$

La ecuación de la curva de regresión REG representada en la Figura 5 y que describe una relación de proporcionalidad entre la concentración de una secuencia diana de interés y la magnitud virtual F_0 , es del tipo:

$$\log(F_0) = a + b \log(N_0) \quad (F1)$$

Esta ecuación tiene la forma $y = a + bx$, y describe una recta con las constantes a y b , es decir, precisamente, se pueden definir la ordenada en el origen a y la pendiente b . Sin embargo, en otros casos, la ecuación de la curva de regresión REG no sigue la ecuación de una recta, sino que puede ser por ejemplo de tipo polinómico, sigmoidal o de otro tipo. En este caso, el número de constantes puede aumentar o disminuir dependiendo de la complejidad de la ecuación de la curva REG. Por razones de simplicidad, el modo de realización descrito en el presente documento se limita al caso de una curva de regresión en forma de una recta y por tanto a la determinación de la ordenada en el origen a y la pendiente b .

35

40

La curva / recta REG se predetermina utilizando una serie de muestras patrón (más específicamente "muestras de referencia" - detallado a continuación), del mismo formato biológico que la muestra de interés. Por formato biológico se entiende a continuación en la presente descripción, el conjunto:

- 45
- naturaleza biológica de la secuencia diana presente en una muestra, y
 - acondicionamiento de la muestra.

La naturaleza biológica está sustancialmente definida por la secuencia diana a cuantificar en una muestra (muestra de interés o muestra patrón / muestra de referencia). Por tanto se puede tratar de ADN o ARN (genómico, plasmídico, etc.) y más específicamente de la identidad de una secuencia de ácidos nucleicos (secuencia completa del VHB, fragmento del VHB, secuencia completa del VIH, fragmento del VIH, etc.).

50

Por acondicionamientos de una muestra, se define:

- al menos el lote de reactivos esencial para la ejecución de la reacción de amplificación y que acompaña a esta muestra en el medio de reacción, y
- el tratamiento al que se somete a la muestra después de la extracción hasta la determinación del parámetro F_0 .

La forma de la recta REG y por tanto de las constantes a y b, depende sensiblemente del formato biológico de la muestra a analizar.

La solicitante ha descubierto de manera sorprendente que las rectas de regresión establecidas utilizando la magnitud F_0 muestran una baja inter-variabilidad de las magnitudes a y b cuando el formato biológico de diferentes muestras es idéntico. Esta estabilidad está relacionada con el parámetro F_0 .

En la siguiente descripción se hace referencia a las muestras patrón anteriormente mencionadas como muestras de referencia. Una muestra de referencia es por tanto: cualquier muestra del mismo formato biológico que la muestra de interés y en la que se conoce la concentración inicial de los ácidos nucleicos de una secuencia diana. Una muestra de referencia en el sentido de la invención comprende una o varias secuencias de la misma naturaleza biológica que la o las secuencias diana a cuantificar. Además, las muestras de referencia comprenden un lote de reactivos idéntico al de la muestra de interés, y después de la extracción se someten sensiblemente al mismo tratamiento para la determinación del parámetro F_0 (mismo acondicionamiento - véase más arriba).

La distinción hecha entre las muestras de referencia (utilizadas para la invención) y las muestras patrón (como las utilizadas para el procedimiento Ct) principalmente tiene por objeto precisar que el operario que manipula las muestras de referencia es de identidad diferente del que manipula las muestras patrón. En efecto, de la siguiente descripción se deduce que toda manipulación de la muestra de referencia tiene lugar en la fábrica / industria y no por parte del usuario final de la invención.

De manera más general, la solicitante ha descubierto que para la cuantificación de una secuencia diana de un formato biológico dado basta con establecer una curva patrón REG que comporte una relación entre una magnitud física representativa del tamaño inicial de una población y la concentración conocida de al menos dos muestras de referencia. En el modo de realización descrito, la curva patrón cumple una ley lineal. Utilizando una ley de conversión, la pendiente y la ordenada en el origen (parámetros de referencia) de esta curva permiten en una etapa posterior o conjunta la determinación del tamaño inicial de la o las secuencias diana.

Una determinación de las magnitudes a y b así como de una determinación de la concentración inicial de una secuencia diana se proporcionan a continuación en un ejemplo de realización. Antes de eso, se definen un cierto número de términos utilizados en la siguiente descripción.

En el modo de realización se describe a continuación, la muestra de interés comprende unos ácidos nucleicos extraídos y aislados por extracción / purificación a partir de una muestra de suero o de plasma humano. El o los ácidos nucleicos a cuantificar (también denominados secuencia(s) diana, o incluso secuencia(s) diana de interés) son por ejemplo el ADN genómico de un virus. La o las secuencias diana se amplifican y se cuantifican por la PCR en tiempo real. En los ejemplos descritos, se trata más concretamente de ADN genómico del virus de la hepatitis B (VHB) cuyo tamaño es de aproximadamente 3,2 kb. Naturalmente, la invención no está limitada de ningún modo por este ejemplo.

Por Control interno (IC) se entiende, en el ejemplo de realización descrito, un fragmento amplificado de ADN genómico de un organismo vegetal de tamaño conocido en el que la secuencia es heteróloga a la de la secuencia diana presente en la muestra a analizar. El control interno se añade a las muestras de interés y al control negativo (definido más adelante) desde el comienzo de la extracción. Se amplifica conjuntamente con la secuencia diana. El control interno permite, por una parte, garantizar que la extracción se desarrolle de manera satisfactoria, y por otra, controlar la ausencia de inhibidor en las muestras de interés. Con este propósito, debe tenerse en cuenta que el tamaño, el porcentaje de GC (guanina / citosina), y la eficiencia de la reacción de amplificación, son sensiblemente idénticos a los de la secuencia diana. En el modo de realización descrito, el IC se diluyó en una disolución tampón TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,5 mM) a pH 8,3 y de Proclin™ 300. La puesta en práctica de la invención no requiere que se tenga en cuenta la presencia del IC, debido a que no tiene ningún impacto sobre la amplificación de la secuencia diana.

Paralelamente a la amplificación de la secuencia diana de interés, se puede utilizar un control positivo (CP) para verificar el buen funcionamiento de los reactivos específicos para la amplificación de dicha secuencia diana a cuantificar. De una manera general, los reactivos en la mezcla de reacción que contienen el control positivo son sensiblemente idénticos a los de la muestra de interés. En particular, los cebadores son específicos tanto para la secuencia diana como para el control positivo.

En el marco de un modo particular de realización, el control positivo también se puede utilizar como calibrador único (detallado más adelante) si se considera necesario para la cuantificación de la muestra de interés. Este calibrador se denomina EQC (calibrador cuantitativo externo, en inglés "External Quantitative Calibrator").

En el ejemplo de realización descrito en el presente documento, el control positivo o EQC consta de un

5 fragmento amplificado de ADN genómico del virus de la hepatitis B (VHB) en el que tanto la cantidad inicial como el intervalo de confianza del parámetro F_0 son conocidos. El tamaño así como la secuencia del EQC son iguales a las de la secuencia diana de interés. Se amplificó con una eficiencia sensiblemente idéntica a la de la secuencia diana en la muestra de interés. Se trata de un calibrador externo que no se amplifica conjuntamente con las muestras de interés, sino en paralelo a ellas. El control positivo o EQC por tanto permite por una parte validar los reactivos específicos de la PCR de la muestra de interés y por otra puede servir, según un segundo modo de realización de la invención, de calibrador para el procedimiento de medición de la cantidad de ácidos nucleicos (detallado más adelante). En el modo de realización descrito, el control positivo / EQC se diluye en el tampón TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,5 mM), pH 8,3. Según otros modos de realización no descritos en el presente documento, el control positivo / EQC se puede diluir en el plasma, en suero o en otro líquido.

10 Obviamente, la mezcla de reacción puede estar acompañada por algún tipo de control que permita valorar la reacción de amplificación. Dicho control puede ser por ejemplo un control negativo (NC). En el ejemplo de realización descrito, el control negativo es una muestra de plasma humano desfibrinilado negativo para ADN genómico del VHB que contiene Proclin™ 300. Es decir, negativo para la secuencia diana de interés del ejemplo de realización. Este control negativo se añade a cada serie de extracción de los ácidos nucleicos a partir de las muestras de interés y sigue el mismo tratamiento de amplificación que esa muestra, a saber, el proceso de extracción / purificación y la PCR en tiempo real. En general, un control negativo permite garantizar la ausencia de contaminación en las muestras de interés. Tales contaminaciones pueden producirse durante la fase de extracción o durante la preparación de la PCR en tiempo real. Además, junto con el control interno, el control negativo permite controlar la validez de los reactivos de la PCR específicos para el IC.

15 Como se ha indicado anteriormente, el modo de realización descrito en el presente documento se basa en el principio de que la fluorescencia de una muestra de interés, y más específicamente de una muestra de interés reactiva es proporcional a la cantidad de una o varias secuencias diana presentes en esa muestra, y tanto antes como durante la reacción de amplificación. Esta observación se pondrá de manifiesto a la luz de los ejemplos de realización no limitativos que se describen a continuación.

EJEMPLOS

25 La extracción / purificación así como la reacción de amplificación aplicada a las muestras de referencia y de interés (PCR en tiempo real) se realizaron según un modo convencional en la materia y de manera sensiblemente idéntica. A continuación se describe el protocolo experimental utilizado.

30 **I. Protocolo experimental**

I-1. Muestras de referencia

Accurun 325 Control positivo de ADN del virus de la hepatitis B - Serie 700 (BBI Diagnostic - Seracare, referencia A325-5723).

I-2. Extracción y purificación de ácidos nucleicos

35 La muestra Accurun se diluyó en plasma humano negativo para la presencia del VHB con el fin de proporcionar una gama de muestras de referencia de diferentes concentraciones de ácidos nucleicos de la secuencia diana.

Cada punto de dilución se extrae en presencia de IC (cuya concentración es de 300 copias / PCR).

El ADN vírico del VHB se extrae con ayuda del kit QIAamp DSP Virus (QIAGEN, referencia 60704) según el protocolo del kit.

40 I-3. Reacción de amplificación: PCR en tiempo real.

- *Secuencias de oligonucleotídicos utilizadas*

		Secuencias de los cebadores y de las sondas
Sistema VHB	Cebador 1	5' - GCT GAA TCC CGC GGA CGA - 3'
	Cebador 2	5' - GTG CAG AGG TGA AGC GAA GTG - 3'
	Sonda 1	5' FAM - CGG CAG GAG TCC GCG TAA AGA GAG GTG TGC CG -Dabcyl 3'
Sistema IC	Cebador 3	5' - GAG CCG CAG ATC CGA GCT A - 3'
	Cebador 4	5' - GGA GTG GAA CAT AGC CGT GGT C - 3'
	Sonda 2	5' Atto647N - TGC TGC GTC CTC CGC CGC CAC CGC TTG GGC AGC A -Dabcyl 3'

- Mezcla de referencia:

Multiplex VHB / FAM-Dabcyl IC / Atto647N Dabcyl

5 0,6 µM de la sonda Molecular Beacon VHB (Eurogentec), 0,6 µM de los 2 cebadores VHB, 0,2 µM de la sonda Molecular Beacon IC (Eurogentec), 0,3 µM de los 2 cebadores IC, 2,5 U de la HotStarTaq polimerasa (QIAGEN, referencia 203205), MgCl₂ 6 mM, d(ACGU)TP 200 µM, dTTP 100 µM, 0,25 U de UDG, PVP al 0,3 %, glicerol al 5 %.

- Perfil térmico en el aparato de amplificación (Chromo4):

30 min a 42°C
15 min a 95°C

 15 s a 95°C }
 30 s a 55°C } **50X**
 30 s a 72°C }

20°C

1-4. Interpretación de los resultados.

10 Para cada muestra (muestras de referencia o muestras de interés), el parámetro F₀ se determina según el procedimiento de la patente EP 1700 245.

II. Ejemplos

II-1. Establecimiento de una curva patrón a partir de una gama de muestras de referencia utilizando la magnitud F₀.

15 En la Figura 5 se representa una recta patrón, establecida a escala logarítmica, en la que aparece la magnitud física F₀ (fluorescencia antes de cualquier ciclo de amplificación) en función de la concentración de una secuencia diana de muestras de referencia. Los puntos de referencia que sirven para establecer esta recta son los puntos de una gama de las muestras de referencia de concentraciones iniciales conocidas expresadas en UI / PCR (Unidades Internacionales / volumen de reacción) y cuya magnitud F₀ se calculó de acuerdo con el procedimiento de la patente EP1700245 (véase protocolo experimental más arriba).

20 En aras de la precisión, se procede a la determinación de F₀ para 2 réplicas del VHB por punto de concentración (columnas "Réplica 1" y "Réplica 2" de la Tabla I).

La Tabla I siguiente muestra estos valores.

Tabla I

Número de UI ADN VHB / PCR	F ₀ VHB			
	Réplica 1	Réplica 2	Media F ₀	Desviación estándar F ₀
1·10⁵	4,15E-09	3,44E-09	3,79E-09	4,99E-10
1·10⁴	1,65E-10	1,53E-10	1,59E-10	8,58E-12
1000	1,09E-11	9,56E-12	1,02E-11	9,46E-13
100	7,08E-13	5,47E-13	6,28E-13	1,14E-13
10	6,23E-14	6,47E-14	6,35E-14	1,71E-15

25 Por lo tanto, en primer lugar se tiene que, antes de la determinación de la cantidad inicial de ácidos nucleicos de la secuencia diana presente en la muestra de interés, es necesario establecer una curva patrón a partir de al menos dos muestras de referencia en formato biológico idéntico al de dicha muestra de interés y de concentraciones iniciales de ácidos nucleicos conocidas. A partir de la curva patrón y, más específicamente, de la recta patrón en este ejemplo se pueden determinar la ordenada en el origen y la pendiente (parámetros de referencia a y b) por los medios clásicos

conocidos por la persona experta en la materia.

Como se ha descrito en el protocolo experimental, estas mediciones han sido acompañadas por un control interno IC con el fin de validar los reactivos y de controlar la etapa de extracción así como la ausencia de inhibidor. II-2. Determinación de los parámetros de referencia a y b.

5 Para una determinación precisa de a y b, es decir, la ordenada en el origen (o intercepción) y la pendiente, respectivamente, se analizaron una multitud de gamas de muestras de referencia. Obviamente, la invención se puede realizar sin este afinado. Sin embargo, en el presente ejemplo de realización ejemplar, 22 gamas de muestras de referencia sirven para establecer:

- un valor mediana de a, y

10 - un valor mediana de b.

Tabla II

Gama de muestras de referencia	Intercepción en UI / ml (a)	Pendiente (b)
Gama 1	-14,989	1,112
Gama 2	-15,445	1,220
Gama 3	-15,234	1,188
Gama 4	-15,159	1,169
Gama 5	-15,258	1,204
Gama 6	-15,324	1,196
Gama 7	-15,582	1,245
Gama 8	-15,836	1,295
Gama 9	-15,449	1,222
Gama 10	-15,538	1,229
Gama 11	-15,452	1,226
Gama 12	-14,803	1,052
Gama 13	-15,075	1,139
Gama 14	-14,907	1,103
Gama 15	-15,031	1,151
Gama 16	-15,151	1,185
Gama 17	-15,113	1,135
Gama 18	-14,889	1,091
Gama 19	-14,742	1,065
Gama 20	-15,185	1,136
Gama 21	-15,337	1,181
Gama 22	-14,717	1,029

De la Tabla II se desprende que la variabilidad de los valores a y b (inter-variabilidad) entre las diferentes gamas de muestras de referencia es baja, en razón principalmente de la fiabilidad y estabilidad de la magnitud F_0 .

15 A partir de la mediana, así como de la pendiente y de la ordenada en el origen, se calculan respectivamente los valores de a y b (véase Tabla III). Recordamos aquí que para cada muestra de referencia, se trata de un formato biológico idéntico al de la muestra de interés. Para una muestra de interés de un formato biológico dado, a y b son por tanto unas magnitudes fijas para un lote de reactivos dado. Nótese que para el establecimiento de a y b se puede utilizar cualquier valor estadístico representativo del conjunto de mediciones, tal como por ejemplo la media (véase Tabla III).

Tabla III

Intercepción (a)			Pendiente (b)		
Media	Mediana	Desviación estándar	Media	Mediana	Desviación estándar
-15,192	-15,172	0,29	1,163	1,175	0,07

5 Los valores que figuran en las Tablas II y III muestran la baja variabilidad de a y b. La cuantificación de la población inicial N_0 en una muestra de interés se puede llevar a cabo a partir de la fórmula F2, deducida de la fórmula F1:

$$N_0 = 10^{\lceil \log(F_0) - a \rceil / b} \quad (F2)$$

Así, partiendo de una fuente de muestra similar a una muestra de interés, pero de concentración inicial conocida (en lo sucesivo denominada muestra de ensayo), se puede verificar la exactitud de la prueba de cuantificación según la invención.

10 II-3. Ejemplo 1 - Cuantificación de tres muestras de ensayo distintas.

En este ejemplo, la muestra Accurun 325 control positivo de ADN del virus de la hepatitis B - Serie 700 (BBI Diagnostic, referencia A325-5723) se diluyó a tres concentraciones diferentes (muestras de ensayo A, B y C) en plasma humano negativo para la presencia del VHB. Las tres muestras de ensayo tienen una concentración inicial conocida de la secuencia diana (véase Tabla IV).

15 Los ácidos nucleicos de las muestras de ensayo se extrajeron y se purificaron en presencia de IC, utilizando el kit QIAamp DSP Virus (QIAGEN, referencia 60704) según el protocolo del kit. Las muestras de ensayo se sometieron a un tratamiento de amplificación con el mismo lote de reactivos que el utilizado para calcular los parámetros a y b en el ejemplo anterior.

II-3.a) Medición de los valores F_0 de tres muestras de ensayo.

20

Tabla IV

Muestra	F_0 VHB			
	Réplica 1	Réplica 2	Media F_0	Desviación estándar F_0
NC 0 UI / ml	0	0	0	0
Ensayo A 19,1 UI / ml	4,15E-14	2,00E-14	3,08E-14	1,52E-14
Ensayo B 1,91·10 ³ UI / ml	3,28E-12	4,05E-12	3,67E-12	5,45E-13
Ensayo C 1,91·10 ⁵ UI / ml	8,85E-10	1,12E-09	1,00E-09	1,67E-10

II3.b) Cuantificación

25 Los parámetros a y b para la cepa VHB del ejemplo de realización anterior presentan los valores -15,172 y 1,175, respectivamente (valor de la mediana, véase Tabla III). Utilizando los parámetros de referencia (a y b) en la fórmula F2, se determinan / verifican las concentraciones iniciales. Los resultados figuran en la Tabla V y muestran que la cuantificación de estos valores es muy satisfactoria (error de cuantificación inferior a un factor de dos).

Tabla V

Muestras	Log UI / ml		Media Log (UI / ml)	Número UI / ml		Media UI / ml	Desviación estándar UI / ml
NC 0 UI / ml	-	-	-	-	-	-	-
Ensayo A 19,1 UI / ml	1,524	1,254	1,389	33	18	26	11
Ensayo B 1,91·10 ³ UI / ml	3,138	3,216	3,177	1375	1645	1510	191
Ensayo C 1,91·10 ⁵ UI / ml	5,206	5,294	5,250	1,61E + 05	1,97E + 05	1,79E + 05	2,53E + 04

II-4. Ejemplo 2 - Ejemplo comparativo de cuantificación de un Patrón Internacional VHB (Patrón Internacional: *WHO patrón internacional para técnicas de amplificación de ácidos nucleicos ADN del HBV 97 / 746*).

- 5 Se trata de un ejemplo comparativo entre la determinación de la población inicial de una secuencia diana presente en una muestra de interés según el procedimiento Ct, por una parte, y el procedimiento según la invención por la otra. Los parámetros a y b determinados en el ejemplo anterior se utilizaron para la determinación de la población inicial. El ejemplo se basa en la utilización del patrón internacional denominado WHO (*WHO patrón internacional para técnicas de amplificación de ácidos nucleicos ADN del HBV 97 / 746*).
- 10 Se llevaron a cabo dos series de diluciones en escala semi-logarítmica del patrón internacional WHO en plasma humano negativo para la presencia del VHB. Cada punto de dilución se extrajo / purificó en presencia de IC, con ayuda del kit QIAamp DSP Virus (QIAGEN, referencia 60704) según el protocolo del kit. Cada extracto se amplificó por la PCR en tiempo real por duplicado.
- 15 De manera similar al Ejemplo 1, para cada muestra de interés se determinaron los valores de F₀. A continuación, a partir de la fórmula F2, se llevó a cabo la cuantificación de la secuencia diana contenida en cada muestra. En la Tabla VI figuran los resultados de las cuantificaciones expresados en escala logarítmica.

Tabla VI

	<i>Procedimiento Ct</i>				<i>Procedimiento según la invención</i>			
	Patrón internacional UI / ml [log]				Patrón internacional UI / ml [log]			
	Valores teóricos	Valores experimentales	Media	Delta de cuantificación	Valores teóricos	Valores experimentales	Media	Delta de cuantificación
1ª serie	6	6,184	6,168	0,168	6	6,239	6,174	0,174
	6	6,268			6	6,239		
2ª serie	6	6,203			6	6,19		
	6	6,016			6	6,158		
1ª serie	5,5	5,606	5,593	0,093	5,5	5,618	5,593	0,093
	5,5	5,597			5,5	5,604		
2ª serie	5,5	5,543			5,5	5,596		
	5,5	5,63			5,5	5,564		
1ª serie	5	4,991	5,023	0,023	5	5,044	5,001	0,001
	5	5,107			5	5,063		
2ª serie	5	5,065			5	4,974		
	5	4,931			5	4,924		
1ª serie	4,5	4,465	4,525	0,025	4,5	4,456	4,512	0,012
	4,5	4,576			4,5	4,569		
2ª serie	4,5	4,43			4,5	4,454		
	4,5	4,631			4,5	4,569		
1ª serie	4	3,877	3,86	-0,14	4	3,932	3,908	-0,092
	4	3,919			4	3,982		
2ª serie	4	3,749			4	3,869		
	4	3,896			4	3,851		
1ª serie	3,5	3,474	3,403	-0,097	3,5	3,521	3,43	-0,07
	3,5	3,388			3,5	3,49		
2ª serie	3,5	3,343			3,5	3,353		
	3,5	3,409			3,5	3,354		
1ª serie	3	3,07	2,989	-0,011	3	3,099	3,052	0,052

ES 2 380 278 T3

	3	2,94			3	3,094		
2ª serie	3	2,959			3	3,002		
	3	2,987			3	3,012		
1ª serie	2,5	2,327	2,284	-0,216	2,5	2,581	2,511	0,011
	2,5	2,213			2,5	2,475		
2ª serie	2,5	2,252			2,5	2,47		
	2,5	2,341			2,5	2,517		
1ª serie	2	1,98	1,91	-0,09	2	2,263	2,174	0,174
	2	1,868			2	2,132		
2ª serie	2	1,854			2	2,122		
	2	1,938			- 2	2,178		
1ª serie	1,5	1,417	1,379	-0,121	1,5	1,793	1,767	0,267
	1,5	1,417			1,5	1,775		
2ª serie	1,5	1,292			1,5	1,681		
	1,5	1,39			1,5	1,819		
1ª serie	1	1,089	0,714	-0,286	1	1,396	1,128	0,128
	1	0,413			1	0,997		
2ª serie	1	- 0,639			1	0,992		
	1				1			
1ª serie	0,5	-0,199	-0,199	-0,699	0,5	0,727	0,727	0,227
	0,5				0,5			
2ª serie	0,5				0,5			
	0,5				0,5			

Las Figuras 7 y 8 muestran la exactitud, respectivamente, del procedimiento Ct y del procedimiento según la invención, con los valores teóricos en las abscisas (en Log UI / ml) y con los valores experimentales en las ordenadas (en Log UI / ml). Las ecuaciones de las rectas de las Figuras 7 y 8 son, respectivamente:

5 $y = -0,2966 + 1,0682x$; para el procedimiento Ct, y

$y = 0,1305 + 0,983x$; para el procedimiento de la invención.

La cuantificación según la invención es equivalente, en términos de precisión, al procedimiento Ct, y presenta todas las ventajas enumeradas en la presente descripción, y en particular la simplicidad de cuantificación gracias al parámetro F_0 .

II-4. Ejemplo 3 - Cuantificación de muestras clínicas.

Se analizaron 25 muestras clínicas provenientes de pacientes infectados por el VHB, previamente cuantificadas por un kit comercial de cuantificación del virus de la hepatitis B (kit que utiliza el procedimiento Ct), mediante el procedimiento de cuantificación de la invención. La extracción, la purificación y el tratamiento de amplificación se llevaron a cabo según el protocolo experimental descrito anteriormente.

Cada secuencia diana en cada una de las muestras clínicas se amplificó con el mismo lote de reactivos que el utilizado para determinar los parámetros a y b en los ejemplos precedentes.

De manera similar al Ejemplo 1, se determinaron los valores de F_0 para cada muestra de interés. A continuación, a partir de la fórmula F2, se realizó la cuantificación de la población inicial de las muestras. En la Tabla VII figuran los resultados de las cuantificaciones.

Muestras clínicas					
N° de muestras	Cuantificación <i>Roche Cobas TaqMan</i>		Cuantificación según la invención		
	Log UI / ml	UI / ml	F_0 VHB	Log UI / ml	UI / ml
1	1,362	23	5,10E-14	1,600	40
2	3,856	7176	1,41E-11	3,676	4744
3	3,268	1855	3,20E-12	3,129	1345
4	3,403	2530	6,05E-12	3,364	2314
5	2,312	205	3,20E-13	2,277	189
6	2,509	323	4,88E-13	2,434	271
7	2,938	866	1,31E-12	2,798	628
8	2,303	201	2,99E-13	2,253	179
9	2,620	417	6,52E-13	2,541	347
10	3,561	3637	1,40E-11	3,674	4726
11	2,958	908	3,46E-12	3,157	1436
12	2,149	141	2,51E-13	2,188	154
13	4,111	12915	3,98E-11	4,060	11479
14	3,208	1613	1,85E-12	2,927	845
15	3,410	2572	5,75E-12	3,346	2216
16	4,098	12528	3,16E-11	3,975	9432
17	3,548	3533	5,03E-12	3,296	1976
18	2,923	838	2,57E-12	3,048	1117
19	3,719	5231	8,26E-12	3,479	3016
20	2,286	193	1,43E-13	1,981	96
21	2,959	910	2,27E-12	3,001	1003
22	5,282	191392	2,30E-09	5,559	362265
23	2,773	593	1,43E-12	2,832	679
24	2,624	421	7,22E-13	2,578	379
25	2,407	255	4,66E-13	2,417	261

5 Los resultados obtenidos según el procedimiento de la invención en muestras clínicas son equivalentes a las cuantificaciones obtenidas con un kit comercial de referencia, mientras presenta las ventajas resultantes del procedimiento de la invención. El ejemplo anterior destaca que la invención responde a las exigencias reglamentarias y a la alta precisión de cuantificación requerida por las pruebas médicas, tales como la cuantificación de ácidos nucleicos víricos en una muestra procedente de un paciente.

10 Los ejemplos precedentes ilustran la simplicidad para un operario final para realizar una cuantificación de una población de ácidos nucleicos mediante el procedimiento de la invención. De hecho, al menos dos etapas, a saber, el establecimiento de una curva patrón y la determinación de los parámetros constantes de la ecuación de la curva patrón, se ejecutan en la fábrica / industria y se pre-registran en un aparato de PCR según la invención. Así, el operario final se beneficiará de una simplicidad de utilización para poner en práctica la cuantificación de una o varias secuencias diana presentes en una muestra de interés. Principalmente y gracias a los parámetros pre-registrados, el operario eludirá las dos etapas citadas anteriormente. Así se gana tiempo en relación con los procedimientos de la técnica anterior. Además, los ejemplos demuestran claramente la robustez del procedimiento. Esta robustez es debida a la utilización de F_0 .

15 En la práctica, el operario sólo tiene que someter la muestra de interés al tratamiento de amplificación, es decir, extracción / purificación de los ácidos nucleicos de la muestra de interés en bruto para obtener una muestra de interés extraída, y a continuación añadir a esta última un lote de reactivos para obtener una muestra de interés reactiva y, finalmente, introducir la muestra de interés reactiva en una unidad de soporte de un aparato de amplificación. El aparato de amplificación determinará el valor de F_0 (según el procedimiento descrito en la patente EP1700245) y utilizando este valor F_0 y junto con los parámetros pre-registrados (constantes de la ecuación de la curva patrón) determinará por sí solo la cantidad inicial de ácidos nucleicos de una o varias secuencias diana presentes en la muestra de interés. Todo esto supone que la invención presente un gran interés económico.

20 Naturalmente, los valores de a y b variarán en función de la naturaleza biológica de la secuencia diana. Como se ha detallado anteriormente, estos valores varían igualmente en función del lote de reactivos aplicado a la muestra de interés para la realización de la reacción de amplificación. Sin embargo, para un lote de reactivos determinado, los valores a y b son estables en el tiempo durante toda la duración de la validez del lote, es decir, hasta su fecha de caducidad. Esto es sinónimo de una elevada fiabilidad para el operario final.

Más generalmente, los valores de a y b son independientes:

- 30 - del aparato utilizado para el tratamiento de amplificación, (en particular de un mismo modelo comercial),
- del tipo de aparato utilizado, (por lo que se puede utilizar cualquier tipo de modelo comercial, incluyendo el aparato denominado "Cromo 4" de la empresa Bio-Rad o el aparato denominado "Light Cycler" de la empresa Roche,
- del lugar de manipulación (transportabilidad del aparato),
- del operario que realiza las manipulaciones técnicas,
- 35 - de la validez del lote de reactivos,
- de los componentes individuales utilizados en el lote de reactivos (por lo que se puede utilizar cualquier tipo de polimerasa, dNTPs, etc.),
- del modo de extracción de los ácidos nucleicos de la secuencia diana.

40 La utilización de la relación entre F_0 y N_0 parece ser la causa de la baja variabilidad y de la estabilidad de los valores a y b.

Gracias a estas ventajas y a la precisión de la cuantificación, la invención responde a las exigencias reglamentarias requeridas para las pruebas médicas, tales como la cuantificación de ácidos nucleicos víricos en una muestra de interés procedente de un paciente.

45 Según este primer modo de realización de la invención y contrariamente a la técnica anterior, no habrá necesidad de que el operario utilice una gama de patrones para la determinación de la población inicial de la muestra de interés a cuantificar. De hecho, gracias a estos parámetros de referencia pre-determinados y pre-registrados, en particular a a y b en los ejemplos de realización, para un formato biológico dado se determina la población inicial de una muestra.

50 Según otro modo de realización, para efectuar una corrección de los parámetros de referencia pre-registrados, se puede utilizar un solo calibrador o EQC (calibrador externo), que puede ser el control positivo, cuando dichos

parámetros presentan una variabilidad de la precisión de la determinación de la población inicial.

La corrección utiliza el parámetro F_0 . Específicamente, en una etapa previa a la etapa de estimación del tamaño inicial de la población de interés, se determina el valor F_0 (en lo sucesivo F_0^{EQC}) del EQC. Esta determinación tiene lugar, por tanto, antes de la aplicación de dicha ley de conversión.

5 A continuación se procede a una simple medición comparativa entre el valor de F_0 del EQC medido en el aparato (en lo sucesivo: $F_0^{EQC\text{medido}}$), y el valor F_0^{EQC} conocido en un intervalo de confianza determinado en la fábrica / industria. A continuación se puede establecer una relación correctora de la proporcionalidad para nivelar la diferencia de los valores. Los parámetros contextuales en la etapa d. del procedimiento de la invención pueden comportar, por tanto, los parámetros de corrección.

10 En unos modos alternativos de realización, la corrección puede basarse en otros coeficientes, con unas relaciones de proporcionalidad no-lineales.

De manera más general, será suficiente con determinar una magnitud física de referencia a partir de un calibrador, y de calibrar el aparato para esta magnitud.

15 El procedimiento anteriormente descrito se pone en práctica preferentemente con un único aparato equipado con unidades ensambladas o separadas capaces de realizar las etapas de dicho procedimiento y, en particular, capaces de realizar la amplificación de una o varias secuencias diana presentes en la muestra de interés como se ha descrito anteriormente.

20 En referencia a la Figura 6, en la que se representa de una manera esquemática y funcional un aparato AP para cuantificar una población inicial de una muestra de interés. Este aparato AP comprende una unidad de soporte U.SUP capaz de recibir al menos una muestra de interés reactiva PROBE. Esta muestra PROBE se somete a un tratamiento de amplificación que comprende aplicaciones sucesivas de una reacción de amplificación por medio de una unidad de amplificación U.AMP. La unidad de amplificación U.AMP puede estar equipada con medios de calentamiento (no mostrado) para aplicar una reacción de amplificación (como la PCR en tiempo real) durante la cual se hace el seguimiento de la cinética de reacción, a la muestra de reacción PROBE y, más específicamente, a al menos una secuencia diana presente en la muestra de reacción PROBE. Con este propósito, el aparato AP comprende una unidad de medición U.MES para medir una magnitud física representativa de la evolución de al menos un marcador presente en la muestra de interés reactiva. El o los marcadores son, respectivamente, específicos para la o las secuencias diana. Esta magnitud física es preferentemente la fluorescencia. Además, el aparato está equipado con una unidad de procesamiento U-TRT que está organizada para calcular el parámetro F_0 (según el procedimiento de la patente EP1700245) y estimar la población inicial de ácidos nucleicos en la muestra de interés. La unidad de procesamiento U-TRT puede ser un ordenador. La unidad de procesamiento U-TRT está dotada de una memoria capaz de almacenar datos informáticos (memoria permanente, de acceso aleatorio o RAM). Los datos informáticos pueden incluir, en particular, instrucciones para la aplicación del procedimiento de cuantificación de la invención. Opcionalmente, la unidad de procesamiento U-TRT puede estar provista de medios de transferencia de datos aptos para la introducción de un medio de almacenamiento (tales como: disquete, CD-ROM, memoria USB). Por tanto la unidad de procesamiento U-TRT se puede actualizar. La aplicación de la unidad de amplificación U.AMP y la unidad de medición U.MES para la muestra de interés reactiva PROBE recibida sobre el elemento de soporte, y que hace una llamada a la unidad de tratamiento U-TRT, es producido por un controlador CNTR. La función del controlador CNTR puede ser dirigido por un ordenador o por un operario.

40 La invención se refiere igualmente a un medio de almacenamiento de datos capaz de cooperar con la unidad de procesamiento U-TRT y que comprende las instrucciones para la puesta en práctica del procedimiento de cuantificación de la invención.

45 La invención se ha descrito anteriormente con referencia a la PCR en tiempo real. No se limita a esta técnica y podría aplicarse a otros medios de amplificación de ácidos nucleicos. Por ejemplo, podría aplicarse a la LRC. Específicamente se utilizará cualquier técnica de amplificación siempre que sea posible seguir la variación del rendimiento de la reacción correspondiente a esta amplificación.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de medición de la cantidad de ácidos nucleicos de una secuencia diana en una muestra de interés, que comprende las etapas de:
- 5 a. someter la muestra de interés a un tratamiento de amplificación, con un lote de reactivos que comprenden al menos un marcador de ácido(s) nucleico(s) específico para dicha secuencia diana, dicho tratamiento de amplificación que comprende ciclos de amplificación sucesivos, i ; de 1 a n ,
- b. medir una magnitud física F_i representativa de la evolución del marcador durante al menos una parte de los ciclos de amplificación,
- 10 c. expresar un parámetro F_0 representativo de la magnitud física del marcador de ácido(s) nucleico(s) antes de cualquier ciclo de amplificación, utilizando las mediciones llevadas a cabo en la etapa b.,
- d. estimar el número inicial $N_0^{mues.}$ de ácido(s) nucleico(s) de la secuencia diana utilizando una ley de conversión, que comprende parámetros contextuales, y aplicada a dicho parámetro F_0 expresado en la etapa c.,
- caracterizado porque:**
- 15 - en la etapa d., dichos parámetros contextuales son unos parámetros de referencia pre-registrados, siendo estos parámetros sensiblemente independientes de al menos una parte de las condiciones experimentales, y estando determinados de antemano a partir del comportamiento de al menos una muestra de referencia del mismo formato biológico que la muestra de interés y el número inicial conocido N_0^{ref} de ácido(s) nucleico(s).
2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado porque** la ley de conversión en la etapa d. se aplica directamente, sin la necesidad de corrección por la ejecución en paralelo de las etapas a., b. y c. para al menos un calibrador.
3. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado porque** la etapa d. comprende además una corrección del número inicial estimado $N_0^{mues.}$, estando esta corrección basada en una ejecución de antemano de las etapas a., b. y c. para al menos un calibrador EQC de número inicial conocido de ácido(s) nucleico(s) y del parámetro conocido F_0^{EQC} representativo de la magnitud física del marcador de ácido(s) nucleico(s) antes de cualquier ciclo de amplificación.
- 25 4. Procedimiento según la reivindicación 3, **caracterizado porque** la corrección del número inicial estimado $N_0^{mues.}$ comprende las etapas de:
- establecer una ley correctora entre:
- 30 • dicho parámetro conocido N_0^{EQC} representativo de la magnitud física del marcador de ácido(s) nucleico(s) antes de cada ciclo de amplificación, en primer lugar y,
- el parámetro efectivamente expresado $N_0^{EQCmedido}$ representativo de la magnitud física del marcador de ácido(s) nucleico(s) antes de cada ciclo de amplificación del calibrador,
- aplicar dicha ley correctora a la citada ley de conversión que comprende los parámetros contextuales de la etapa d., con el fin de estimar dicho número inicial $N_0^{mues.}$ de ácido(s) nucleico(s) en la secuencia diana, presente(s) en la muestra de interés.
- 35 5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 4, **caracterizado porque** dicho calibrador EQC de número inicial conocido se basa en una sustancia biológica capaz de formar un control positivo para la muestra de interés.
6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** la expresión del parámetro F_0 hace intervenir al menos:
- 40 - un parámetro relativo al basculamiento entre una primera fase de rendimiento de amplificación constante y una segunda fase de rendimiento de amplificación no constante,
- un parámetro relativo al rendimiento de amplificación constante durante dicha primera fase, y
- un parámetro relativo al rendimiento de amplificación no constante durante dicha fase segunda.
- 45 7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** el marcador de ácidos nucleicos es un marcador fluorescente.

8. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** la muestra de interés comprende una extracción biológica, susceptible de comprender un agente patógeno.
9. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** la reacción de amplificación es una reacción en cadena de la polimerasa, PCR, en tiempo real.
- 5 10. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** dichos parámetros de referencia son independientes de al menos uno de los elementos del grupo de condiciones experimentales siguientes: aparato utilizado, tipo de aparato utilizado, operario, período de validez del lote de reactivos, modo de extracción de los ácidos nucleicos de la secuencia diana.
- 10 11. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** la muestra de interés comprende varias secuencias diana distintas.
12. Aparato (AP) para medir la cantidad de ácidos nucleicos de al menos una secuencia diana en una muestra de interés, que comprende:
- 15 a. un elemento de soporte (U.SUP) para soportar al menos una muestra (PROBE) que comprende un lote de reactivos y la secuencia diana con al menos un marcador de ácido(s) nucleico(s) específico para dicha secuencia diana,
- b. una unidad de amplificación (U.AMP) para someter la muestra de interés a un tratamiento de amplificación que comprende unos ciclos de amplificación sucesivos, i ; de 1 a n ,
- c. una unidad de medición (U.MES) para medir una magnitud física F_i representativa de la evolución de dicho marcador durante al menos una parte de los ciclos de amplificación,
- 20 d. una unidad de procesamiento (U.TRT) que comprende una memoria y organizada para:
- iii. expresar un parámetro F_0 representativo de la magnitud física del marcador de ácido(s) nucleico(s) antes de cualquiera de los ciclos de amplificación, sobre la base de mediciones de la magnitud física,
- iv. estimar el número inicial $N_0^{\text{mues.}}$ de ácido(s) nucleico(s) de una secuencia diana presente en la muestra de interés utilizando una ley de conversión, sobre la base de parámetros contextuales, y aplicada a dicho parámetro F_0 ,
- 25 e. un controlador (CNTR) organizado de tal manera que, cuando una muestra de interés (PROBE) es recibido en el elemento de soporte (U.SUP), para la aplicación de la unidad de amplificación (U.AMP) y la unidad de medición (U.MES) a dicha muestra (PROBE) recibida, y para hacer una llamada a la unidad de tratamiento (U.TRT) con las mediciones obtenidas por dicha unidad de medición (U.MES),
- 30 **caracterizado porque** dichos parámetros contextuales son unos parámetros de referencia sensiblemente independientes de al menos una parte de las condiciones experimentales y están pre-registrados en la unidad de tratamiento (U.TRT), y que se determinan de antemano a partir del comportamiento de al menos una muestra de referencia del mismo formato biológico que la muestra de interés y del número inicial conocido N_0^{ref} de ácido(s) nucleico(s).
- 35 13. Producto de programa de ordenador que comprende las instrucciones para la puesta en práctica del procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, y destinado a ser almacenado en la memoria de la unidad de tratamiento (U.TRT) en el aparato (AP), según la reivindicación 12.
14. Soporte para el almacenamiento de datos, **caracterizado porque** comprende las instrucciones para la puesta en práctica del procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

40

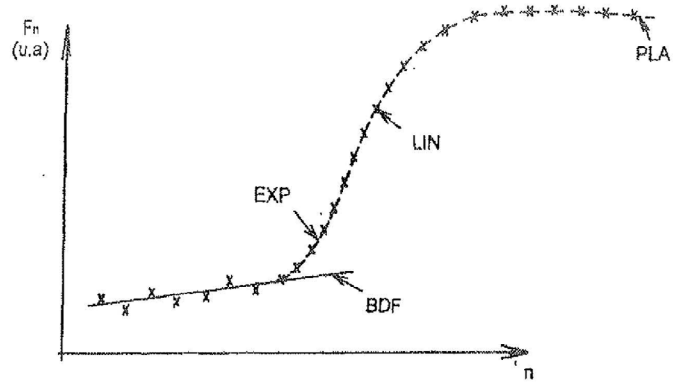


Figura 1

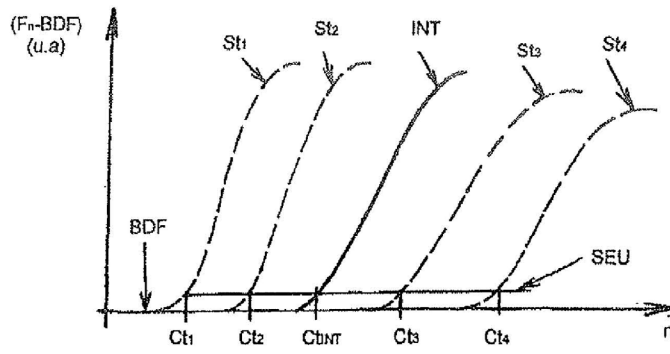


Figura 2

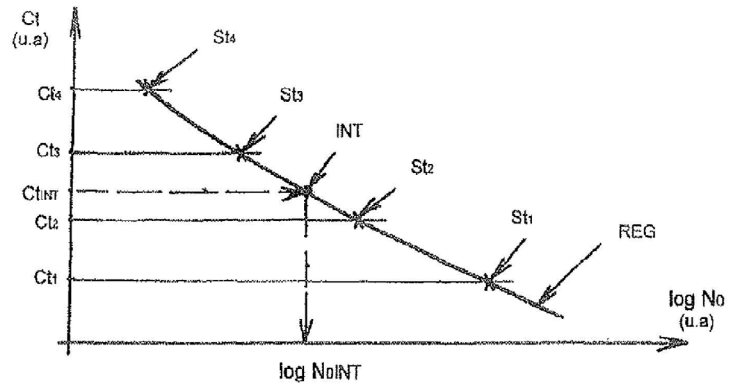


Figura 3

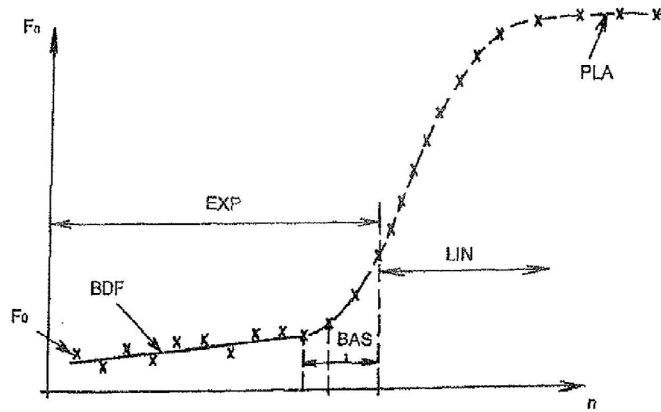


Figura 4

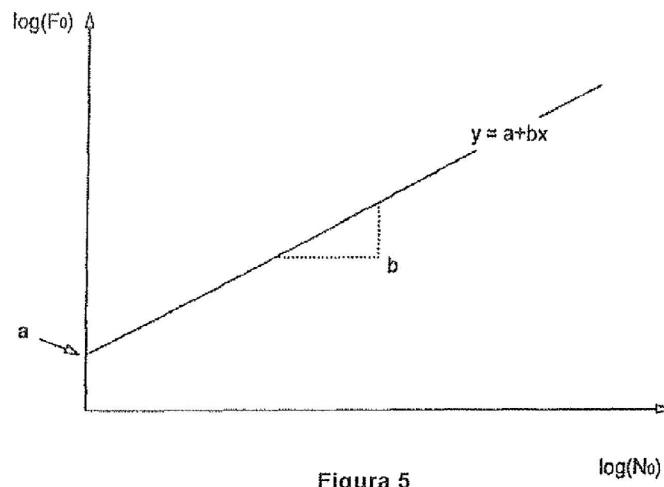


Figura 5

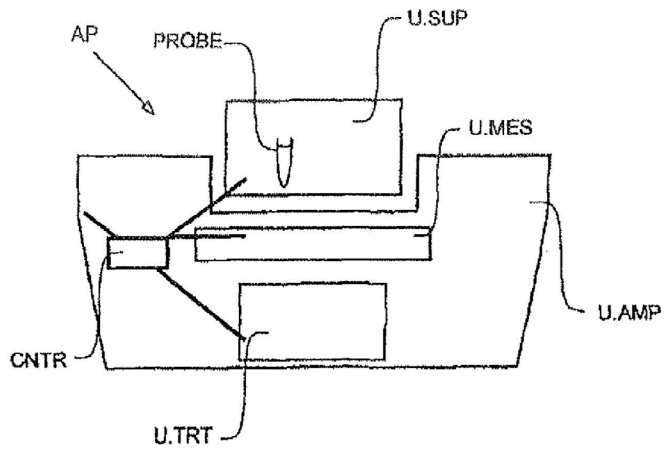


Figura 6

DOCUMENTOS INDICADOS EN LA DESCRIPCIÓN

En la lista de documentos indicados por el solicitante se ha recogido exclusivamente para información del lector, y no es parte constituyente del documento de patente europeo. Ha sido recopilada con el mayor cuidado; sin embargo, la EPA no asume ninguna responsabilidad por posibles errores u omisiones.

5 Documentos de patente indicados en la descripción

- US 5210015 A [0037]
- US 5487972 A [0037]
- US 5723591 A [0037]
- US 5118801 A [0037]
- US 5925517 A [0037]
- US 6150097 A [0037]
- EP 1700245 A [0050] [0052] [0061] [0090] [0114] [0126]
- EP 11700245 A [0051]
- EP 1700145 A [0089]

Literatura no citada en la descripción

- **R. G. Rutledge ; C. Côté.** Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic Acids Research*, 2003, vol. 31 (16 [0042])