

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 654 188**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**G06F 17/17** (2006.01)

**G06F 19/24** (2011.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.10.2013 PCT/EP2013/070413**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.04.2014 WO14053467**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.10.2013 E 13779153 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.08.2017 EP 2904110**

54 Título: **Procedimiento universal para determinar los valores de umbral del ciclo de PCR en tiempo real**

30 Prioridad:  
**02.10.2012 US 201213633813**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**12.02.2018**

73 Titular/es:  
**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)  
Grenzacherstrasse 124  
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:  
**KURNIK, RONALD T.**

74 Agente/Representante:  
**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

ES 2 654 188 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

Procedimiento universal para determinar los valores de umbral del ciclo de PCR en tiempo real

5 **Antecedentes**

La presente divulgación se refiere en general a sistemas y procedimientos para procesar datos que representan curvas sigmoideas o de crecimiento y, más en particular, a sistemas y procedimientos para determinar valores de umbral de ciclo (Ct) o de desviación característicos en curvas de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real, o valores de desviación en otras curvas de crecimiento.

La reacción en cadena de la polimerasa es un procedimiento *in vitro* para sintetizar o amplificar enzimáticamente secuencias definidas de ácidos nucleicos. La reacción usa típicamente dos cebadores oligonucleotídicos que hibridan con hebras opuestas y flanquean una secuencia de ADN de molde o diana que se va a amplificar. La elongación de los cebadores está catalizada por una ADN polimerasa termoestable. Una serie repetitiva de ciclos que implican desnaturalización del molde, hibridación del cebador y extensión de los cebadores hibridados por la polimerasa da como resultado una acumulación exponencial de un fragmento de ADN específico. En el procedimiento para facilitar la detección y la cuantificación del procedimiento de amplificación se usan típicamente sondas o marcadores fluorescentes.

En particular, son atractivas las técnicas de fluorescencia que son homogéneas y que no requieren la adición de reactivos después del comienzo de la amplificación o del muestreo físico de las reacciones para el análisis. Las técnicas homogéneas ejemplares usan cebadores oligonucleotídicos para localizar la región de interés y marcadores o colorantes fluorescentes para la generación de señales. Los procedimientos típicos basados en PCR usan sondas oligonucleotídicas de FRET con dos cromóforos interactivos (sondas de hibridación adyacentes, sondas TaqMan, balizas moleculares, Scorpions), sondas oligonucleotídicas individuales con un único fluoróforo (sondas de inactivación de G, Crockett, A. O. y C. T. Wittwer, Anal. Biochem. 2001; 290: 89-97 y SimpleProbes, Idaho Technology) y técnicas que usan un colorante de ADNbc (por ejemplo, SYBR Green I) en lugar de sondas oligonucleotídicas covalentes marcadas de forma fluorescente. Los colorantes de unión al ADN que se unen a todo el ADN bicatenario (bc) en la PCR provocan la fluorescencia del colorante tras la unión. Así, un aumento en la cantidad de producto de ADN durante la PCR da lugar, por lo tanto, a un aumento en la intensidad de la fluorescencia y se mide en cada ciclo, permitiendo de ese modo cuantificar las concentraciones de ADN. Sin embargo, un inconveniente potencial es la unión no específica a todos los productos de PCR de ADNbc que afectan a la cuantificación precisa. Con referencia a una dilución estándar, se puede determinar la concentración de ADNbc en la PCR.

Las sondas indicadoras fluorescentes detectan solamente la secuencia de ADN a la que se une la sonda específica y, por tanto, aumentan significativamente la especificidad. Esto permite la cuantificación de los amplificados, incluso en presencia de amplificación de ADN no específica. Para la detección de varias dianas en la misma reacción, las sondas fluorescentes se pueden usar en ensayos múltiples, en los que se usan sondas específicas con marcadores de diferentes colores para cada diana. La especificidad de las sondas indicadoras fluorescentes también evita la interferencia de las mediciones causada por dímeros de cebador, que son subproductos indeseables durante la amplificación. La mayoría de las aplicaciones se basan en la interacción de un compuesto indicador fluorescente y un extintor de fluorescencia que están unidos a la sonda o las sondas. Siempre que el compuesto indicador y el compuesto extintor estén en estrecha proximidad, solamente se puede detectar una fluorescencia basal tras la excitación con una fuente de excitación (por ejemplo, un láser, un LED y similares). Una vez que se produce la amplificación, la interacción entre el compuesto indicador y el compuesto extintor se interrumpe, dando lugar a una señal fluorescente detectable. Un aumento en la cantidad del producto amplificado en cada ciclo de PCR provoca un aumento proporcional de la fluorescencia debido a la disminución de la interacción entre el compuesto indicador y el compuesto extintor. En general, la fluorescencia se detecta y se mide en cada ciclo de amplificación, y su aumento geométrico correspondiente al aumento exponencial la cantidad del producto se usa para determinar el ciclo de umbral (CT) en cada reacción.

Se muestra una curva de PCR cinética típica en la FIG. 1A, en la que se representan los valores de intensidad de fluorescencia frente al número de ciclo para un procedimiento típico de PCR. En este caso, la formación de productos de PCR se monitoriza en cada ciclo del procedimiento de PCR. La amplificación se mide habitualmente en termocicladores que incluyen componentes y dispositivos para medir señales de fluorescencia durante la reacción de amplificación. Un ejemplo de dicho termociclador es el Roche Diagnostics LightCycler (ref. 20110468). Los productos de amplificación se detectan, por ejemplo, por medio de sondas de hibridación marcadas fluorescentes que solamente emiten señales de fluorescencia cuando están unidas al ácido nucleico diana o en ciertos casos también por medio de colorantes fluorescentes que se unen a ADN bicatenario.

Para una curva de PCR típica, la identificación de un punto de transición al final de la región de referencia, comúnmente denominado como valor de desviación o valor de umbral de ciclo (Ct), es extremadamente útil para comprender las características del procedimiento de amplificación por PCR. El valor de Ct se puede usar como una medida de la eficacia del procedimiento de PCR. Por ejemplo, típicamente se determina un umbral de señal definido para todas las reacciones que se van a analizar y se determina el número de ciclos (Ct) requeridos para alcanzar este valor de umbral

para el ácido nucleico diana, así como para ácidos nucleicos de referencia tales como un gen estándar o constitutivo (housekeeping). El número absoluto o relativo de copias de la molécula diana (material de partida) se puede determinar sobre la base de los valores de Ct obtenidos para el ácido nucleico diana y el ácido nucleico de referencia (Gibson *et al.*, Genome Research 6: 995-1001; Bieche *et al.*, Cancer Research 59: 2759-2765, 1999, documento WO 97/46707, documento WO 97/46712, documento WO 97/46714). El valor de desviación 20 al final de la región de referencia 15 en la FIG. 1A estaría en la región del número de ciclo 30.

Las cantidades de ARN o ADN se pueden determinar comparando los resultados con una curva estándar producida por PCR en tiempo real de diluciones en serie de una cantidad conocida de ARN o ADN. El número absoluto o relativo de copias de una molécula diana en la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se puede determinar comparando el valor de umbral de ciclo (Ct) con una curva estándar, con el valor de umbral de ciclo (Ct) de un ácido nucleico de referencia o con un ácido nucleico estándar cuantificado de forma absoluta. Además, la eficacia de la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se puede determinar comparando el umbral de ciclo (Ct) para cada una de las reacciones que se van a analizar con el umbral de ciclo (Ct) del ácido nucleico de referencia.

El documento US 2009/119020 divulga un procedimiento de determinación de los valores de Ct en el que se analiza una curva en la que el fondo ya está sustraído y se usa una tangente de curvatura en el punto Ct para determinar la fiabilidad de la determinación de Ct.

En una curva de PCR, el valor de desviación se puede determinar usando varios procedimientos existentes. Por ejemplo, diversos procedimientos determinan el valor real de desviación (Ct) como el valor en el que la fluorescencia en una curva de PCR normalizada alcanza un nivel de señal predeterminado, llamado AFL (valor de fluorescencia arbitrario), que puede ser sensible a los cambios en el nivel basal de fluorescencia promedio en los ciclos de PCR previos a la desviación. Otros procedimientos usan el número de ciclos, en los que la segunda derivada de fluorescencia frente al número de ciclos alcanza un máximo, lo que puede proporcionar valores de Ct tardíos, particularmente para curvas parabólicas. Sin embargo, otros procedimientos usan una tangente de la curva de PCR en el punto de inflexión (máximo de la primera derivada), lo que es problemático para las curvas parabólicas, ya que el máximo de la primera derivada puede no existir. (Guescini, BMC Bioinformatics, 9:326, 2008). Por lo tanto, los dos últimos procedimientos tienen inconvenientes para las curvas parabólicas. La patente de EE. UU. 8.219.366 resuelve el problema con las curvas parabólicas identificando dichas curvas y usando una técnica diferente para dichas curvas problemáticas. Aunque este procedimiento funciona bien para la PCR cualitativa en tiempo real, cuando se aplica a la PCR cuantitativa en tiempo real puede dar lugar a algún aumento en la imprecisión en números de copias bajos.

Por lo tanto, es deseable proporcionar sistemas y procedimientos para determinar el valor de Ct en las curvas de crecimiento, tales como las curvas de amplificación por PCR en tiempo real u otras curvas de crecimiento, que superen los problemas anteriores y otros problemas.

### Breve resumen

Se proporcionan sistemas, procedimientos y equipos para determinar un Ct de acuerdo con una técnica que es aplicable a diversas condiciones experimentales. Se puede usar una única técnica para determinar el Ct para curvas de crecimiento sigmoides estándar y para curvas de crecimiento problemáticas, tales como curvas parabólicas. El valor de Ct se puede determinar como la intersección de una línea tangente a la curva de crecimiento en el máximo de la segunda derivada con la línea de referencia de la curva de crecimiento. Dicho valor de Ct se puede usar para curvas sigmoides y curvas parabólicas, y puede proporcionar curvas de calibración lineales para lograr precisión en la determinación de las concentraciones iniciales.

Por ejemplo, los modos de realización pueden determinar la pendiente y el valor de la señal de un ajuste sigmoide doble (es decir, a los puntos de datos sin procesar de una curva de PCR) en el máximo de la segunda derivada. Esta pendiente y este valor de señal son suficientes para trazar una línea recta que cruza la línea de referencia de la curva de PCR. Este punto de intersección se puede definir, por tanto, como el valor de Ct.

De acuerdo con un modo de realización, un procedimiento determina un valor de umbral de ciclo Ct en una curva de crecimiento de un procedimiento de crecimiento. Se recibe un conjunto de datos que representa una curva de crecimiento. El conjunto de datos incluye una pluralidad de puntos de datos. Cada punto de datos tiene un par de valores de coordenadas de un número de ciclo y una intensidad de señal del procedimiento de crecimiento en el número de ciclo. Se calcula una función que se aproxima al conjunto de datos. Se determina una línea de referencia de la curva de crecimiento, en la que la línea de referencia es lineal. Un sistema informático calcula un primer punto de la función en el que se produce un máximo en una segunda derivada de la función. El sistema informático determina una línea tangente que es tangente a la función en el primer punto. El sistema informático calcula un punto de intersección de la línea tangente y la línea de referencia, en el que el número de ciclo del punto de intersección es el valor de umbral de ciclo Ct.

Otros modos de realización se refieren a sistemas y medios legibles por ordenador asociados con procedimientos descritos en el presente documento.

Se puede obtener una mejor comprensión de la naturaleza y de las ventajas de la presente invención con referencia a la siguiente descripción detallada y a los dibujos adjuntos.

**5 Breve descripción de los dibujos**

La FIG. 1A ilustra un ejemplo de una curva típica de crecimiento de PCR, trazada como la intensidad de fluorescencia frente al número de ciclo.

10 La FIG. 1B es una curva simulada de PCR en tiempo real de acuerdo con modos de realización de la presente invención.

La FIG. 2A muestra una gráfica 200 de la primera derivada 230 de la curva de PCR 110 de acuerdo con modos de realización de la presente invención.

15 La FIG. 2B muestra una gráfica 250 de la segunda derivada 260 de la curva de PCR 110 de acuerdo con modos de realización de la presente invención.

20 La FIG. 3 muestra una gráfica 300 con una curva simulada de PCR en tiempo real 110 que ilustra una determinación de Ct 375 de acuerdo con modos de realización de la presente invención.

La FIG. 4 es un diagrama de flujo que ilustra un procedimiento 400 para determinar un valor de umbral de ciclo Ct en una curva de crecimiento de un procedimiento de crecimiento.

25 La FIG. 5A muestra una gráfica 500 para una curva de PCR 510 con un factor de escala 5 de la curva de PCR 110 de acuerdo con modos de realización de la presente invención. La FIG. 5B muestra una gráfica 500 para una curva de PCR 510 con un factor de escala 1/5 de la curva de PCR 110 de acuerdo con modos de realización de la presente invención.

30 La FIG. 6A muestra una gráfica 600 de puntos de datos de PCR 605 y la función 610 que se aproximan a los puntos 605 de acuerdo con modos de realización de la presente invención. La FIG. 6B muestra una gráfica 650 de la segunda derivada 660 de la función 610.

35 La FIG. 7A muestra una gráfica 700 de una curva de calibración 710 determinada de acuerdo con modos de realización de la presente invención. La FIG. 7B muestra una gráfica 750 análoga de una curva de calibración 760 determinada usando el máximo de la segunda derivada.

40 La FIG. 8A muestra una gráfica 800 de una línea de correlación 810 entre el Ct medido usando el máximo de la segunda derivada, así como un procedimiento parabólico para curvas parabólicas y el Ct esperado.

La FIG. 8B muestra una gráfica 850 de una línea de correlación 860 entre el Ct medido usando un modo de realización de la presente invención y el Ct esperado.

45 La FIG. 9 muestra una gráfica 900 de dos curvas de datos sin procesar 910 y 920.

La FIG. 10 muestra un diagrama de bloques de un sistema informático de ejemplo 1200 que se puede usar con el sistema y los procedimientos de acuerdo con los modos de realización de la presente invención.

50 La FIG. 11 es un ejemplo de diagrama de bloques general que muestra la relación entre los recursos de software y hardware que se pueden usar para implementar el procedimiento y el sistema de la invención.

La FIG. 12 es un ejemplo de diagrama de bloques general que muestra la relación entre un dispositivo termociclador y un sistema informático.

**55 Descripción detallada**

Las curvas de crecimiento (por ejemplo, las curvas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real) de una muestra se pueden analizar para determinar una concentración inicial. Típicamente, se usa un umbral de ciclo Ct (también denominado valor de desviación) como un indicador para la concentración inicial, en el que se puede usar una curva de calibración para determinar una concentración inicial correspondiente a partir de un Ct medido. Sin embargo, puede resultar difícil determinar valores coherentes de Ct, ya que ciertas curvas de crecimiento (amplificación) pueden ser problemáticas. Se pueden usar diferentes técnicas para estas curvas problemáticas, pero hacerlo puede comprometer la curva de calibración y la capacidad de cuantificar adecuadamente la concentración inicial.

65 Los modos de realización de la presente invención proporcionan una única técnica para determinar el Ct que se puede

usar para curvas de crecimiento sigmoides estándar y para curvas de crecimiento problemáticas, tales como curvas parabólicas. El valor de Ct se puede determinar como la intersección de una línea tangente a la curva de crecimiento en el máximo de la segunda derivada con la línea de referencia de la curva de crecimiento. Dicho valor de Ct se puede usar para curvas sigmoides y curvas parabólicas, y puede proporcionar curvas de calibración lineales para lograr precisión en la determinación de las concentraciones iniciales. En primer lugar, se proporciona una descripción inicial de una curva de PCR en tiempo real.

### I. Aspectos generales

Un ejemplo de una curva de amplificación en el contexto de un procedimiento cinético de PCR se muestra en la FIG. 1A. Como se muestra, la curva incluye una región de fase de latencia y una región de fase exponencial. La región de fase de latencia se denomina comúnmente línea de referencia o región de referencia. Dicha curva incluye una región de transición que une la fase de latencia y la fase exponencial. La región de transición se denomina comúnmente desviación o región de desviación. La región de desviación típicamente define un extremo de la línea de referencia y una transición en la tasa de crecimiento o amplificación del procedimiento subyacente. La identificación de un punto de transición específico en la región de transición puede resultar útil para analizar el comportamiento del procedimiento subyacente.

En una curva de PCR típica, la identificación de un punto de transición denominado valor de desviación o valor de umbral de ciclo (Ct) es extremadamente útil para comprender las características de eficacia del procedimiento de PCR. Por ejemplo, el valor de Ct se puede usar para cuantificar la cantidad de ADN presente en la muestra que se está analizando. La cuantización se obtiene realizando una curva de calibración del valor Log(cantidad de ADN) frente al valor de Ct. Las muestras posteriores pueden usar entonces los valores de Ct junto con la curva de calibración para obtener directamente las estimaciones de ADN en una muestra. Los valores de Ct también se pueden usar para proporcionar información cualitativa sobre la muestra de ADN.

Otros procedimientos que pueden proporcionar curvas sigmoides o de crecimiento similares incluyen procesos bacterianos, procesos enzimáticos y procesos de unión. En las curvas de crecimiento bacteriano, por ejemplo, el punto de transición de interés se ha denominado tiempo en la fase de latencia,  $\lambda$ . Otros procedimientos específicos que producen curvas de datos que se pueden analizar de acuerdo con la presente invención incluyen procedimientos de amplificación de desplazamiento de hebra (SDA), procedimientos de amplificación basados en la secuencia de ácido nucleico (NASBA) y procedimientos de amplificación mediados por transcripción (TMA). Se pueden encontrar ejemplos de procedimientos de SDA y NASBA y curvas de datos en Wang, Sha-Sha, *et al.*, "Homogeneous Real-Time Detection of Single-Nucleotide Polymorphisms by Strand Displacement Amplification on the BD ProbeTec ET System", *Clin Chem* 2003 49 (10): 1599 y Weusten, Jos J.A.M., *et al.*, "Principles of Quantitation of Viral Loads Using Nucleic Acid Sequence-Based Amplification in Combination With Homogeneous Detection Using Molecular Beacons", *Nucleic Acids Research*, 2002 30(6):26, respectivamente. Por tanto, aunque el resto de este documento analizará modos de realización y aspectos de la invención en términos de su aplicabilidad a curvas de PCR, se debe apreciar que la presente invención se puede aplicar a curvas de datos relacionadas con otros procedimientos.

Como se muestra en la FIG. 1A, los datos para una curva de crecimiento de PCR típica se pueden representar en un sistema de coordenadas bidimensional, por ejemplo, con un número de ciclo de PCR definiendo el eje x y un indicador de crecimiento de polinucleótido acumulado definiendo el eje y. Típicamente, el indicador de crecimiento acumulado es un valor de intensidad de fluorescencia, ya que el uso de marcadores fluorescentes es quizás el esquema de marcaje más usado. Sin embargo, se debe entender que se pueden usar otros indicadores dependiendo del esquema de marcaje y/o detección particular usado. Los ejemplos de otros indicadores útiles del crecimiento de señal acumulado incluyen intensidad de luminiscencia, intensidad de quimioluminiscencia, intensidad de bioluminiscencia, intensidad de fosforescencia, transferencia de carga, voltaje, corriente, potencia, energía, temperatura, viscosidad, dispersión de luz, intensidad radioactiva, reflectividad, transmitancia y absorbancia. Todos estos ejemplos se clasifican como intensidad de señal. La definición de ciclo también puede incluir tiempo, ciclos de procedimiento, ciclos de funcionamiento de la unidad y ciclos reproductivos.

### II. Determinación del valor de Ct

Los modos de realización usan la intersección de una línea tangente a la curva de crecimiento en el máximo de la segunda derivada con la línea de referencia de la curva de crecimiento. Para obtener el punto del máximo de la segunda derivada de una curva de crecimiento, se puede obtener una aproximación funcional (ajuste de curva) a los puntos de datos del procedimiento de crecimiento particular (por ejemplo, PCR en tiempo real). Una segunda derivada de la función se puede calcular y analizar para determinar el ciclo ( $x_{val}$ ) en el que se produce el máximo. La línea tangente se puede determinar entonces basada en la pendiente de la función en  $x_{val}$ . Después de determinar una línea de referencia de la función, se puede calcular la intersección de la línea tangente y la línea de referencia. A continuación, se restituye el valor de Ct y se puede mostrar o usar de otra manera para procesamiento adicional. Dicho valor de Ct se puede usar para curvas sigmoides y curvas parabólicas, y puede proporcionar curvas de calibración lineales para lograr precisión en la determinación de las concentraciones iniciales. Las curvas de crecimiento simuladas se usan ahora para ilustrar los modos de realización.

La FIG. 1B muestra una gráfica 100 con una curva simulada de PCR en tiempo real 110 de acuerdo con modos de realización de la presente invención. La curva de PCR 110 tiene el número de ciclo en el eje horizontal (x) y la intensidad (por ejemplo, fluorescencia) en el eje vertical (y). La curva de PCR 110 tiene una línea de referencia 115 bien definida. Como se muestra, la línea de referencia 115 es una línea horizontal a una intensidad (y) igual a dos.

5 Para facilitar la presentación, no hay pendiente para la línea de referencia simulada 115. Sin embargo, una línea de referencia puede tener cualquier forma lineal con una pendiente. La región de desviación 120 se encuentra entre la línea de referencia 115 y la región de fase exponencial 125. La región de fase exponencial 125 incluye un punto de inflexión 128 en el que la curva de PCR 110 comienza a curvarse hacia abajo, al contrario que la curvatura hacia arriba en la región de desviación 120.

10 Aunque la curva de crecimiento de PCR 110 es simulada, se puede determinar una curva de crecimiento de PCR a partir de los puntos de datos de intensidad tomados en cada ciclo. Se puede asumir una forma funcional particular, y se pueden determinar parámetros de tal manera que la forma funcional particular se aproxime a los puntos de datos. En algunos modos de realización, se puede usar una función sigmoide doble con parámetros determinados por un procedimiento de regresión de Levenberg-Marquardt (LM) para encontrar una aproximación a los puntos de datos. En otros modos de realización se pueden usar otras formas funcionales, por ejemplo, interpolación usando polinomios con condiciones de contorno continuas (por ejemplo, continuas hasta la segunda derivada) como puede suceder en el análisis de elementos finitos, una función sigmoide única o cualquier conjunto de una o más funciones con una segunda derivada continua a través de las regiones de interés. En un aspecto, la aproximación de la curva y los parámetros se pueden usar para preprocesar la señal de datos, por ejemplo, para normalizar la señal de datos y/o para eliminar los picos o puntos de datos atípicos que pueden estar presentes en la señal de datos.

25 La FIG. 2A muestra una gráfica 200 de la primera derivada 230 de la curva de PCR 110 de acuerdo con modos de realización de la presente invención. El eje x sigue siendo el número del ciclo, pero el eje y está en unidades de cambio de intensidad por ciclo, ya que la gráfica 200 muestra la primera derivada. La primera derivada 230 se puede determinar tomando la primera derivada de la función resultante de un procedimiento de ajuste de curvas a los puntos de datos. Como se muestra, la primera derivada 230 tiene un máximo en el punto de inflexión 228 (que corresponde al punto de inflexión 128).

30 La FIG. 2B muestra una gráfica 250 de la segunda derivada 260 de la curva de PCR 110 de acuerdo con modos de realización de la presente invención. La segunda derivada 260 se puede determinar tomando la segunda derivada de la función resultante de un procedimiento de ajuste de curvas a los puntos de datos. El punto de inflexión se muestra como el punto 278, que corresponde al lugar en el que la segunda derivada 260 es cero. La segunda derivada 260 tiene un máximo en el punto 265, que se produce en el ciclo xval. En la FIG. 2B, xval es igual a 32,36. El máximo se puede encontrar de una diversidad de formas, por ejemplo, buscando entre los valores de la segunda derivada 260 o determinando los ceros de una tercera derivada. Como se puede observar, el máximo 265 de la segunda derivada se produce antes del punto de inflexión 278.

40 Una vez determinado xval, entonces se puede determinar la pendiente de la curva de PCR en el ciclo xval. En un modo de realización, la pendiente se puede determinar tomando el valor de la primera derivada en el ciclo xval. Una línea con esta pendiente que pasa a través del punto del máximo de la segunda derivada puede proporcionar entonces una línea tangente a la curva de PCR en el ciclo xval.

45 La FIG. 3 muestra una gráfica 300 con una curva simulada de PCR en tiempo real 110 que ilustra una determinación de Ct 375 de acuerdo con modos de realización de la presente invención. El punto 365 de la curva de PCR 110 corresponde al punto del máximo de la segunda derivada. Por tanto, el punto 365 se produce en el mismo ciclo xval que el punto 265, que es 32,36. La pendiente de la curva de PCR 110 en xval (32,36) es igual a 0,8375. La intensidad de la curva de PCR 110 en xval (32,36) es igual a 4,05 (yval). La ecuación de la línea que pasa por (xval, yval) con la pendiente (slp) dada (0,8375) es:  $\text{línea}(x) = yval + slp(x - xval) = 0,8375x - 23,04$ . La línea tangente 375 sigue esta ecuación.

50 La línea de referencia 115, que está en  $y = 2$ , se muestra ampliada como la línea 315. La intersección 370 de la línea tangente 375 con la línea de referencia 315 se puede determinar resolviendo la siguiente ecuación para x:  $0,8375x - 23,04 = 2$  (es decir, el lugar en el que la ecuación para la línea tangente es igual a la ecuación para la línea de referencia, que también puede tener forma de  $ax + b$ ). La intersección tiene una solución de  $x = 29,9$ , que se toma como el valor de Ct 375, como se indica por una flecha hacia abajo hasta el punto en el eje x en el que se produjo la intersección 370. Un beneficio del uso del punto 365 para determinar la línea tangente 375 es que el punto 365 aparece en la región de desviación de la curva de PCR 110. Por tanto, la intersección 370 también aparecería en la región de desviación.

### 60 III. Procedimiento

65 La FIG. 4 es un diagrama de flujo que ilustra un procedimiento 400 para determinar un valor de umbral de ciclo Ct en una curva de crecimiento de un procedimiento de crecimiento. El procedimiento 400 se puede calcular mediante un sistema informático. Un procedimiento de crecimiento de ejemplo es la amplificación por PCR en tiempo real. Otros procedimientos de crecimiento incluyen procesos bacterianos, procesos enzimáticos y procesos de unión. Los

procedimientos de crecimiento se pueden medir por una serie de puntos, proporcionando cada punto de datos una intensidad de señal en un número de ciclo.

5 En el bloque 410 se recibe un conjunto de datos que representa una curva de crecimiento. El conjunto de datos incluye una pluralidad de puntos de datos. Cada punto de datos tiene un par de valores de coordenadas {un número de ciclo, una intensidad de señal del procedimiento de crecimiento en el número de ciclo}. Por ejemplo, cada punto de datos en la FIG. 1A se designa mediante una intensidad de fluorescencia y un número de ciclo. En el presente documento se mencionan otros tipos de intensidades de señal, incluyendo otros tipos de intensidades.

10 En el bloque 420, un sistema informático puede calcular una función que se aproxima al conjunto de datos. Esta función se puede determinar usando una técnica de regresión para identificar el mejor ajuste al conjunto de datos. La función puede tener una forma funcional predeterminada con parámetros variables, y el procedimiento de ajuste determina los parámetros. En una implementación se usa una forma funcional sigmoide doble que puede proporcionar una función exacta para permitir una determinación precisa de la primera y segunda derivada.

15 En un modo de realización, un sistema informático determina el mejor ajuste de la ecuación sigmoide doble mostrada en la ecuación (1) a continuación.

$$a + bx + \frac{c}{(1 + \text{Exp}[-d(x - e)]) \cdot (1 + \text{Exp}[-f(x - g)])} \quad (1)$$

20 Por ejemplo, se puede realizar un ajuste de la curva de Levenberg-Marquardt (DSLML) sigmoide doble como se divulga en la patente de EE. UU. n.º 6.680.868 ("PCR Elbow Determination by Use of a Double Sigmoid Function Curve Fit with the Levenberg-Marquardt Algorithm and Normalization"). En un modo de realización, ciertos puntos de datos se pueden eliminar antes de realizar el ajuste de la curva, por ejemplo, puntos al principio o en la curva de crecimiento. Se han introducido diversas implementaciones y procesamientos de la ecuación sigmoide doble, por ejemplo, la ecuación DSLM (sigmoide doble de Levenberg-Marquardt), la DSLM con opciones para la sustracción de línea de referencia (BLS), división de línea de referencia (BLD) y sustracción de línea de referencia con división (BLSD), la ecuación de curvatura y otras, como se describe en la solicitud de EE. UU. 2007/143385; la solicitud de EE. UU. US2007/148632; la solicitud de EE. UU. US2007/143070 y la solicitud de EE. UU. US2009/119020.

30 En el bloque 430 se determina una línea de referencia de la curva de crecimiento. Por ejemplo, la línea de referencia 15 de la FIG. 1A se puede determinar a partir de los puntos de datos. El final de la línea de referencia se puede determinar de diversas maneras, por ejemplo, determinando el momento en el que la curva de crecimiento entra en una región exponencial. Los puntos de datos correspondientes a la línea de referencia se pueden ajustar a una función lineal para determinar la línea de referencia. Como otro ejemplo, el ajuste funcional se puede usar para determinar la línea de referencia. La ecuación (1) incluye una parte lineal (ax + b) que se puede usar para definir la línea de referencia.

40 En el bloque 440, el sistema informático puede calcular un primer punto de la función en el que se produce un máximo en una segunda derivada de la función. Por ejemplo, el sistema informático puede determinar las posiciones (xval) e (yval) correspondientes al máximo de la segunda derivada de la ecuación (1). El xval de la segunda derivada se puede calcular, por ejemplo, como se describe para la FIG. 2B. El yval se puede determinar entonces a partir del xval usando el ajuste funcional.

45 En el bloque 450, el sistema informático puede determinar una línea tangente que es tangente a la función en el primer punto. En un modo de realización, la pendiente (slp) del ajuste funcional (por ejemplo, determinado usando la ecuación (1)) se determina en el primer punto (xval, yval). La línea tangente se puede determinar entonces usando la ecuación:

$$\text{línea}(x) = yval + slp(x - xval). \quad (2)$$

50 En el bloque 460, el sistema informático puede calcular un punto de intersección de la línea tangente y la línea de referencia, en el que el número de ciclo del punto de intersección es el valor de umbral de ciclo Ct. La línea tangente se puede definir como anteriormente con la línea (x) y la línea de referencia por ax + b, que se puede determinar de diversas maneras, tal como a partir de la ecuación (1). En una implementación, la siguiente ecuación se puede resolver para x, en la que los valores a y b son los valores de la ecuación (1)

$$(a + bx) = yval + slp(x - xval) \quad (3)$$

que tiene la solución

$$60 \quad Ct = x = \frac{a + slp \cdot xval - yval}{slp - b} \quad (4).$$

En el caso en el que el procedimiento 400 se implemente en un módulo de inteligencia (por ejemplo, instrucciones de ejecución del procesador) que resida en un dispositivo de adquisición de datos de PCR tal como un termociclador, el conjunto de datos se puede proporcionar al módulo de inteligencia en tiempo real a medida que se recogen los datos, o se puede almacenar en una unidad de memoria o en una memoria intermedia y proporcionar al módulo de inteligencia una vez finalizado el experimento. Asimismo, el conjunto de datos se puede proporcionar a un sistema informático, tal como un sistema informático de sobremesa u otro sistema informático, a través de una conexión de red (por ejemplo, FAN, VPN, intranet, Internet, etc.) o conexión directa (por ejemplo, USB u otra conexión directa por cable o inalámbrica) al dispositivo de adquisición, o se puede proporcionar en un medio portátil tal como un CD, DVD, disquete o similar. En ciertos aspectos, el conjunto de datos incluye puntos de datos que tienen un par de valores de coordenadas (o un vector bidimensional). Para los datos de PCR, el par de valores de coordenadas representa típicamente el número de ciclo y el valor de intensidad de fluorescencia.

Por lo tanto, la invención proporciona un procedimiento para determinar un valor de umbral de ciclo Ct en una curva de crecimiento de un procedimiento de crecimiento. En el presente documento, el procedimiento comprende recibir un conjunto de datos que representa una curva de crecimiento, incluyendo el conjunto de datos una pluralidad de puntos de datos, teniendo cada punto de datos un par de valores de coordenadas de un número de ciclo y una intensidad de señal del procedimiento de crecimiento en el número de ciclo; calcular una función que se aproxima al conjunto de datos; determinar una línea de referencia de la curva de crecimiento, siendo la línea de referencia lineal; calcular, con un sistema informático, un primer punto de la función en el que se produce un máximo en una segunda derivada de la función; determinar, con el sistema informático, una línea tangente que es tangente a la función en el primer punto; calcular, con el sistema informático, un punto de intersección de la línea tangente y la línea de referencia, siendo el número de ciclo del punto de intersección el valor de umbral de ciclo Ct.

En ciertos modos de realización, el primer punto tiene un número de ciclo de xval y una intensidad de señal de yval, y en el que la determinación de la línea tangente incluye determinar una pendiente (slp) de la función en {xval, yval} para obtener la línea tangente como  $yval + slp (x - xval)$ , en la que x es el número de ciclo. En otros modos de realización se determina que la línea de referencia tiene una forma funcional de  $ax + b$ , y en la que calcular el punto de intersección de la línea tangente y la línea de referencia incluye resolver la siguiente ecuación para x:

$$(a + bx) = yval + slp (x - xval).$$

En ciertos modos de realización, la línea de referencia es lineal. En otros modos de realización, la función tiene una forma funcional de sigmoide doble. En modos de realización particulares, el sigmoide doble tiene una ecuación:

$$a + bx + \frac{c}{(1 + \text{Exp}[-d(x - e)]) \cdot (1 + \text{Exp}[-f(x - g)])}.$$

En algunos modos de realización, el procedimiento de crecimiento es una amplificación de un material de partida. En modos de realización particulares, la amplificación es amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En ciertos modos de realización, el material de partida incluye un ácido nucleico diana.

En otro modo de realización, el procedimiento comprende además eliminar una parte de los puntos de datos antes de calcular la función. En otro modo de realización más, la línea de referencia se determina a partir de la función. En ciertos modos de realización, el procedimiento comprende además calcular la segunda derivada de la función.

En un aspecto adicional de la invención, se proporciona un procedimiento para medir la eficacia de la amplificación por reacción en cadena de polimerasa (PCR), que comprende las etapas de medir un valor de intensidad de fluorescencia, un valor de intensidad de luminiscencia, un valor de intensidad de quimioluminiscencia, un valor de intensidad de fosforescencia, un valor de transferencia de carga, un valor de intensidad de bioluminiscencia o un valor de absorbancia representativo para la acumulación de polinucleótido amplificado; determinar un umbral de señal definido y el número de ciclos requeridos para alcanzar este valor de umbral, en el que el umbral de ciclo (Ct) de la curva de crecimiento se determina mediante las etapas del procedimiento de recibir un conjunto de datos que representa una curva de crecimiento, incluyendo el conjunto de datos una pluralidad de puntos de datos, teniendo cada punto de datos un par de valores de coordenadas de un número de ciclo y una intensidad de señal del procedimiento de crecimiento en el número de ciclo; calcular una función que se aproxima al conjunto de datos; determinar una línea de referencia de la curva de crecimiento, siendo la línea de referencia lineal; calcular, con un sistema informático, un primer punto de la función en el que se produce un máximo en una segunda derivada de la función; determinar, con el sistema informático, una línea tangente que es tangente a la función en el primer punto; calcular, con el sistema informático, un punto de intersección de la línea tangente y la línea de referencia, siendo el número de ciclo del punto de intersección el valor de umbral de ciclo Ct; y determinar la eficacia de la amplificación por reacción en cadena de polimerasa (PCR) comparando el umbral de ciclo (Ct) para el polinucleótido amplificado con un umbral de ciclo (Ct) para un ácido nucleico de referencia.



En otro aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para determinar el número absoluto o relativo de copias de una molécula diana en una amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que comprende las etapas de medir un valor de intensidad de fluorescencia, un valor de intensidad de luminiscencia, un valor de intensidad de quimioluminiscencia, un valor de intensidad de fosforescencia, un valor de transferencia de carga, un valor de intensidad de bioluminiscencia o un valor de absorbancia representativo para la acumulación de polinucleótido amplificado; determinar el umbral de ciclo (Ct) de una curva de crecimiento mediante las etapas del procedimiento de recibir un conjunto de datos que representa una curva de crecimiento, incluyendo el conjunto de datos una pluralidad de puntos de datos, teniendo cada punto de datos un par de valores de coordenadas de un número de ciclo y una intensidad de señal del procedimiento de crecimiento en el número de ciclo; calcular una función que se aproxima al conjunto de datos; determinar una línea de referencia de la curva de crecimiento, siendo la línea de referencia lineal; calcular, con un sistema informático, un primer punto de la función en el que se produce un máximo en una segunda derivada de la función; determinar, con el sistema informático, una línea tangente que es tangente a la función en el primer punto; calcular, con el sistema informático, un punto de intersección de la línea tangente y la línea de referencia, siendo el número de ciclo del punto de intersección el valor de umbral de ciclo Ct; y determinar el número absoluto o relativo de copias de la molécula diana basado en el valor de Ct.

#### IV. Invariancia de escala

Es beneficioso tener una técnica para la determinación de Ct que esté en una escala invariante por las siguientes razones. Diferentes máquinas de PCR pueden tener diferentes intensidades de lámpara, longitud de fibra óptica y termocicladores, y todo ello puede actuar como un multiplicador de la intensidad de fluorescencia. Por tanto, la obtención de puntos de datos precisos puede depender de la máquina, pero idealmente la determinación de Ct no debe depender de la variabilidad entre máquinas. Las siguientes figuras muestran la invariancia de escala de los modos de realización.

La FIG. 5A muestra una gráfica 500 para una curva de PCR 510 con un factor de escala 5 de la curva de PCR 110 de acuerdo con modos de realización de la presente invención. La curva de PCR 510 es igual que la curva de PCR 110, excepto en que está multiplicada por 5. Como se muestra, la línea tangente 535 en el máximo de la segunda derivada cruza la línea de referencia 515 en el mismo número de ciclo (29,9) que el determinado en la FIG. 3 para la curva de PCR 110. Por tanto, incluso si la curva de PCR se multiplica por una constante (por ejemplo, debido al uso de una máquina diferente), se obtiene el mismo Ct.

La FIG. 5B muestra una gráfica 500 para una curva de PCR 510 con un factor de escala 1/5 de la curva de PCR 110 de acuerdo con modos de realización de la presente invención. La curva de PCR 560 es igual que la curva de PCR 110, excepto en que está dividida por 5. Como se muestra, la línea tangente 585 en el máximo de la segunda derivada cruza la línea de referencia 565 en el mismo número de ciclo (29,9) que el determinado en la FIG. 3 para la curva de PCR 110. Por tanto, incluso si la curva de PCR se divide por una constante (por ejemplo, debido al uso de una máquina diferente), se obtiene el mismo Ct.

#### V. Curvas parabólicas

Como se menciona anteriormente, las curvas parabólicas son problemáticas para ciertas técnicas de cálculo de Ct. Por ejemplo, no siempre se dispone de un punto de inflexión (máximo de la primera derivada y cero de la segunda derivada). Además, el uso de un máximo de la segunda derivada puede proporcionar resultados insatisfactorios. Sin embargo, los modos de realización de la presente invención pueden proporcionar de forma fiable unos mejorados valores de Ct.

La FIG. 6A muestra una gráfica 600 de puntos de datos de PCR 605 y la función 610 que se aproximan a los puntos 605 de acuerdo con modos de realización de la presente invención. Como se muestra, la función 610 se ajustó usando la ecuación (1). La FIG. 6B muestra una gráfica 650 de la segunda derivada 660 de la función 610. La gráfica 650 muestra que la segunda derivada 660 tiene un máximo de la segunda derivada (en 49,31). Pero no hay punto de inflexión, ya que la segunda derivada no pasa por cero después de su aumento desde la línea de referencia. Por tanto, no es posible determinar el Ct usando la pendiente en el punto de inflexión.

Es posible determinar un Ct usando el máximo de la segunda derivada, pero la estimación es 49,31, que es el máximo de la segunda derivada 660. Usar una intersección de la tangente (es decir, una línea tangente a la función 610 en el ciclo 49,31) con la línea de referencia proporciona Ct = 45,53, que es una mejor estimación que 49,31. Usar la línea tangente en el máximo de la segunda derivada 660 proporciona un Ct más acorde con la desviación de la función 610.

#### VI. Curvas de calibración

Como se describe anteriormente, se puede usar una curva de calibración para determinar una concentración inicial de una muestra usando un valor de Ct. Dichas curvas de calibración se presentan normalmente como un logaritmo de la concentración y proporcionan una gráfica lineal. Con el valor de Ct se puede obtener la concentración inicial correspondiente en una escala logarítmica. Los siguientes datos de calibración son para un ensayo que cubre un intervalo de nueve logaritmos (es decir, un intervalo de concentración de  $10^9$ ).

La FIG. 7A muestra una gráfica 700 de una curva de calibración 710 determinada de acuerdo con modos de realización de la presente invención. El eje x es el logaritmo de concentración y el eje y es delta Ct (Ct diana menos Ct de control), en el que el Ct de control es el Ct medido con una cantidad fija de especies puras en investigación. La curva de calibración 710 tiene la forma lineal de  $3,268x + 8,862$ . Se observa en la FIG. 7A que la curva de calibración 760 muestra una linealidad casi perfecta de  $R^2 = 0,997$  cuando el delta Ct se traza frente al logaritmo de la concentración.

Para permitir la comparación, la FIG. 7B muestra una gráfica 750 análoga de una curva de calibración 760 determinada usando el máximo de la segunda derivada. La curva de calibración 760 tiene la forma lineal de  $3,235x+8,635$ , con un  $R^2$  de 0,995. Por tanto, los modos de realización usados para la gráfica 700 tienen una linealidad incluso ligeramente mejor que una técnica que usa el máximo de la segunda derivada. Adicionalmente, una ventaja con respecto al uso del máximo de la segunda derivada como el valor de Ct para curvas no parabólicas es un valor de Ct más pequeño y más realista.

## VII. Correlación con el Ct esperado

Como una comprobación adicional de la precisión del modo de realización de la presente invención, la correlación del Ct medido se compara con un Ct esperado. El Ct esperado se determina mediante lo que un investigador estimaría como visualmente, por ejemplo, justo cuando la curva se eleva por encima de la línea de referencia.

La FIG. 8A muestra una gráfica 800 de una línea de correlación 810 entre el Ct medido usando el máximo de la segunda derivada y el Ct esperado. Para curvas parabólicas se usó un procedimiento parabólico (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. 8.219.366). En el área 820 resaltada mediante una forma ovalada, estos puntos de datos horizontales son el resultado de la implementación del procedimiento específico parabólico, lo que proporciona una menor linealidad. Cada punto de datos corresponde al valor de Ct medido y al valor de Ct esperado de una curva de PCR. La línea de correlación 810 es un ajuste lineal a los datos y tiene la forma  $0,9116x+4,28$ . Si hubiera una correlación perfecta, entonces la línea tendría una pendiente de 1 y un punto de corte en y de 0 y un  $R^2$  de uno. En esta ocasión,  $R^2$  es igual a 0,96, como se muestra en la gráfica 800. Además, los valores de Ct calculados son en general dos valores de Ct más altos que el Ct esperado. La diferencia en dos valores de Ct se puede observar mirando la línea de correlación que está en el Ct medido de 27 cuando el Ct esperado es 25.

La FIG. 8B muestra una gráfica 850 de una línea de correlación 860 entre el Ct medido usando un modo de realización de la presente invención y el Ct esperado. No se usó un procedimiento parabólico para ninguno de los puntos de datos. La línea de correlación 860 es un ajuste lineal a los datos y tiene la forma  $1,029x+1,39$ . El ajuste lineal es mejor con un  $R^2$  de 0,98 frente a 0,96. Además, se observa que existe un desplazamiento mínimo entre el Ct esperado y el Ct calculado. Además, la pendiente es muy cercana a 1 (1,03 frente a 0,91). Esto demuestra que el cálculo de Ct usando el modo de realización de la presente invención en curvas de PCR que son sigmoides y parabólicas es superior al cálculo de los valores de Ct con el máximo de la segunda derivada para curvas sigmoides y el cambio a una técnica diferente para curvas parabólicas.

## VIII. Comparaciones con la sustracción de la línea de referencia con división

Los modos de realización de la presente invención también son mejores que el procedimiento de sustracción de la línea de referencia con división usando un AFL (valor de fluorescencia arbitrario). En el procedimiento de AFL, la línea de referencia se sustrae del ajuste funcional sigmoide y se divide por la intersección de la línea de referencia. El Ct viene determinado por el ciclo cuando el resultado alcanza el umbral de AFL.

La FIG. 9 muestra una gráfica 900 de dos curvas de datos sin procesar 910 y 920. En ambos casos, el valor de Ct esperado es  $Ct = 36$ . Los valores de Ct calculados usando la sustracción de la línea de referencia con división son de 35,03 para la curva 910 y de 37,06 para la curva 920. El Ct usando los modos de realización de la presente invención es de 35,86 para la curva 910 y de 35,43 para la curva 920. Como se puede observar, los modos de realización de la presente invención son más acordes al valor de Ct esperado (36). Adicionalmente, los valores de 35,86 y 35,43 están más próximos entre sí, proporcionando de ese modo una mayor precisión.

## IX. Sistema informático y producto informático

Cualquiera de los sistemas informáticos mencionados en el presente documento puede usar cualquier número adecuado de subsistemas. Los ejemplos de dichos subsistemas se muestran en la FIG. 10 en el equipo informático 1000. En algunos modos de realización, un sistema informático incluye un único equipo informático, en el que los subsistemas pueden ser los componentes del aparato informático. En otros modos de realización, un sistema informático puede incluir múltiples equipos informáticos, siendo cada uno un subsistema, con componentes internos.

Los subsistemas mostrados en la FIG. 10 están interconectados mediante un bus de sistema 1075. Se muestran subsistemas adicionales tales como una impresora 1074, un teclado 1078, uno o más dispositivos de almacenamiento 1079, un monitor 1076, que está acoplado al adaptador de pantalla 1082, y otros. Los periféricos y dispositivos de entrada/salida (E/S), que se acoplan al controlador de E/S 1071, se pueden conectar al sistema informático mediante

cualquier número de medios conocidos en la técnica, tales como un puerto en serie 1077. Por ejemplo, se puede usar un puerto en serie 1077 o una interfaz externa 1081 (por ejemplo, Ethernet, Wi-Fi, etc.) para conectar el sistema informático 1000 a una red de área extensa tal como Internet, un dispositivo de entrada de ratón o un escáner. La interconexión mediante el bus de sistema 1075 permite que el procesador central 1073 se comunique con cada subsistema y controle la ejecución de instrucciones desde la memoria del sistema 1072 o el dispositivo o dispositivos de almacenamiento 1079 (por ejemplo, un disco duro), así como el intercambio de información entre los subsistemas. La memoria del sistema 1072 y/o el dispositivo o dispositivos de almacenamiento 1079 pueden contener un medio legible por ordenador. Cualquiera de los valores mencionados en el presente documento se puede enviar de un componente a otro componente y se puede ser enviado al usuario.

Un sistema informático puede incluir una pluralidad de los mismos componentes o subsistemas, por ejemplo, conectados conjuntamente mediante una interfaz externa 1081 o una interfaz interna. En algunos modos de realización, los sistemas, subsistemas o equipos informáticos se pueden comunicar a través de una red. En dichos casos, un ordenador se puede considerar un cliente y otro ordenador un servidor, en el que cada uno puede ser parte de un mismo sistema informático. Un cliente y un servidor pueden incluir cada uno varios sistemas, subsistemas o componentes.

Se debe entender que cualquiera de los modos de realización de la presente invención se puede implementar en forma de lógica de control usando hardware (por ejemplo, un circuito integrado específico de aplicación o un conjunto de puertas programables en campo) y/o usando software con un procesador en general programable de una manera modular o integrada. Como se usa en el presente documento, un procesador incluye un procesador de varios núcleos en un mismo chip integrado, o múltiples unidades de procesamiento en una única placa de circuito o en red. Basándose en la divulgación y los contenidos proporcionados en el presente documento, un experto en la técnica conocerá y apreciará otras formas y/o procedimientos para implementar los modos de realización de la presente invención usando hardware y una combinación de hardware y software.

Cualquiera de los componentes o funciones del software descritos en la presente solicitud se puede implementar como código de software para que lo ejecute un procesador usando cualquier lenguaje informático adecuado tal como, por ejemplo, Java, C++ o Perl usando, por ejemplo, técnicas convencionales u orientadas a objetos. El código de software se puede almacenar como una serie de instrucciones o comandos en un medio legible por ordenador para su almacenamiento y/o transmisión; los medios adecuados incluyen una memoria de acceso aleatorio (RAM), una memoria solo de lectura (ROM), un medio magnético tal como un disco duro o un disquete, o un medio óptico tal como un disco compacto (CD) o DVD (disco versátil digital), memoria flash y similares. El medio legible por ordenador puede ser cualquier combinación de dichos dispositivos de almacenamiento o transmisión.

Dichos programas también se pueden codificar y transmitir usando señales portadoras adaptadas para su transmisión mediante redes por cable, ópticas y/o inalámbricas que se ajustan a una diversidad de protocolos, incluyendo Internet. Por tanto, se puede crear un medio legible por ordenador de acuerdo con un modo de realización de la presente invención usando una señal de datos codificada con dichos programas. Los medios legibles por ordenador codificados con el código de programa se pueden incluir en un dispositivo compatible o se pueden proporcionar por separado de otros dispositivos (por ejemplo, mediante una descarga de Internet). Cualquiera de dichos medios legibles por ordenador se puede encontrar en o dentro de un producto de programa informático individual (por ejemplo, un disco duro, un CD o un sistema informático completo) y puede estar presente en o dentro de diferentes productos de programa informático dentro de un sistema o red. Un sistema informático puede incluir un monitor, una impresora u otro dispositivo de visualización adecuado para proporcionar cualquiera de los resultados mencionados en el presente documento a un usuario.

Por tanto, los modos de realización pueden estar dirigidos a sistemas informáticos que incluyen uno o más procesadores configurados para realizar las etapas de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, potencialmente con diferentes componentes que realizan etapas respectivas o un grupo respectivo de etapas. Aunque se presentan como etapas numeradas, las etapas de los procedimientos de la presente invención se pueden realizar al mismo tiempo o en un orden diferente. Adicionalmente, partes de estas etapas se pueden usar con partes de otras etapas de otros procedimientos. Además, la totalidad de una etapa o partes de la misma pueden ser opcionales. Adicionalmente, cualquiera de las etapas de cualquiera de los procedimientos se puede realizar con módulos, circuitos u otros medios para realizar estas etapas.

En algunos modos de realización, el procedimiento de la invención está incorporado en un producto informático. Por tanto, dicho producto informático comprende un medio legible por ordenador no transitorio que almacena una pluralidad de instrucciones que, cuando se ejecutan, controlan un sistema informático para determinar un valor de umbral de ciclo  $C_t$  en una curva de crecimiento de un procedimiento de crecimiento, en el que las instrucciones comprenden recibir un conjunto de datos que representa una curva de crecimiento, incluyendo el conjunto de datos una pluralidad de puntos de datos, teniendo cada punto de datos un par de valores de coordenadas de un número de ciclo y una intensidad de señal del procedimiento de crecimiento en el número de ciclo; calcular una función que se aproxima al conjunto de datos; determinar una línea de referencia de la curva de crecimiento, siendo la línea de referencia lineal; calcular un primer punto de la función en el que se produce un máximo en una segunda derivada de la función; determinar una línea tangente que es tangente a la función en el primer punto; calcular un punto de

intersección de la línea tangente y la línea de referencia, siendo el número de ciclo del punto de intersección el valor de umbral de ciclo Ct.

En ciertos modos de realización del producto informático, el primer punto tiene un número de ciclo de  $x_{val}$  y una intensidad de señal de  $y_{val}$ , y en el que la determinación de la línea tangente incluye determinar una pendiente (slp) de la función en  $\{x_{val}, y_{val}\}$  para obtener la línea tangente como  $y_{val} + slp (x - x_{val})$ , en la que  $x$  es el número de ciclo. En otros modos de realización del producto informático se determina que la línea de referencia tiene una forma funcional de  $ax + b$ , y en la que calcular el punto de intersección de la línea tangente y la línea de referencia incluye resolver la siguiente ecuación para  $x$ :

$$(a + bx) = y_{val} + slp (x - x_{val}).$$

En otros modos de realización del producto informático, la función tiene una forma funcional de sigmoide doble, y en la que el sigmoide doble tiene una ecuación:

$$a + bx + \frac{c}{(1 + \text{Exp}[-d(x - e)]) \cdot (1 + \text{Exp}[-f(x - g)])},$$

en la que las instrucciones comprenden además el cálculo de la segunda derivada de la función sigmoide doble.

## 20 X. Sistema de PCR

En ciertos aspectos, la invención también proporciona sistemas de PCR. En las FIGS. 11-12 se muestra un sistema de PCR ejemplar. La FIG. 11 muestra un diagrama de bloques general que explica la relación entre los recursos de software y hardware que se pueden usar para implementar el procedimiento y el sistema de la invención. El sistema representado en la FIG. 12 comprende un módulo de análisis cinético de PCR que puede estar situado en un dispositivo termociclador y un módulo de inteligencia que es parte del sistema informático. Los conjuntos de datos (conjuntos de datos de PCR) se transfieren del módulo de análisis al módulo de inteligencia o viceversa mediante una conexión de red o una conexión directa. Los conjuntos de datos se pueden procesar, por ejemplo, de acuerdo con el diagrama de flujo que se representa en la FIG. 4. Este diagrama de flujo se puede implementar convenientemente por un programa informático almacenado en el equipo de un sistema informático, por ejemplo, de acuerdo con el diagrama de flujo que se representa en la FIG. 11. Con referencia a la FIG. 11, el sistema informático (2000) puede comprender un medio de recepción (2010), por ejemplo, para recibir los datos de fluorescencia obtenidos durante las reacciones de PCR, un medio de cálculo (2020) para procesar dichos datos calculando una función que se aproxima al conjunto de datos, un primer medio de determinación (2030) para determinar una línea de referencia de la curva de crecimiento, que es una línea de referencia que es lineal, un primer medio de cálculo (2040) para determinar un primer punto de la función, en el que se produce un máximo en una segunda derivada de la función, un segundo medio de determinación (2050) para determinar una línea tangente que es tangente al primer punto determinado por el medio de cálculo 2040 y un segundo medio de cálculo (2060) para calcular un punto de intersección de la línea tangente y la línea de referencia y, de ese modo, determinar el valor de Ct. En ciertos modos de realización, el sistema puede comprender también un medio de visualización (2070) para visualizar los resultados en una pantalla de ordenador. La FIG. 12 ilustra la interacción entre el dispositivo termociclador y el sistema informático. El sistema comprende un módulo de análisis cinético de PCR que puede estar situado en un dispositivo termociclador y un módulo de inteligencia que es parte del sistema informático. Los conjuntos de datos (conjuntos de datos de PCR) se transfieren del módulo de análisis al módulo de inteligencia o viceversa mediante una conexión de red o una conexión directa. Los conjuntos de datos se pueden procesar de acuerdo con la FIG. 11 por un código informático que se ejecuta en el procesador y que está almacenado en el dispositivo de almacenamiento del módulo de inteligencia y después del procesamiento se vuelve a transferir al dispositivo de almacenamiento del módulo de análisis, en el que los datos modificados se pueden visualizar en un dispositivo de visualización. En algunos modos de realización, el módulo de inteligencia también se puede implementar en el termociclador.

En ciertos aspectos, la invención proporciona un sistema de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que comprende un dispositivo de adquisición de datos de PCR que genera un conjunto de datos de PCR que representa una curva de amplificación por PCR, incluyendo dicho conjunto de datos una pluralidad de puntos de datos, teniendo cada uno un par de valores de coordenadas, en el que dicho conjunto de datos incluye puntos de datos en una región de interés que incluye un valor de umbral de ciclo (Ct); y un módulo de inteligencia adaptado para procesar el conjunto de datos de PCR para determinar el valor de Ct, recibiendo un conjunto de datos que representa una curva de crecimiento, incluyendo el conjunto de datos una pluralidad de puntos de datos, teniendo cada punto de datos un par de valores de coordenadas de un número de ciclo y una intensidad de señal del procedimiento de crecimiento en el número de ciclo; calcular una función que se aproxima al conjunto de datos; determinar una línea de referencia de la curva de crecimiento, siendo la línea de referencia lineal; calcular un primer punto de la función en el que se produce un máximo en una segunda derivada de la función; determinar una línea tangente que es tangente a la función en el primer punto; calcular un punto de intersección de la línea tangente y la línea de referencia, siendo el número de ciclo del punto de intersección el valor de umbral de ciclo Ct. En ciertos modos de realización del sistema de PCR, el primer

punto tiene un número de ciclo de  $x_{val}$  y una intensidad de señal de  $y_{val}$ , y en el que la determinación de la línea tangente incluye determinar una pendiente ( $slp$ ) de la función en  $\{x_{val}, y_{val}\}$  para obtener la línea tangente como  $y_{val} + slp (x - x_{val})$ , en la que  $x$  es el número de ciclo. En otros modos de realización del sistema de PCR se determina que la línea de referencia tiene una forma funcional de  $ax + b$ , y en la que calcular el punto de intersección de la línea tangente y la línea de referencia incluye resolver la siguiente ecuación para  $x$ :

$$(a + bx) = y_{val} + slp (x - x_{val})$$

10 En otros modos de realización del sistema de PCR, la función tiene una forma funcional de sigmoide doble, y en la que el sigmoide doble tiene una ecuación:

$$a + bx + \frac{c}{(1 + \text{Exp} [-d (x - e)]) \cdot (1 + \text{Exp} [-f (x - g)])}$$

15 en la que las instrucciones comprenden además el cálculo de la segunda derivada de la función sigmoide doble.

Una mención de "uno", "una" o "el", "la" pretende indicar "uno o más", a menos que se indique específicamente lo contrario.

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para determinar un valor de umbral de ciclo Ct en una curva de crecimiento de un procedimiento de crecimiento, comprendiendo el procedimiento:
- 5 - recibir un conjunto de datos que representa una curva de crecimiento, incluyendo el conjunto de datos una pluralidad de puntos de datos, teniendo cada punto de datos un par de valores de coordenadas de un número de ciclo y una intensidad de señal del procedimiento de crecimiento en el número de ciclo;
- calcular una función que se aproxima al conjunto de datos;
- determinar una línea de referencia de la curva de crecimiento, siendo la línea de referencia lineal;
- 10 - calcular, con un sistema informático, un primer punto de la función en el que se produce un máximo en una segunda derivada de la función;
- determinar, con el sistema informático, una línea tangente que es tangente a la función en el primer punto;
- calcular, con el sistema informático, un punto de intersección de la línea tangente y la línea de referencia, siendo el número de ciclo del punto de intersección el valor de umbral de ciclo Ct.
- 15
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el primer punto tiene un número de ciclo de xval y una intensidad de señal de yval, y en el que la determinación de la línea tangente incluye determinar una pendiente (slp) de la función en {xval, yval} para obtener la línea tangente como  $yval + slp (x - xval)$ , en la que x es el número de ciclo.
- 20
3. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que se determina que la línea de referencia tiene una forma funcional de  $ax + b$ , y en la que calcular el punto de intersección de la línea tangente y la línea de referencia incluye resolver la siguiente ecuación para x:
- 25
- $$(a + bx) = yval + slp (x - xval).$$
4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la función tiene una forma funcional de sigmoide doble y en el que el sigmoide doble tiene una ecuación:
- 30
- $$a + bx + \frac{c}{(1 + Exp [-d (x - e)]) \cdot (1 + Exp [-f (x - g)])}.$$
5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el procedimiento de crecimiento es una amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- 35
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además:
- eliminar una parte de los puntos de datos antes de calcular la función.
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la línea de referencia se determina a partir de la función.
- 40
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además:
- calcular la segunda derivada de la función.
9. Un producto informático que comprende un medio legible por ordenador no transitorio que almacena una pluralidad de instrucciones que, cuando se ejecutan, controlan un sistema informático para determinar un valor de umbral de ciclo Ct en una curva de crecimiento de un procedimiento de crecimiento, comprendiendo las instrucciones:
- 45 - recibir un conjunto de datos que representa una curva de crecimiento, incluyendo el conjunto de datos una pluralidad de puntos de datos, teniendo cada punto de datos un par de valores de coordenadas de un número de ciclo y una intensidad de señal del procedimiento de crecimiento en el número de ciclo;
- calcular una función que se aproxima al conjunto de datos;
- 50 - determinar una línea de referencia de la curva de crecimiento, siendo la línea de referencia lineal;
- calcular un primer punto de la función en el que se produce un máximo en una segunda derivada de la función;
- determinar una línea tangente que es tangente a la función en el primer punto;
- calcular un punto de intersección de la línea tangente y la línea de referencia, siendo el número de ciclo del punto de intersección el valor de umbral de ciclo Ct.
- 55
10. El producto informático de la reivindicación 9, en el que el primer punto tiene un número de ciclo de xval y una intensidad de señal de yval, y en el que la determinación de la línea tangente incluye determinar una pendiente (slp) de la función en {xval, yval} para obtener la línea tangente como  $yval + slp (x - xval)$ , en la que x es el número de ciclo.
- 60
11. El producto informático de una cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10, en el que se determina que la línea de referencia tiene una forma funcional de  $ax + b$ , y en la que calcular el punto de intersección de la línea tangente y la línea de referencia incluye resolver la siguiente ecuación para x:

$$(a + bx) = yval + slp (x - xval).$$

12. El producto informático de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que la función tiene una forma funcional de sigmoide doble y en el que el sigmoide doble tiene una ecuación:

5

$$a + bx + \frac{c}{(1 + \text{Exp} [-d (x - e)]) \cdot (1 + \text{Exp} [-f (x - g)])},$$

en el que las instrucciones comprenden además:

- calcular la segunda derivada de la función sigmoide doble.

10

13. Un sistema de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que comprende:

- un dispositivo de adquisición de datos de PCR que genera un conjunto de datos de PCR que representa una curva de amplificación por PCR, incluyendo dicho conjunto de datos una pluralidad de puntos de datos, teniendo cada uno un par de valores de coordenadas, en el que dicho conjunto de datos incluye puntos de datos en una región de interés que incluye un umbral de ciclo (Ct); y

15

- un módulo de inteligencia adaptado para procesar el conjunto de datos de PCR para determinar el valor de Ct, mediante las etapas de:

- recibir un conjunto de datos que representa una curva de crecimiento, incluyendo el conjunto de datos una pluralidad de puntos de datos, teniendo cada punto de datos un par de valores de coordenadas de un número de ciclo y una intensidad de señal del procedimiento de crecimiento en el número de ciclo;

20

- calcular una función que se aproxima al conjunto de datos;

- determinar una línea de referencia de la curva de crecimiento, siendo la línea de referencia lineal;

- calcular un primer punto de la función en el que se produce un máximo en una segunda derivada de la función;

- determinar una línea tangente que es tangente a la función en el primer punto;

25

- calcular un punto de intersección de la línea tangente y la línea de referencia, siendo el número de ciclo del punto de intersección el valor de umbral de ciclo Ct.

14. El sistema de PCR de la reivindicación 13, en el que el primer punto tiene un número de ciclo de xval y una intensidad de señal de yval, y en el que la determinación de la línea tangente incluye determinar una pendiente (slp) de la función en {xval, yval} para obtener la línea tangente como  $yval + slp (x - xval)$ , en la que x es el número de ciclo.

30

15. El sistema de PCR de una cualquiera de las reivindicaciones 13 o 14, en el que se determina que la línea de referencia tiene una forma funcional de  $ax + b$ , y en la que calcular el punto de intersección de la línea tangente y la línea de referencia incluye resolver la siguiente ecuación para x:

35

$$(a + bx) = yval + slp (x - xval).$$

16. El sistema de PCR de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en el que la función tiene una forma funcional de sigmoide doble y en el que el sigmoide doble tiene una ecuación:

40

$$a + bx + \frac{c}{(1 + \text{Exp} [-d (x - e)]) \cdot (1 + \text{Exp} [-f (x - g)])},$$

en el que las instrucciones comprenden además:

- calcular la segunda derivada de la función sigmoide doble.

FIG. 1A

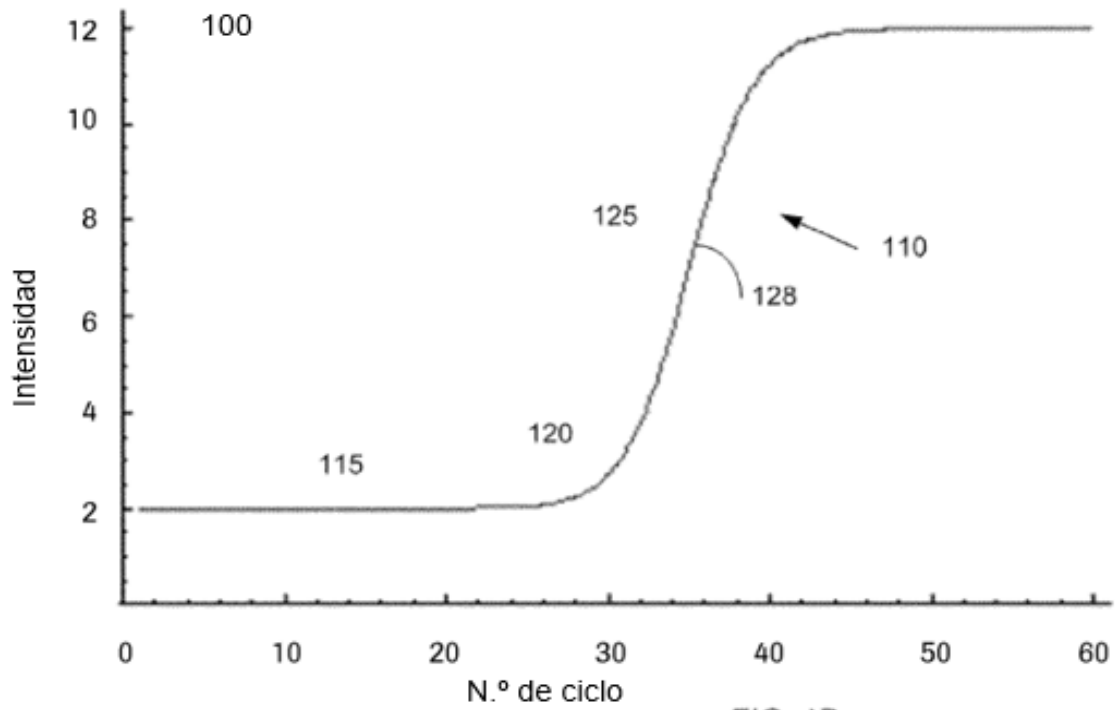
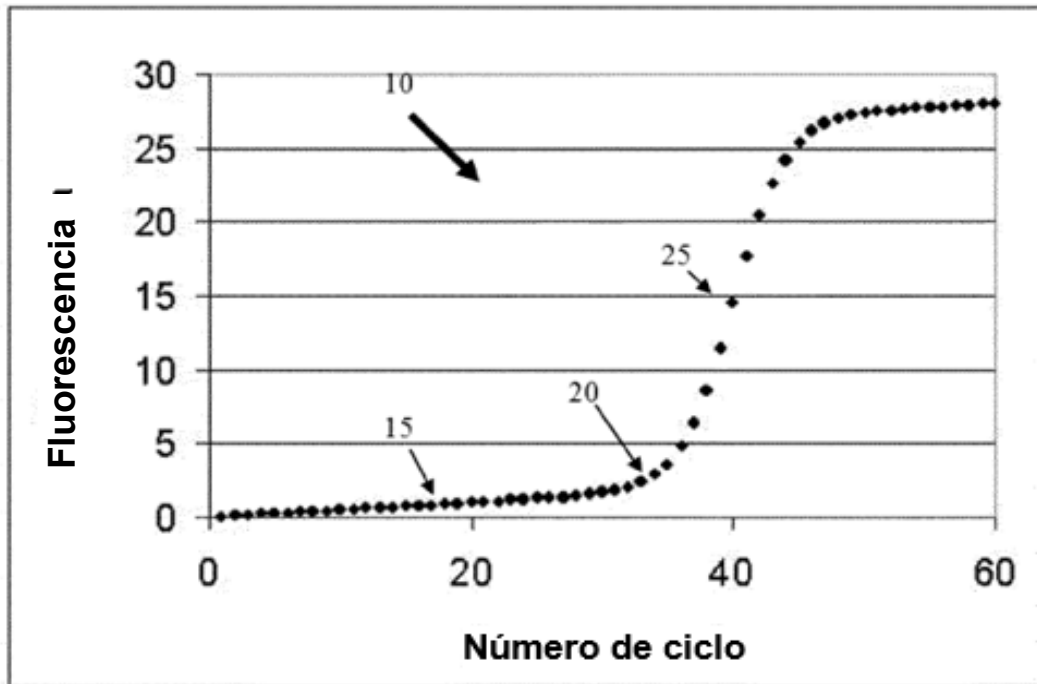


FIG. 1B



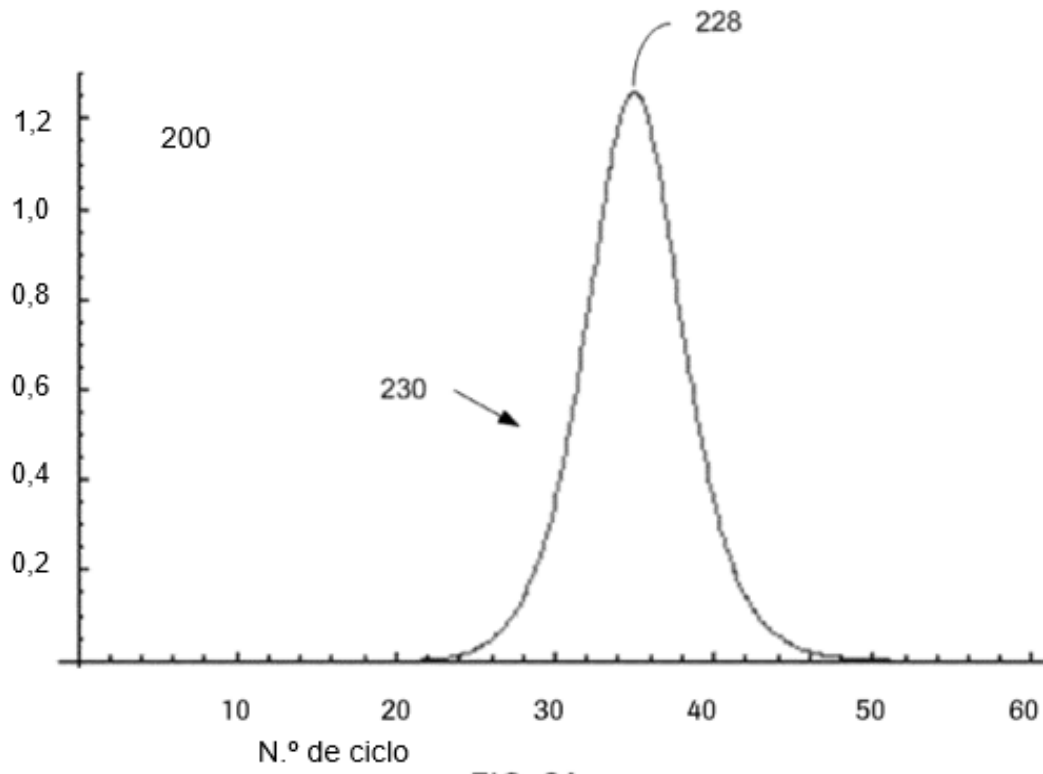


FIG. 2A

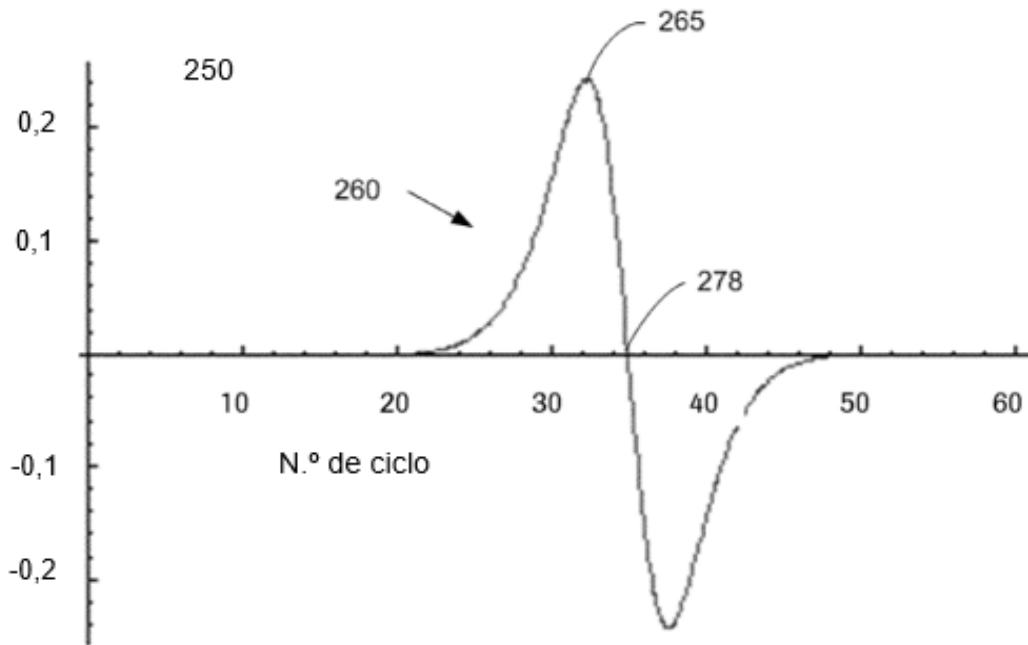


FIG. 2B

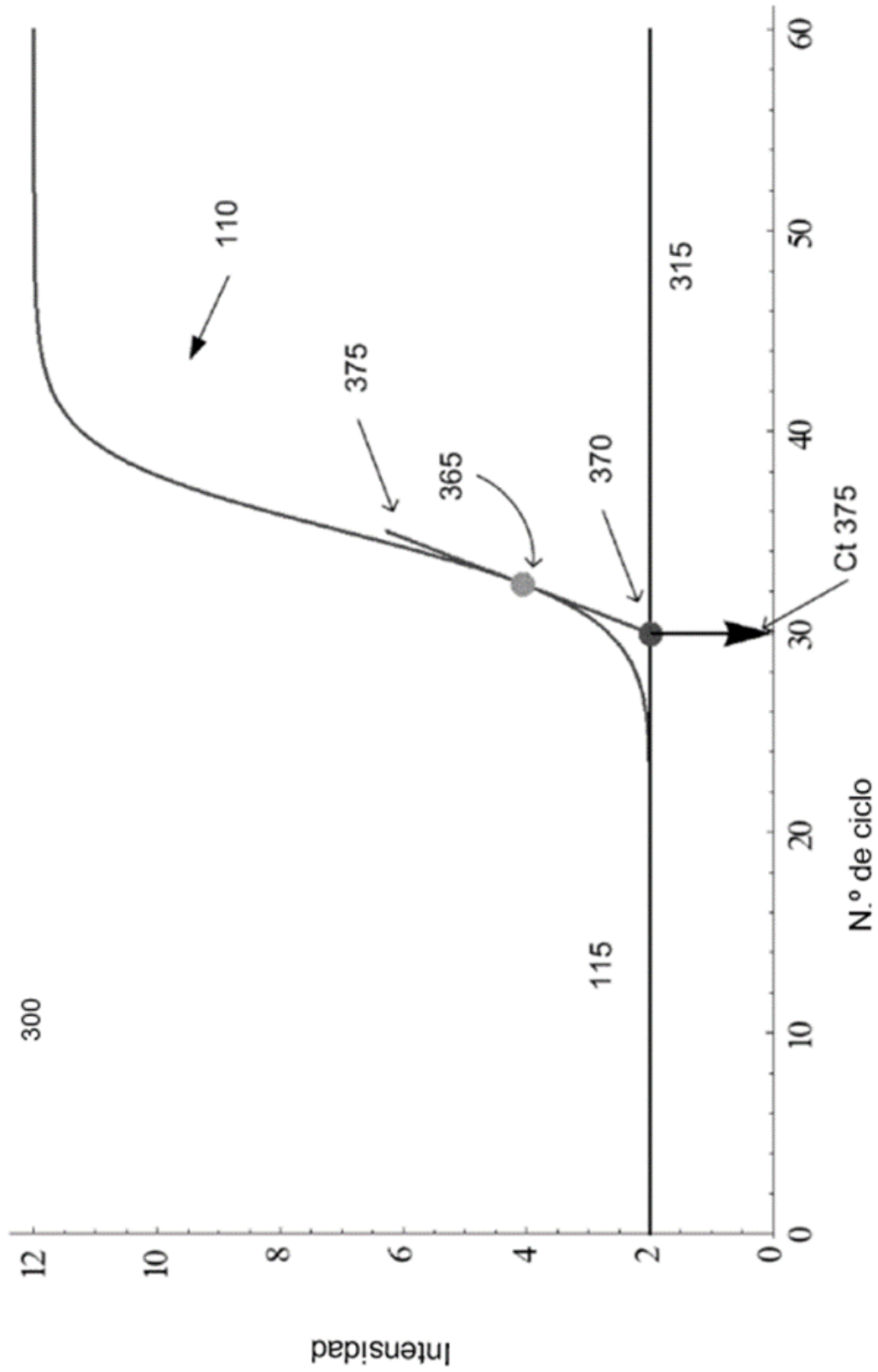


FIG. 3

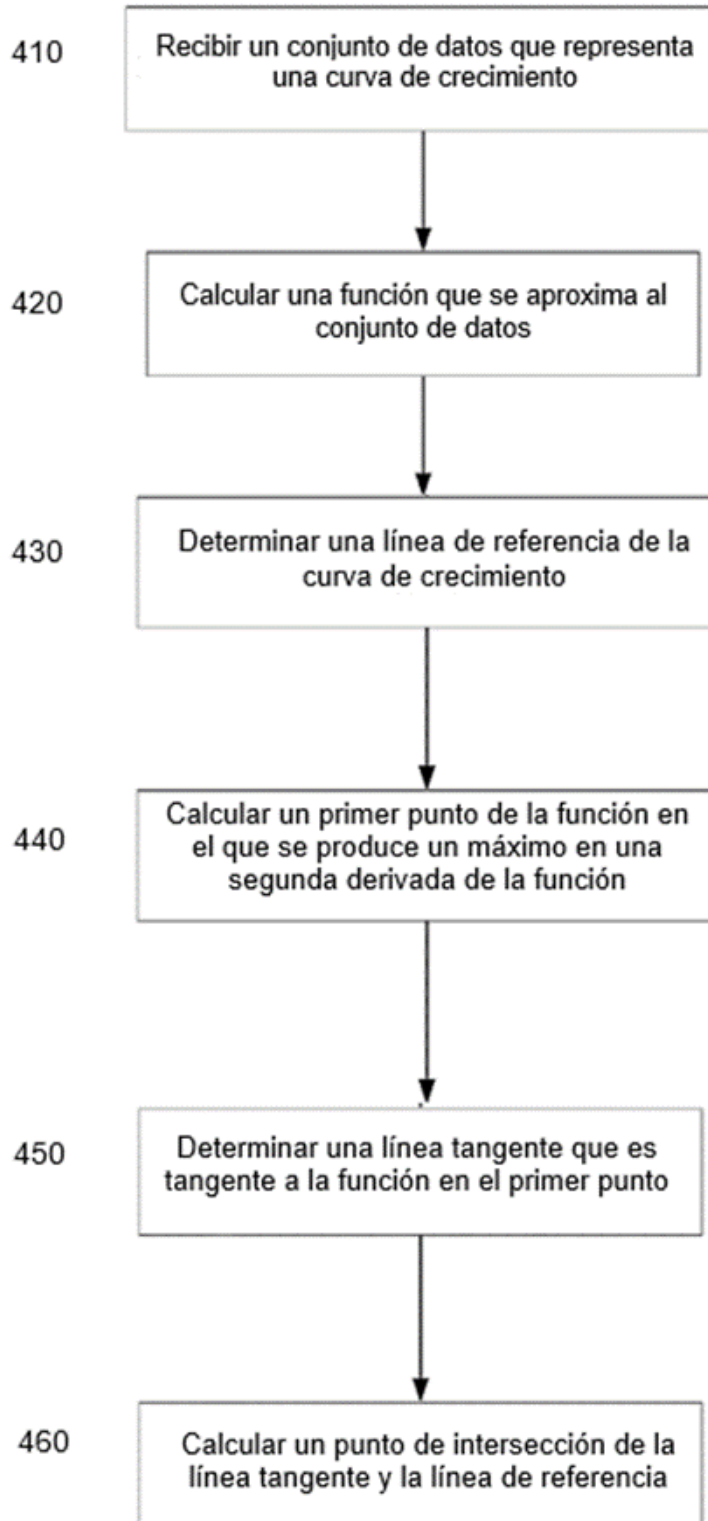
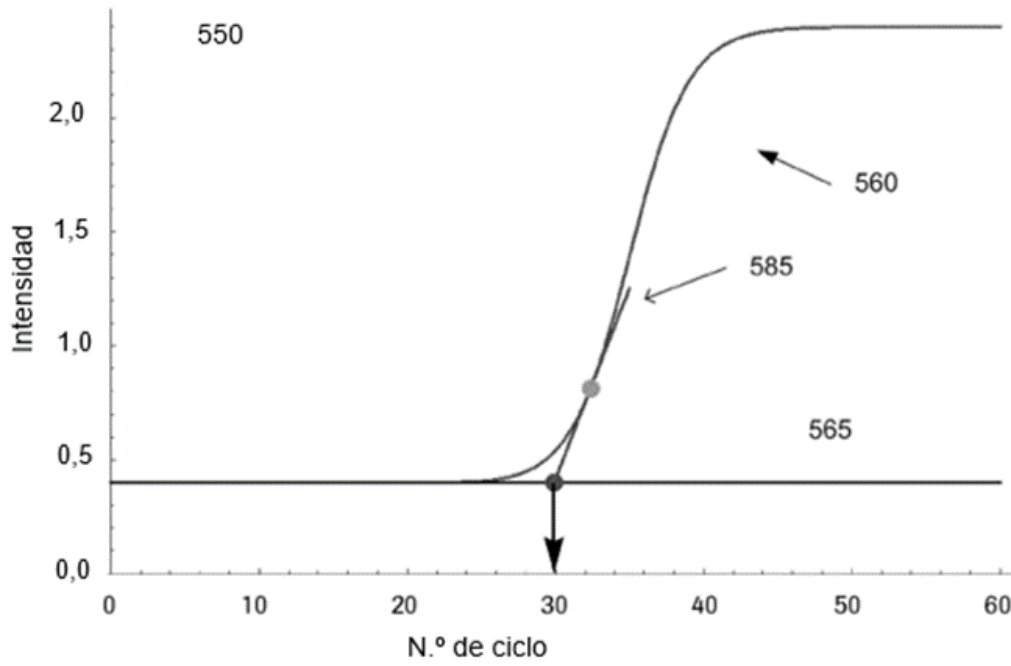
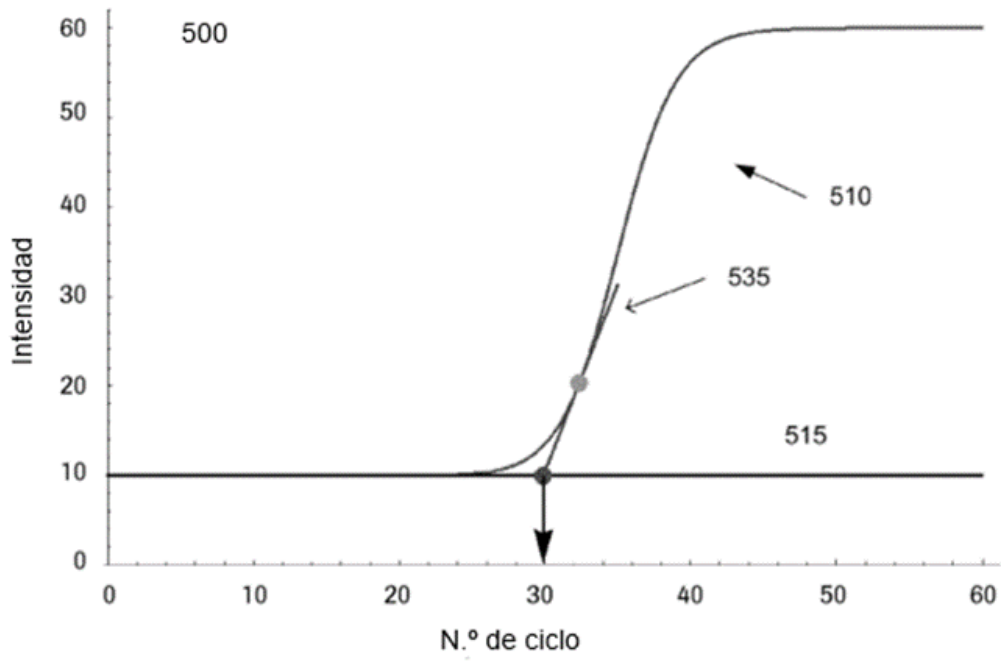
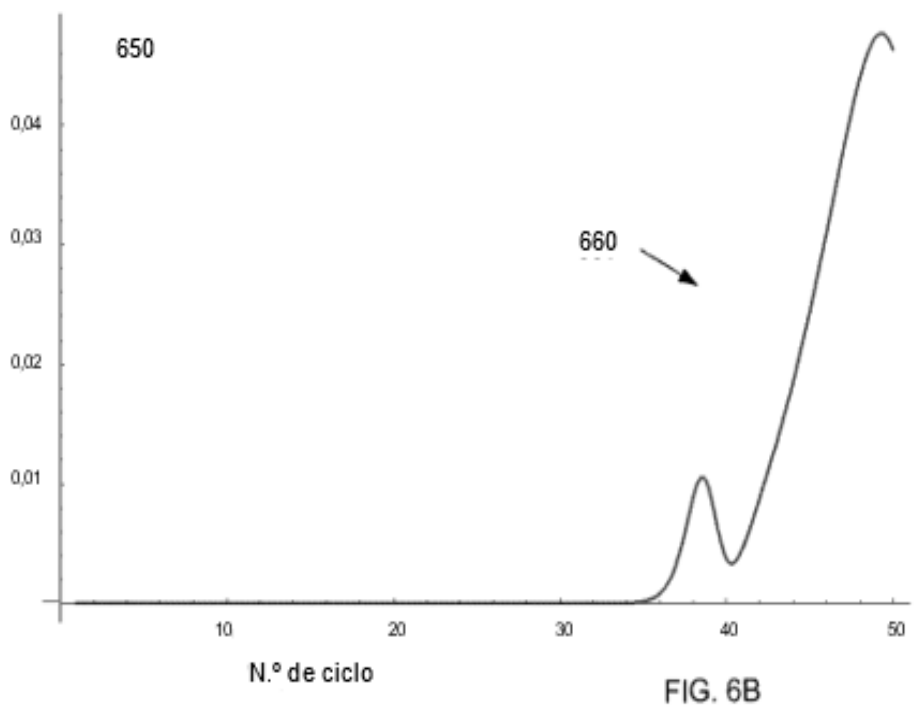
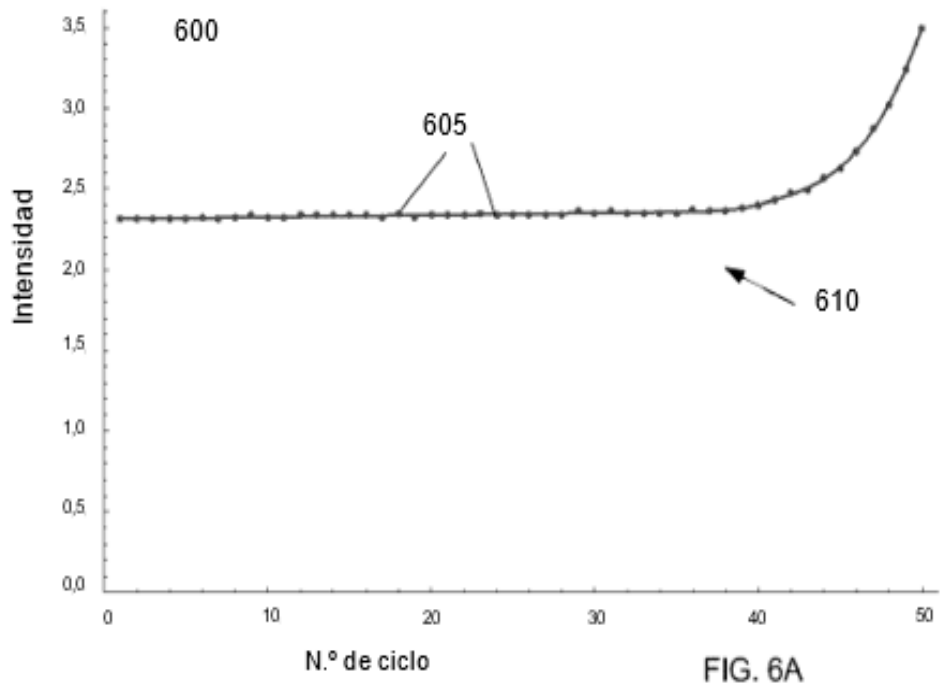


FIG. 4





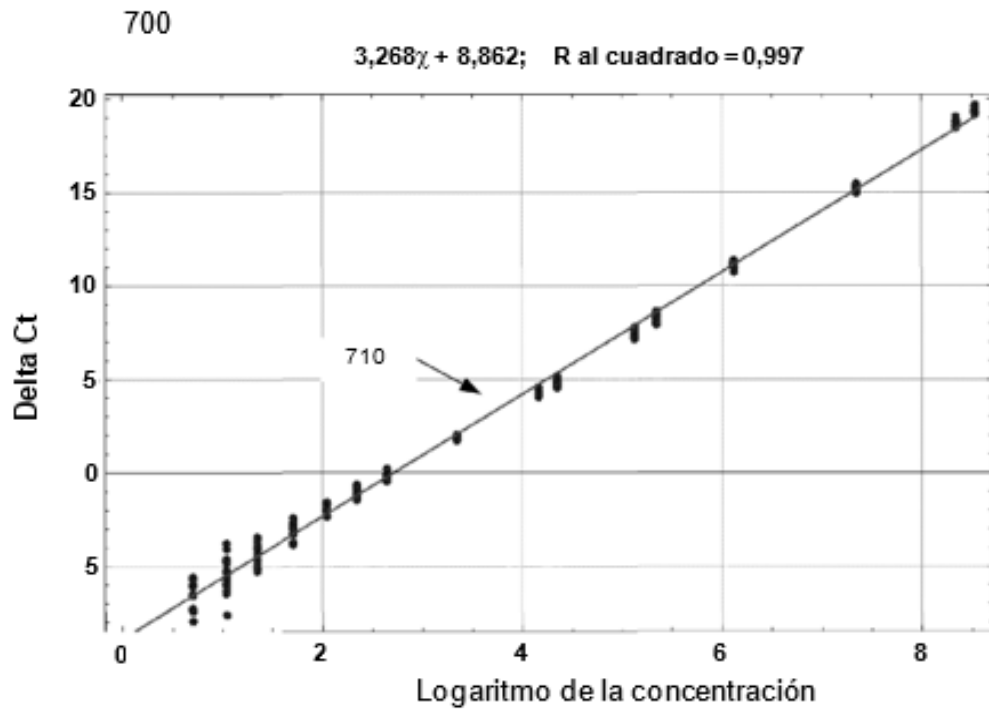


FIG. 7A

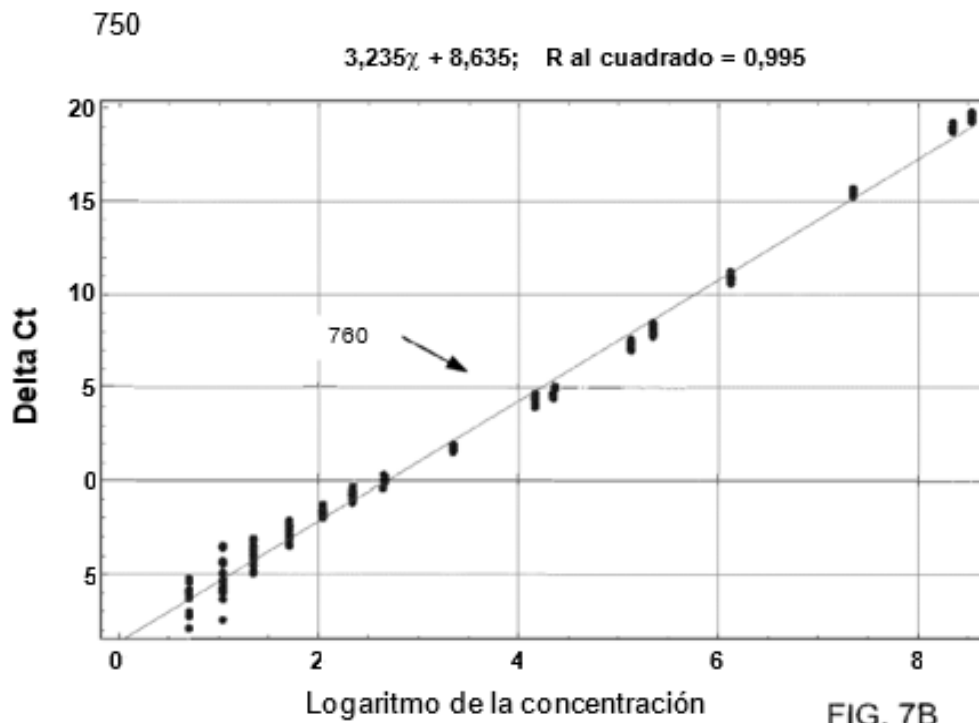


FIG. 7B

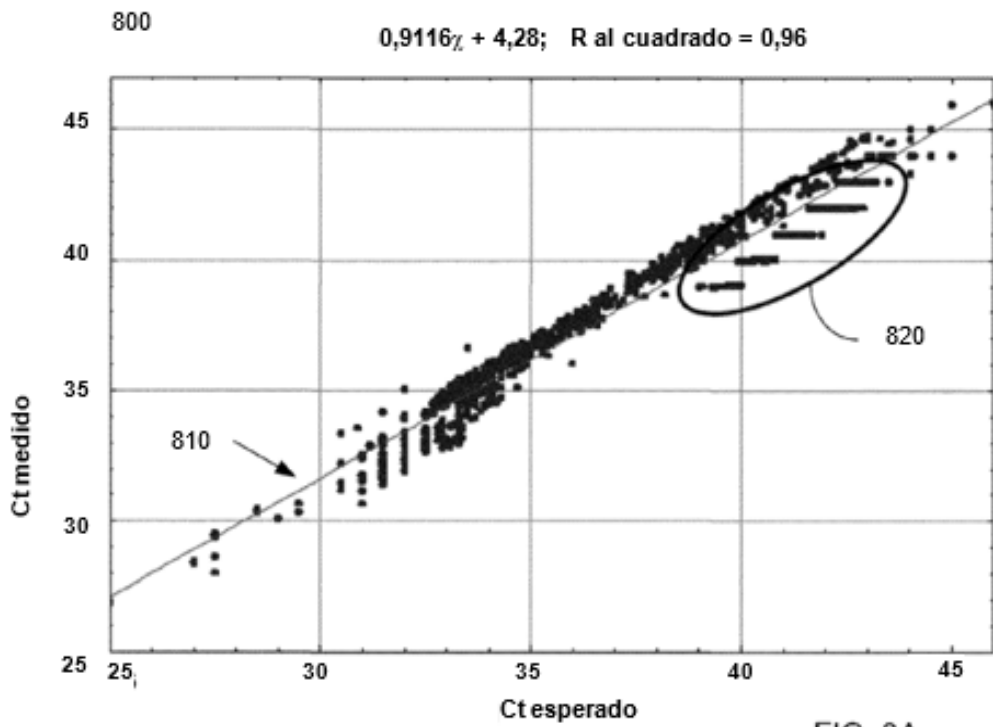


FIG. 8A

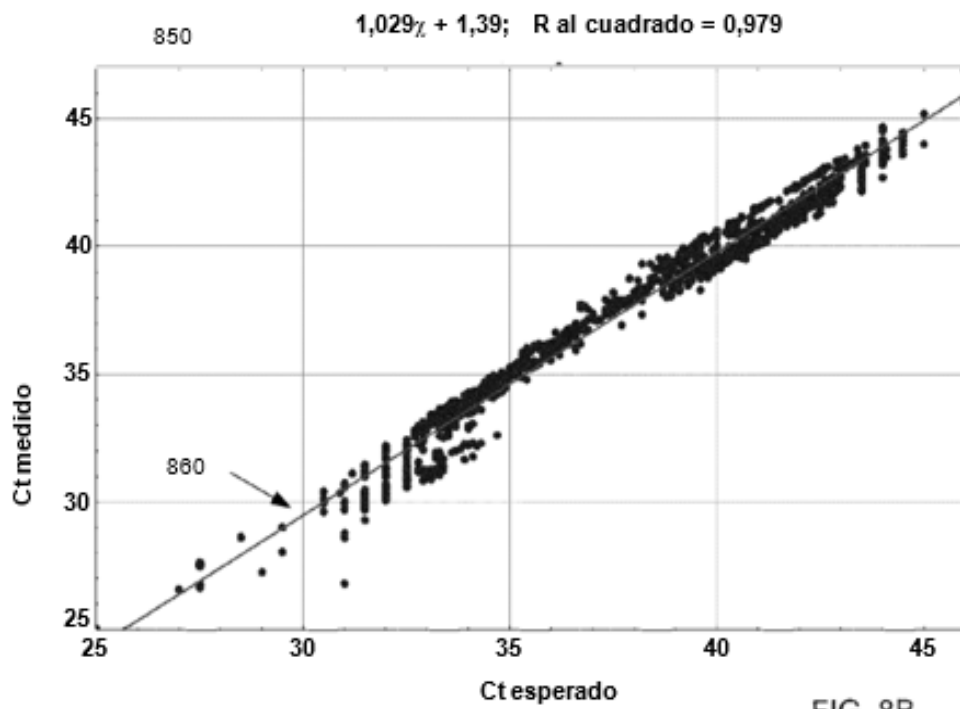


FIG. 8B

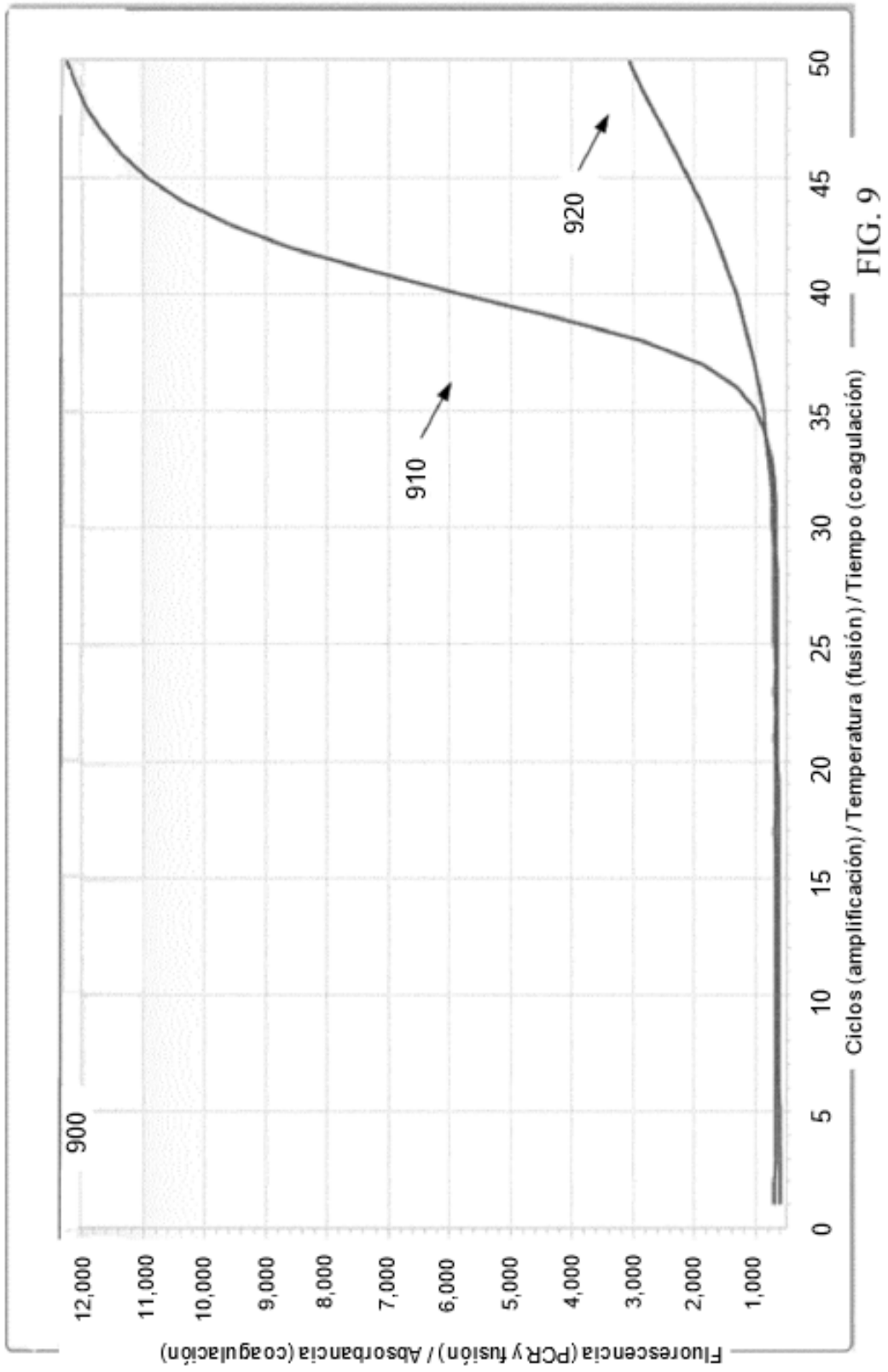


FIG. 9



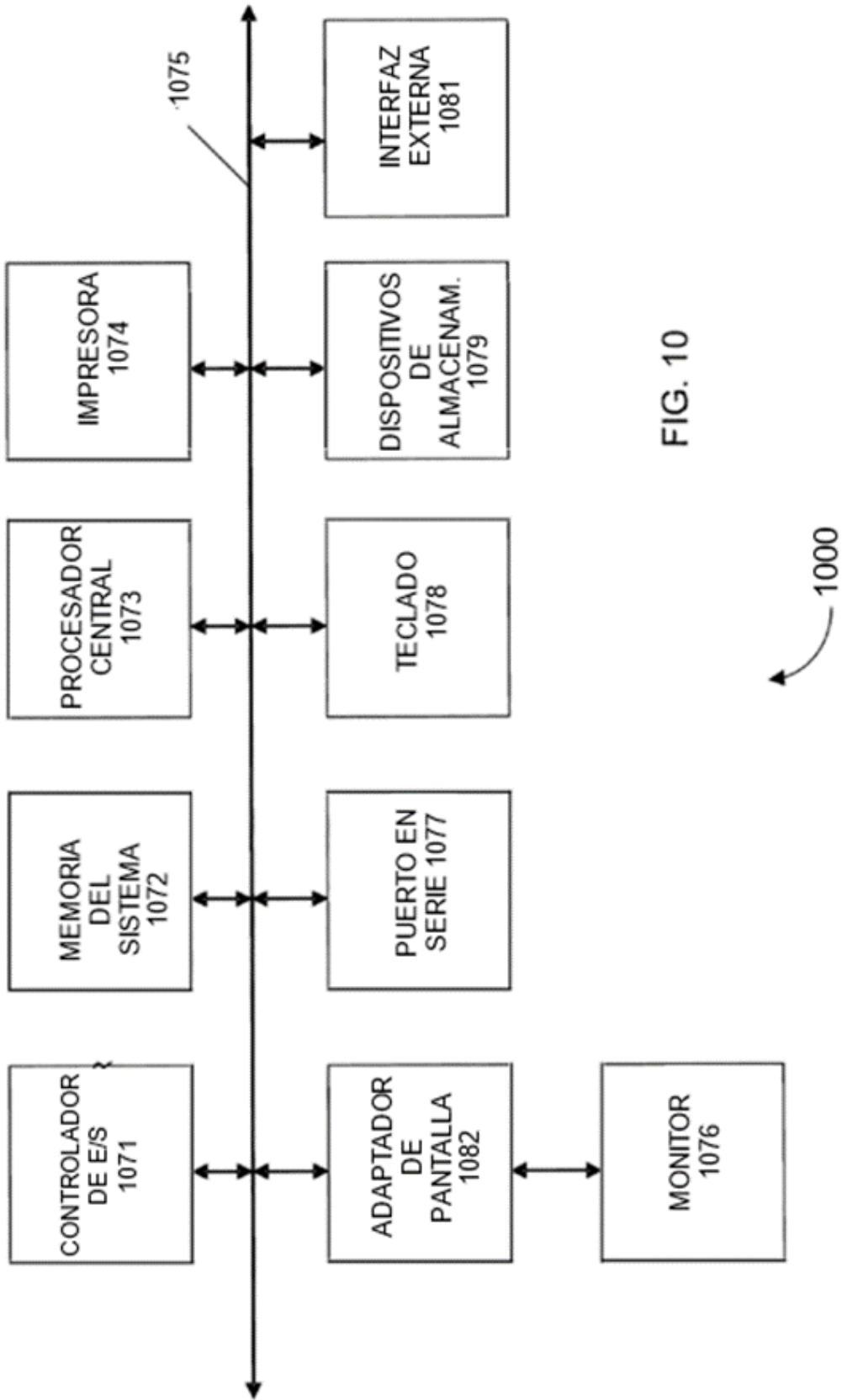


FIG. 10

Fig. 11

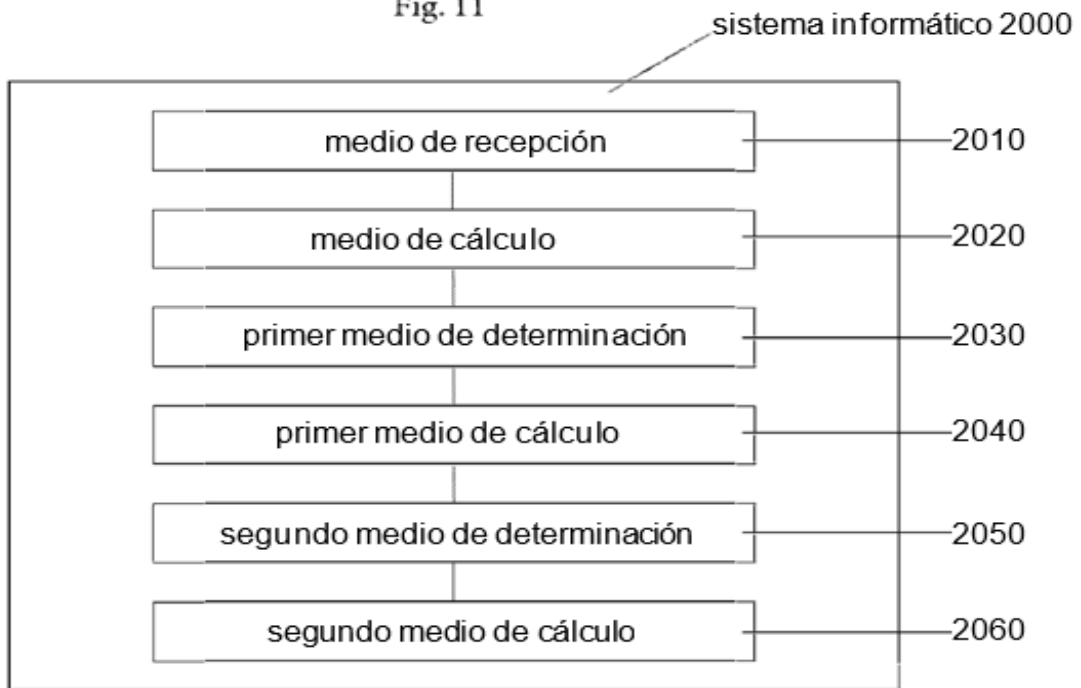


Fig. 12

