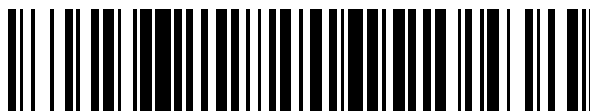


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 713 170**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6851 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.11.2015 PCT/EP2015/076544**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.05.2016 WO16075283**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.11.2015 E 15807815 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.01.2019 EP 3218516**

54 Título: **Método para determinar una propiedad de una muestra de partida**

30 Prioridad:

13.11.2014 EP 14193074

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

20.05.2019

73 Titular/es:

**CURETIS GMBH (100.0%)
Max-Eyth-Strasse 42
71088 Holzgerlingen, DE**

72 Inventor/es:

**KOLTZSCHER, MAX y
SCHMIDT, CHRISTIAN**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 713 170 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

Método para determinar una propiedad de una muestra de partida

La invención se refiere a un método para determinar una propiedad de una muestra de partida, por ejemplo la cantidad del ácido nucleico (ADN) presente en la misma.

- 5 La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método para amplificar el ADN que permite detectar incluso cantidades muy pequeñas de ADN. Dicho método comprende un número determinado respectivamente de ciclos compuestos de calentamiento y enfriamiento repetidos de la mezcla de reacción para la fusión y para la replicación enzimática del ADN de muestra (ADN diana) presente en el mismo. Mientras la reacción está procediendo, el ADN producido en el ciclo anterior respectivo (o en los ciclos anteriores) sirve como matriz (plantilla) para la replicación del ADN en el ciclo de ejecución respectivo. Esto lleva a una multiplicación exponencial (amplificación) del ADN, que en el caso ideal se duplica en cada ciclo.

- 10 La llamada PCR en tiempo real (o también PCR cuantitativa, qPCR) se caracteriza porque la acumulación del producto de PCR (ADN) se detecta durante la PCR en ejecución, es decir en tiempo real. Para este propósito, se agrega a la reacción un colorante fluorescente inicialmente inactivo que se hace activo mediante la replicación de ADN. La fluorescencia se mide en cada ciclo - es decir "en tiempo real", y la cantidad del ADN amplificado se puede inferir de ahí.

15 Por consiguiente, la qPCR se puede usar para determinar el número de las copias del ADN originalmente presente en la muestra de partida. La determinación sigue el principio general de que el número de copias de partida es mayor cuanto antes se pueda detectar una acumulación significativa del producto de PCR.

- 20 La monitorización de la acumulación del producto de PCR se basa como norma en la detección de radiación de fluorescencia que se emite después de la excitación de la mezcla de reacción, y que es directamente proporcional a la cantidad del producto de PCR.

- 25 Las tecnologías de PCR, y entre ellas precisamente la qPCR, se establecieron en el pasado en el área de pruebas en puntos de atención, en la que los exámenes de diagnóstico se realizan no en laboratorios centrales, sino in situ, por ejemplo en un hospital, una práctica médica o farmacia. Dado que los diagnósticos en puntos de atención también se llevan a cabo en algunas circunstancias por personal menos calificado, aquí hay una necesidad de técnicas de examen y evaluación que sean particularmente inmunes al ruido y lo más objetivas posible. El documento WO03029924 divulga un método para calcular una línea de base adaptativa para una pluralidad de pozos de muestra por medio de los cuales el ciclo de partida y ciclo final se determinan de cada pozo.

- 30 Es conocido por Wiesner et al. (Nucl. Acids Res., .20, 5863-5864 (1992)) que evaluar los datos de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) adoptando el procedimiento que para cada representación gráfica de un conjunto de datos de resultados en el que para una multiplicidad de valores de ciclo (n) se asigna un valor de resultado (y) a un valor de ciclo respectivo (n) y entonces la concentración inicial (c) en la muestra y la eficiencia de amplificación E se determina mediante regresión lineal de los valores de resultado (y) en el forma de

$$35 \quad \text{Log(valor de resultado)} = \text{Log(eficiencia de amplificación)} \times \text{valor de ciclo} + \text{Log(concentración inicial c)}$$

($\log N_n = \log eff \cdot n + \log N_0$, en notación de Wiesner). Este método no funciona de manera confiable en el caso de señales de medición muy ruidosas, en particular.

- 40 Frente a dicho antecedente, el objetivo de la invención era proponer un método para determinar una propiedad de una muestra de partida que al menos ya no tenga una de las desventajas de la técnica anterior, o que al menos proponga un método para determinar una propiedad de una muestra de partida que difiere de la técnica anterior.

- 45 La invención procede de la idea fundamental de que con el fin de determinar la propiedad de la muestra de partida es necesario determinar un conjunto de datos a partir de un conjunto de datos de resultados, y esa importancia particular se une con la determinación del conjunto de datos, en particular del último valor de ciclo del conjunto de datos, dado que la determinación de la propiedad solo se puede llevar a cabo de manera no confiable con un conjunto de datos que sea demasiado amplio o demasiado estrecho en su alcance. En este caso, en el conjunto de datos de resultados para una multiplicidad de valores de ciclo se asigna un valor de resultado a un valor de ciclo respectivo, y en el conjunto de datos para una pluralidad de valores de ciclo se asigna un valor de resultado a un valor de ciclo respectivo, la multiplicidad de los valores de ciclo incluidos en el conjunto de datos de resultados que es mayor que la pluralidad de los valores de ciclo incluidos en el conjunto de datos.

- 50 La invención asimismo procede de la conclusión de que los errores de medición incluidos en los valores de resultado deben tenerse en cuenta al determinar las propiedades de la muestra de partida. Por esta razón, una realización de la invención proporciona el uso de un ajuste de curva para calcular a partir del conjunto de datos los parámetros de una función que expresa un valor de resultado como una función del valor de ciclo, conteniendo la función un término

exponencial en el que un valor inicial (c) se presenta como parámetro, y en el que el valor de ciclo se presenta como exponente (n), habiéndose reconocido de acuerdo con la invención que dicha función tiene un término de sistema agregado al término exponencial. De acuerdo con dicha realización, se supone en la invención que la propiedad a determinar se puede determinar sobre la base del parámetro encontrado para el valor inicial (c) en el ajuste de curva.

5 La invención se distingue de esa manera del enfoque procedimental de Wiesner et al. (Nucl. Acids Res., .20, 5863-5864 (1992)) dado que se reconoció allí que solo un conjunto de datos se puede expresar mediante la función $\log N_n = \log e^{ff} \cdot n + \log N_0$, es decir el logaritmo de una función que expresa un valor de resultado (N_n) como una función del valor de ciclo (n), incluyendo la función, antes de ser logaritimizada, un término exponencial en el cual un valor inicial (N_0) se presenta como parámetro, y en el cual el valor de ciclo (n) se presenta como exponente. Sin embargo, dicho enfoque procedimental ignora por completo las influencias resultantes del sistema para producir el conjunto de datos, y por lo tanto no es adecuado para ser usado de la manera más automática posible. Un enfoque tal en gran parte muy automático, y por lo tanto confiable, se desea precisamente para un diagnóstico en puntos de atención basado en una PCR.

10 De acuerdo con la invención, se ha reconocido que las influencias del sistema para producir el conjunto de datos se expresan mejor mediante un término de sistema agregado al término exponencial. Solo si la influencia del sistema y el crecimiento exponencial se contabilizan conjuntamente en el ajuste de curva, se puede generar de manera confiable un valor para el valor inicial (c) sobre la base de la cual la propiedad a determinar se puede generar de manera confiable.

15 El método de acuerdo con la invención usa un conjunto de datos en el que se asigna un valor de resultado a un valor de ciclo respectivo para una pluralidad de valores de ciclo. Preferiblemente en este caso se refiere a un conjunto de datos en el que la pluralidad de valores de ciclo es una secuencia de números naturales, en particular una secuencia de números naturales en el caso de que un número natural sea seguido como continuación de valor de ciclo por el siguiente número natural en la sucesión de los números naturales (por ejemplo, "1, 2, 3, 4, 5, ..." o "3, 4, 5, 6, 7, 8, ...").

20 En la mayoría de las aplicaciones de la invención, y de este modo de acuerdo con una realización preferida, el conjunto de datos consiste de una serie de emparejamientos de valores que comprenden un valor de ciclo y el valor de resultado asignado respectivamente a él, a los que la secuencia de los emparejamientos de valores dentro del conjunto de datos resulta del orden secuencial en el que se registran los valores medidos para producir valores de resultado. En una realización particularmente preferida, el segundo emparejamiento de valores, que sigue como continuación de un primer emparejamiento de valores dentro de la secuencia, es el emparejamiento de valores que se produce a partir de los valores medidos que se registraron como continuación después de los valores medidos que se registraron para producir el primer emparejamiento de valores.

25 En el caso de la qPCR, el valor de resultado es preferiblemente la intensidad de fluorescencia y se mide al final de un ciclo respectivo. Dicha intensidad de fluorescencia se representa usualmente sin dimensiones en unidades arbitrarias.

30 El método de acuerdo con la invención lleva a cabo un ajuste de curva en el conjunto de datos. A veces los ajustes de curva también se denominan cálculo de compensación, compensación, estimación de parámetros, coincidencias, regresión o ajuste. En una realización preferida, el método de mínimos cuadrados se usa como ajuste de curva.

35 De acuerdo con el método de la invención, los ajustes de curva llevados a cabo en el conjunto de datos con el fin de emplear los datos del conjunto de datos para determinar los parámetros de una función que expresa un valor de resultado como una función del valor de ciclo, incluyendo la función un término exponencial en el que un valor inicial (c) se presenta como parámetro, y en el que el valor de ciclo se presenta como exponente, y la función tiene un término de sistema agregado al término exponencial. Dicha función también se puede expresar de la siguiente forma

$$F(n) = A + c E^n,$$

40 Siendo $F(n)$ el valor calculado por la función que se correlaciona con el valor de resultado relacionado con el valor de ciclo respectivo (n), siendo A el término de sistema, y siendo cE^n el término exponencial en el que un valor inicial (c) se presenta como parámetro y en el que el valor de ciclo (n) se presenta como exponente. En una realización preferida, el parámetro E del término exponencial puede ser una medida de la eficiencia de la amplificación.

45 En una realización preferida, el término de sistema A puede expresarse mediante la relación $A = a + b \cdot n$. En este caso, el parámetro (a) puede entenderse como una medida del valor medio del ruido de fondo en la producción de los valores de resultado. El parámetro (b) puede usarse en una realización preferida con el propósito de describir el efecto de que los valores de resultado producidos podrían volverse más pequeños o más grandes hacia el principio.

50 En una realización preferida, por lo tanto se lleva a cabo un ajuste de curva en el conjunto de datos con el fin de usar los datos del conjunto de datos para determinar los parámetros de una función que incluye al menos el término $a + b \cdot n + cE^n$. Particularmente preferido es un ajuste de curva en el conjunto de datos con el objetivo de usar los datos del conjunto de datos para determinar los parámetros de una función que pueden expresarse mediante $a + b \cdot n + cE^n$.

En una realización preferida, el término A que en una realización preferida se elige para ser un término lineal ($a + b \cdot n$) puede suplementarse por términos adicionales, con el fin, por ejemplo, de formar un polinomio de grado n° . De este modo es posible determinar el parámetro direccionado (c) de manera aun más precisa en el curso del ajuste de curva.

5 El parámetro encontrado para el valor inicial (c) en el ajuste de curva puede representar directamente la propiedad a determinar. En una realización preferida, con el fin de generar la propiedad a determinar el parámetro encontrado para el valor inicial (c) en el ajuste de curva se multiplica por un factor específico de sistema s. Si, por ejemplo, la cantidad de ADN original (Q_e) de una muestra es direccionada como propiedad a determinar, dicha cantidad se puede determinar usando la fórmula $Q_e = s \cdot c$. El factor específico de sistema s se puede determinar fácilmente con la ayuda de una muestra de referencia cuya cantidad de ADN original se conoce, y se lleva a cabo usando el método de acuerdo con la invención con el fin de usar la fórmula $Q_e/c = s$ con la ayuda del parámetro c de este modo determinado y la cantidad de ADN original (Q_e) conocida por la muestra de referencia para determinar el factor s. El factor s también se puede usar para expresar el parámetro en las unidades deseadas, por ejemplo en una PCR la cantidad de ADN en la muestra original puede expresarse sin dimensiones como número de copias o como concentración, por ejemplo como g/l o mol/l

15 En una realización alternativa, la propiedad de la muestra de partida se obtiene sobre la base de cálculos adicionales. Habiendo identificado el término de sistema A de la manera descrita anteriormente, es posible crear un conjunto de datos modificado restando de cada valor de resultado en el conjunto de datos el valor del término de sistema A aplicable para el valor de ciclo de ese valor de resultado. Si el término de sistema A encontrado es una constante, esta constante se resta de cada valor de resultado del conjunto de datos para crear el conjunto de datos modificado. Si el término de sistema A es una función del valor de ciclo, por ejemplo si $A = a + b \cdot n$, de cada valor de resultado el término de sistema A aplicable para el valor de ciclo correspondiente a este valor de resultado se resta del valor de resultado para crear un valor de resultado modificado que será parte del conjunto de datos modificado. Si se trazara el conjunto de datos modificado, los puntos trazados estarían mucho más cerca a una curva exponencial limpia que si se trazara el conjunto de datos, puesto que los datos del conjunto de datos modificado se han liberado de cualquier ambigüedad que se origine del sistema. Esta curva exponencial podría expresarse como $F(n) = c E^n$. En esta realización alternativa, el valor inicial (c) podría determinarse llevando a cabo un ajuste de curva en partes del conjunto de datos modificado, por ejemplo un ajuste de curva a la expresión $F(n) = c E^n$. Alternativamente se puede crear un conjunto de datos logarítmicos a partir del conjunto de datos modificado. Para crear el conjunto de datos logarítmicos, se toma el logaritmo de cada valor de resultado modificado para crear un valor de resultado logarítmico. Por ejemplo se puede tomar el logaritmo natural o un logaritmo para la base 2 o un logaritmo para la base 10 o cualquier otra base adecuada. Una representación gráfica de partes del conjunto de datos logarítmicos sería aproximadamente una línea recta ($\ln(c E^n) = n \cdot \ln(E) + \ln(c)$). Al realizar un ajuste de curva del valor de resultado logarítmico a la expresión $n \cdot \ln(E) + \ln(c)$, el valor inicial (c) se puede encontrar desde el punto de intersección con la ordenada.

35 En esta realización alternativa el ajuste de curva para una línea recta que mejor se ajuste al conjunto de datos logarítmicos, se puede usar el método de mínimos cuadrados. En una posible realización, para un número preestablecido de valores sucesivos, por ejemplo para cuatro valores sucesivos, se puede realizar un ajuste de curva para una línea recta en estos valores. Se puede determinar la desviación estándar de los puntos a la línea recta ajustada. En un enfoque tal se elige el conjunto de valores sucesivos y la línea ajustada a este conjunto de valores que proporciona la desviación estándar mínima. El valor inicial (c) se toma del punto de intersección con la ordenada de esta línea. Para mejorar más la calidad del valor inicial resultante, se puede requerir adicionalmente que la línea solo se ajuste a los valores sucesivos que todos tienen un parámetro E calculado en el enfoque discutido anteriormente que se encuentra entre un valor predeterminado E_{min} y un valor predeterminado E_{max} . De esta manera, se hace claro que el ajuste de curva solo se realiza para valores de la fase exponencial. Además (para verificar los resultados) o como una alternativa para determinar la desviación estándar, para todos los conjuntos de valores sucesivos que se han examinado y todos los conjuntos de líneas rectas que se han creado de este modo, se elige la línea recta con la inclinación máxima. El valor inicial (c) se toma del punto de intersección con la ordenada de esta línea. Para mejorar más la calidad del valor inicial resultante, se puede requerir adicionalmente que la línea solo se ajuste a los valores sucesivos que todos tienen un parámetro E calculado en el enfoque discutido anteriormente que se encuentra entre un valor predeterminado E_{min} y un valor predeterminado E_{max} y proporciona una desviación estándar que está por debajo de un valor predeterminado. De esta manera, se hace claro que el ajuste de curva solo se realiza para valores de fase exponencial.

55 En un método de PCR, durante un ciclo la mezcla de reacción que contiene ADN (muestra) se calienta en un sistema. Los sistemas adecuados para PCR típicos son bien conocidos por la persona experimentada en la técnica, siendo un ejemplo el llamado termociclador. Las dobles cadenas del ADN se funden debido a que se calientan a un valor específico. Con el fin de permitir posteriormente la hibridación de los cebadores presentes en la mezcla de reacción con las cadenas individuales (fusionado), la muestra se enfría a una temperatura adecuada para ello. Esto usualmente se realiza automáticamente por el sistema. A continuación, los cebadores se alargan por una polimerasa presente en la mezcla de reacción (replicación de ADN). Para este propósito, también, la mezcla de reacción se puede llevar hasta una temperatura adecuada por el sistema. Esto da como resultado en nuevas cadenas dobles (amplificación). Se termina de esa manera un ciclo. Un nuevo ciclo comienza con un calentamiento renovado del sistema con el fin de fundir el ADN.

En PCR en tiempo real (qPCR), se agrega a la mezcla de reacción un reactivo que indica la amplificación del ADN mediante una señal de fluorescencia. Dicha señal de fluorescencia se puede usar, por ejemplo, como valor de resultado del ciclo. Los posibles reactivos son familiares para la persona experimentada en la técnica, siendo un ejemplo SYBR verde, que se intercala en el ADN amplificado, y de este modo entonces de doble cadena, y entonces fluorescente. Sin embargo, a modo de ejemplo también es posible añadir a la mezcla de reacción un atenuador que en primer lugar atenúe la fluorescencia y se elimina con la amplificación. Sólo entonces es posible detectar la fluorescencia. Otro ejemplo son las sondas de hidrólisis, que pueden usarse para generar una señal de fluorescencia.

De este modo, se puede usar un método de PCR para producir un conjunto de datos de resultados en el que un valor de resultado se asigna a un valor de ciclo respectivo para una multiplicidad de valores de ciclo. En una realización preferida, el conjunto de datos a usar para el método de acuerdo con la invención se produce a partir del conjunto de datos de resultados. La multiplicidad de los valores de ciclo incluidos en el conjunto de datos de resultados es por lo tanto mayor que la pluralidad de los valores de ciclo incluidos en el conjunto de datos. En una realización preferida, la secuencia de los valores de ciclo del conjunto de datos es un subgrupo de una secuencia de valores de ciclo del conjunto de datos de resultados.

En una realización, el método de acuerdo con la invención proporciona que la secuencia de los valores de ciclo del conjunto de datos es un subgrupo de la secuencia de los valores de ciclo del conjunto de datos de resultados, y el último valor de resultado de la secuencia de valores de ciclo del conjunto de datos se determina de la siguiente forma: proceder desde un valor de ciclo de partida del conjunto de datos de resultados para una pluralidad de secuencias consecutivas de tres valores de ciclo que se denotan respectivamente como primer valor de ciclo, segundo valor de ciclo y tercer valor de ciclo dentro de la secuencia considerada respectivamente de acuerdo con su orden secuencial en el conjunto de datos de resultados, se determina la secuencia, en el caso de que

- el valor del resultado asignado al segundo valor de ciclo de la secuencia considerada es mayor que el valor de resultado asignado al primer valor de ciclo de la secuencia considerada, y

- el valor de curvatura (z), que resulta de la suma del valor de resultado asignado al primer valor de ciclo y del valor de resultado asignado al tercer valor de ciclo de la secuencia considerada y la resta de dos veces el valor de resultado asignado al segundo valor de ciclo de la secuencia considerada, asume el valor más alto entre las secuencias consideradas,

el segundo valor de ciclo de la secuencia que satisface dichos requisitos se usa como último valor de ciclo del conjunto de datos.

En la pluralidad de las áreas de uso de la invención, es de esperar que los valores de resultado aumenten exponencialmente, al menos para un subgrupo de valores de ciclo con valores de ciclo crecientes. Se ha reconocido que la propiedad de la muestra de partida se puede determinar particularmente bien si el conjunto de datos a evaluar incluye solo los valores de ciclo (y los valores de resultado asignados a ellos) hasta el (e incluyendo el) valor de ciclo del cual los valores de resultado ya no aumentan exponencialmente, pero el perfil de los valores de resultado se aplana. En este caso, debería hacerse un intento de determinar dicho último valor de ciclo con precisión particular. Específicamente, si se lleva a cabo un ajuste de curva con la ayuda del conjunto de datos para determinar la propiedad direccionada, la adición de incluso un valor de ciclo adicional (y del valor de resultado asignado a él) puede llevar a una variación sustancial en los parámetros determinados en el ajuste de curva. En este caso se ha reconocido que el último valor de ciclo del conjunto de datos se puede determinar de manera particularmente confiable mediante el método de la reivindicación 1.

En la realización preferida, donde se determina el valor de curvatura (z), es posible en una realización aún más preferida detener la búsqueda de la secuencia cuando el valor de curvatura (z) se vuelve cero o alternativamente detener la búsqueda de la secuencia ya sea cuando el valor de curvatura (z) se vuelve negativo. En los casos donde el valor de curvatura (z) se vuelve cero o se vuelve negativo, la curvatura de una curva que previamente había sido exponencial se ha convertido en una curva que se aplana. Esto puede ahorrar tener que realizar ciclos adicionales y de este modo puede reducir el tiempo necesario para realizar la determinación del valor inicial.

Es concebible para el método de acuerdo con la invención que para el valor de ciclo inicial del conjunto de datos de resultados, que también entonces se vuelve el valor de ciclo inicial del conjunto de datos, se hace uso del primer valor de resultado, es decir, por ejemplo, el valor medido de la amplificación determinada cuando un ciclo de acuerdo con el método de PCR se lleva a cabo primero en la muestra de partida. Sin embargo, también es posible concebir realizaciones en el caso de que se use un valor de ciclo posterior del conjunto de datos de resultados como valor de ciclo inicial del conjunto de datos. Este procedimiento permite la exclusión de imprecisiones iniciales en la determinación del valor de resultado, lo que puede ocurrir, sobre todo, en el primer ciclo de un método de PCR llevado a cabo en una muestra de partida. Por ejemplo, el tercer ciclo se puede usar como ciclo inicial del conjunto de datos.

En una realización preferida, un valor de ciclo máximo puede estar predeterminado (N_R). Dicho valor de ciclo máximo se puede usar para verificar si han ocurrido errores al preparar el conjunto de datos del conjunto de datos de resultados. Por ejemplo se puede generar un mensaje de error si se ha alcanzado el valor de ciclo máximo

predeterminado sin que el valor de curvatura (z) se convierta en cero o negativo. A modo de ejemplo, el número 40 se puede seleccionar como valor de ciclo máximo.

Además, es posible fijar un número mínimo de valores de ciclo. Esto también se puede usar con el fin de verificar si han ocurrido errores al preparar el conjunto de datos del conjunto de datos de resultados. Si se establece que el conjunto de datos incluye menos valores de ciclo que el valor de ciclo mínimo, es posible en una realización preferida del método de acuerdo con la invención generar consejos para un operador.

En una realización preferida, se puede fijar un valor mínimo de E_{\min} para el parámetro E en la fórmula reproducida. Si surge que un valor que está por debajo del valor E_{\min} se determina en el ajuste de curva para el parámetro E , es posible generar una advertencia.

En una realización preferida, se puede fijar un valor máximo de E_{\max} para el parámetro E en la fórmula reproducida. Si surge que un valor que está por encima del valor E_{\max} se determina en el ajuste de curva para el parámetro E , es posible generar una advertencia.

En una realización preferida, puede ser fija una diferencia de valor de resultado mínimo Δy_{\max} . Si la diferencia entre el valor de resultado del último valor de ciclo del conjunto de datos y el valor de resultado del valor de ciclo inicial del conjunto de datos es más pequeño que dicha diferencia de valor de resultado mínimo Δy_{\max} , es posible generar una advertencia.

En una realización preferida, es posible generar una advertencia cuando el parámetro a determinar para el valor inicial (c) es menor que cero.

El método de acuerdo con la invención se puede usar para evaluar cualquier forma deseada de PCR en la que la amplificación del ADN presente en la mezcla de reacción se pueda rastrear a través de una señal, en particular a través de una señal de fluorescencia. La única suposición es que se produce un conjunto de datos de resultados con una multiplicidad de valores de ciclo en el que a un valor de ciclo respectivo se le puede asignar un valor de resultado. En este caso, la muestra de partida puede ser un ADN, o bien otra forma de ácido nucleico (por ejemplo un ARN) que se transcribe posteriormente en un ADN correspondiente usando métodos familiares para la persona experimentada en la técnica. Un ejemplo de esto es el uso de ARN, que puede transcribirse en ADN mediante una transcriptasa inversa y entonces cuantificarse a través de una PCR en tiempo real. La PCR en tiempo real produce el conjunto de datos de resultados requerido para el método de acuerdo con la invención.

El método de acuerdo con la invención es adecuado, en particular, para uso en sistemas de PCR para ser usados en sistemas en puntos de atención. Es precisamente aquí que, teniendo en cuenta las particularidades del sistema, el mejor ajuste hecho posible por la invención, y la mejor representación del perfil de valor medido identificado por la invención, proporcionan un aumento en la confiabilidad de las evaluaciones llevadas a cabo con los sistemas en puntos de atención en una forma separada de la calificación del operador.

La invención se explica con más detalle a continuación con la ayuda de un dibujo que muestra solo una realización de ejemplo de la invención. En el dibujo

La figura 1 muestra un gráfico que representa un conjunto de datos de resultados y una función cuyos parámetros están determinados por un ajuste de curva en un conjunto de datos producido a partir del conjunto de datos de resultados y

La figura 2 muestra un gráfico que representa un conjunto de datos de resultados logarítmicos y una línea recta ajustada a cuatro valores sucesivos del conjunto de datos logarítmicos.

El gráfico ilustrado en la figura 1 es una representación gráfica de un conjunto de datos de resultados. El conjunto de datos de resultados incluye una multiplicidad de valores de ciclo, específicamente la secuencia de los números naturales 1 a 40. El gráfico ilustra el valor de resultado asignado al valor de ciclo respectivo del conjunto de datos de resultados. El valor de resultado es la intensidad de fluorescencia y determinada al final del ciclo respectivo.

Un conjunto de datos en el que se asigna un valor de resultado a un valor de ciclo respectivo para una pluralidad de valores de ciclo se produjo a partir del conjunto de datos de resultados. La secuencia de los valores de ciclo del conjunto de datos es un subgrupo de la secuencia de los valores de ciclo del conjunto de datos de resultados. Como valor de ciclo inicial, el conjunto de datos incluye el valor de ciclo 1, y como último valor de ciclo el valor de ciclo 24 ($n = 24$).

El último valor de ciclo de la secuencia de valores de ciclo del conjunto de datos se determinó de la siguiente forma: proceder desde el valor de ciclo de partida ($n = 1$) del conjunto de datos de resultados para una pluralidad de secuencias consecutivas de tres valores de ciclo ($n = 1, 2, 3$; $n = 2, 3, 4$; $n = 3, 4, 5$; $n = 4, 5, 6$, etc.) que se denotan respectivamente como primer valor de ciclo (como un ejemplo $n = 4$), segundo valor de ciclo (en el ejemplo $n = 5$) y tercer valor de ciclo (en el ejemplo $n = 6$) dentro de la secuencia considerada respectivamente (por ejemplo $n = 4, 5, 6$) de acuerdo con su orden secuencial en el conjunto de datos de resultados, se determina la secuencia en el caso de que

- el valor de resultado asignado al segundo valor de ciclo de la secuencia considerada es mayor que el valor de resultado asignado al primer valor de ciclo de la secuencia considerada, y

5 - el valor de curvatura z , que resulta de la suma del valor de resultado, asignado al primer valor de ciclo y del valor de resultado asignado al tercer valor de ciclo de la secuencia considerada, y la resta de dos veces el valor de resultado asignado al segundo valor de ciclo de la secuencia considerada, asume el valor más alto entre las secuencias consideradas.

El segundo valor de ciclo de la secuencia que satisface dichos requisitos se usa como último valor de ciclo del conjunto de datos, aquí el valor de ciclo $n = 24$.

La figura 1 también incluye la ilustración gráfica de una función. La función es

10 $f(n) = a + bn + cE^n = A(n) + cE^n$

Los parámetros (a), (b), (c), E de la función se implementaron en el conjunto de datos en el curso de un ajuste de curva. En este caso, los parámetros reproducidos en la figura (arriba a la izquierda) también fueron determinados.

La propiedad a determinar, específicamente el número de las moléculas en el molar de muestra de partida, puede determinarse a partir del parámetro $2.611e-07$ de este modo determinado para el valor inicial c.

15 La figura 2 muestra la representación gráfica de un conjunto de datos logarítmicos. Habiendo identificado el término de sistema $A(n)$ de la manera descrita anteriormente, se crea un conjunto de datos modificado restando de cada valor de resultado en el conjunto de datos el valor del término de sistema $A(n)$ aplicable para el valor de ciclo de ese valor de resultado. A partir del conjunto de datos modificado, se crea el conjunto de datos logarítmicos al llevar el logaritmo a la base 2 de cada valor de resultado modificado. Como puede verse en la figura 2 una representación gráfica de partes del conjunto de datos logarítmicos sería aproximadamente una línea recta ($\ln(cE^n) = n \cdot \ln(E) + \ln(c)$), mientras que otras partes muestran valores variables. Al realizar un ajuste de curva del valor de resultado logarítmico a la expresión $n \cdot \ln(E) + \ln(c)$ en estas partes, el valor inicial (c) se puede encontrar desde el punto de intersección con la ordenada.

20

25 En esta realización alternativa el ajuste de curva para una línea recta que mejor se ajuste al conjunto de datos logarítmicos, se usa el método de mínimos cuadrados. En una posible realización, para cuatro valores sucesivos, se puede realizar un ajuste de curva para una línea recta en estos valores. Se puede determinar la desviación estándar de los puntos a la línea recta ajustada. En un enfoque tal se elige el conjunto de valores sucesivos y la línea ajustada a este conjunto de valores que proporciona la desviación estándar mínima. El valor inicial (c) se toma del punto de intersección con la ordenada de esta línea. Como puede verse en la figura 2, para los primeros valores de ciclo, los valores de resultado logarítmicos de cuatro valores consecutivos solo se pueden ajustar a una línea recta con una gran desviación estándar. Sin embargo, en la representación gráfica del conjunto de datos logarítmicos, hay una serie característica de valores correspondientes a la fase exponencial que puede verse en la figura 1. En esta serie característica de valores, los valores en la figura 2 se pueden aproximar con una línea recta. Para determinar el valor (c) se elige la serie de cuatro valores que tiene una línea recta ajustada con la menor desviación estándar y el valor (c) se toma de la intersección de esta línea recta con la ordenada.

30

35

Además (para verificar los resultados) o como una alternativa para determinar la desviación estándar, para todos los conjuntos de valores sucesivos que se han examinado y todos los conjuntos de líneas rectas que se han creado de esa manera, se elige la línea recta con la inclinación máxima. Para mejorar más la calidad se requiere que la línea solo se incline hacia los valores sucesivos que tienen un parámetro E calculado en el enfoque discutido anteriormente que se encuentra entre un E_{min} predeterminado y un E_{max} predeterminado y proporciona una desviación estándar que está por debajo de un valor predeterminado. El valor inicial (c) se toma del punto de intersección con la ordenada de esta línea.

40

REIVINDICACIONES

1. Método para determinar la cantidad de un ácido nucleico en una muestra de partida, en la que

- la muestra de partida se amplifica en un sistema en un primer ciclo, y se adquiere una medida de la amplificación como un valor de resultado,

5 - la amplificación en el sistema en un ciclo respectivo y la adquisición de una medida de la amplificación como un valor de resultado para el ciclo respectivo se repite al menos n veces, y a cada ciclo se le asigna un valor de ciclo para identificación,

- de tal manera que se produzca un conjunto de datos de resultados en el que un valor de resultado se asigna a un valor de ciclo respectivo para una multiplicidad de valores de ciclo,

10 se produce a partir del conjunto de datos de resultados un conjunto de datos en el que se asigna un valor de resultado a un valor de ciclo respectivo para una pluralidad de valores de ciclo, siendo mayor la multiplicidad de los valores de ciclo incluidos en el conjunto de datos de resultados que la pluralidad de los valores de ciclo incluidos en el conjunto de datos,

15 la secuencia de los valores de ciclo del conjunto de datos que es un subgrupo de la secuencia de los valores de ciclo del conjunto de datos de resultados, y el último valor de ciclo de la secuencia de los valores de ciclo del conjunto de datos se determina de la siguiente forma: proceder desde un valor de ciclo de partida del conjunto de datos de resultados para una pluralidad de secuencias consecutivas de tres valores de ciclo que se denotan respectivamente como primer valor de ciclo, segundo valor de ciclo y tercer valor de ciclo dentro de la secuencia considerada respectivamente de acuerdo con su orden secuencial en el conjunto de datos de resultados, se determina la secuencia, en cuyo caso

20 - el valor de resultado asignado al segundo valor de ciclo de la secuencia considerada es mayor que el valor de resultado asignado al primer valor de ciclo de la secuencia considerada, y

25 - el valor de curvatura z , que resulta de la suma del valor de resultado, asignado al primer valor de ciclo y del valor de resultado asignado al tercer valor de ciclo de la secuencia considerada y la resta de dos veces el valor de resultado asignado al segundo valor de ciclo de la secuencia considerada asume el valor más alto entre las secuencias consideradas,

el segundo valor de ciclo de la secuencia que satisface dichos requisitos se usa como último valor de ciclo del conjunto de datos.

2. Método para determinar la cantidad de un ácido nucleico en una muestra de partida, en el que

30 - la muestra de partida se amplifica en un sistema en un primer ciclo, y se adquiere una medida de la amplificación como un valor de resultado,

- el ciclo se repite al menos n veces, y a cada ciclo se le asigna un valor de ciclo para la identificación,

de tal manera que se produce un conjunto de datos en el que se asigna un valor de resultado a un valor de ciclo respectivo para una pluralidad de valores de ciclo, en donde

35 - se lleva a cabo un ajuste de curva en el conjunto de datos para usar datos del conjunto de datos para determinar los parámetros de una función que expresa un valor de resultado como una función del valor de ciclo, conteniendo la función un término exponencial en el que un valor inicial (c) se presenta como parámetro, y en el que el valor de ciclo se presenta como exponente, y la función tiene un término de sistema agregado al término exponencial, y

40 - una propiedad a determinar se genera sobre la base del parámetro encontrado para el valor inicial (c) en el ajuste de curva.

3. Método de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado porque el conjunto de datos se produce a partir de un conjunto de datos de resultados, en el conjunto de datos de resultados para una multiplicidad de valores de ciclo un valor de resultado se asigna a un valor de ciclo respectivo, la multiplicidad de los valores de ciclo contenida en el conjunto de datos de resultados que es mayor que la pluralidad de los valores de ciclo contenidos en el conjunto de datos.

4. Método de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado porque la secuencia de los valores de ciclo del conjunto de datos es un subgrupo de la secuencia de los valores de ciclo del conjunto de datos de resultados, y el último valor de ciclo de la secuencia de valores de ciclo del el conjunto de datos se determina de la siguiente forma: proceder desde un valor de ciclo de partida del conjunto de datos de resultados para una pluralidad de secuencias consecutivas de tres valores de ciclo que se denotan respectivamente como primer valor de ciclo, segundo valor de ciclo y tercer valor de ciclo dentro de la secuencia considerada respectivamente de acuerdo con su orden secuencial en el conjunto de datos de resultados, se determina la secuencia, en el caso de que

ES 2 713 170 T3

- el valor de resultado asignado al segundo valor de ciclo de la secuencia considerada es mayor que el valor de resultado, asignado al primer valor de ciclo de la secuencia considerada y

- el valor de curvatura z , que resulta de la suma del valor de resultado asignado al primer valor de ciclo y del valor de resultado asignado al tercer valor de ciclo de la secuencia considerada y la resta de dos veces el valor de resultado asignado al segundo valor de ciclo de la secuencia considerada asume el valor más alto entre las secuencias consideradas,

5

el segundo valor de ciclo de la secuencia que satisface dichos requisitos se usa como último valor de ciclo.

5. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones 2 a 4, caracterizado porque se usa el método de mínimos cuadrados para llevar a cabo el ajuste de curva.

10

6. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque la muestra de partida es un ADN y el valor de resultado es una medida de la intensidad de fluorescencia.

7. Uso de un método de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6 en sistemas de PCR para uso en sistemas en puntos de atención.

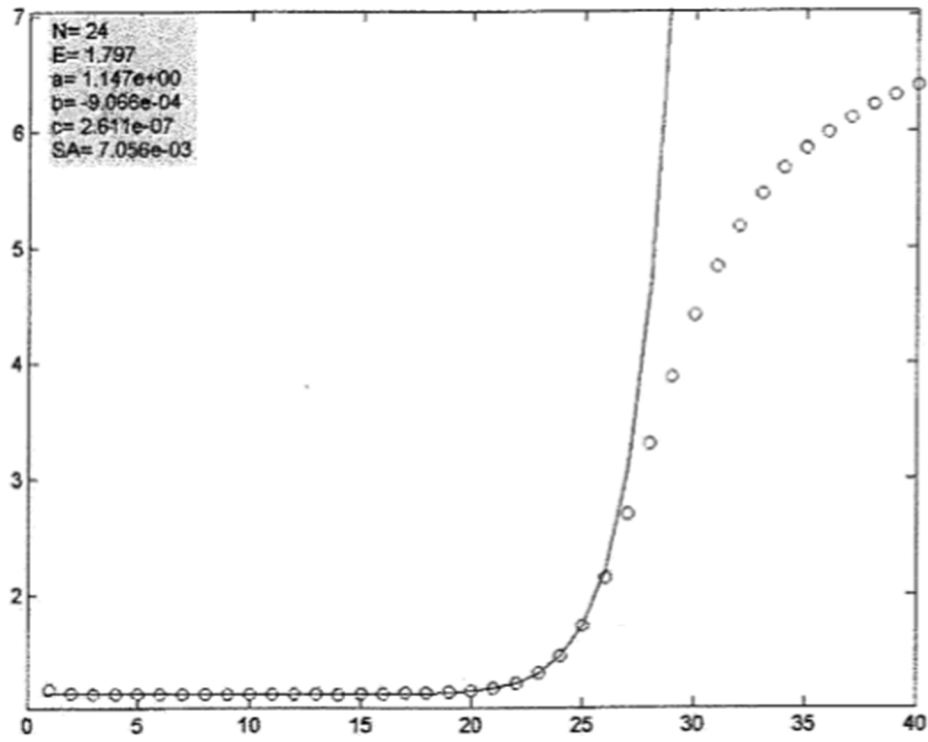


Fig. 1

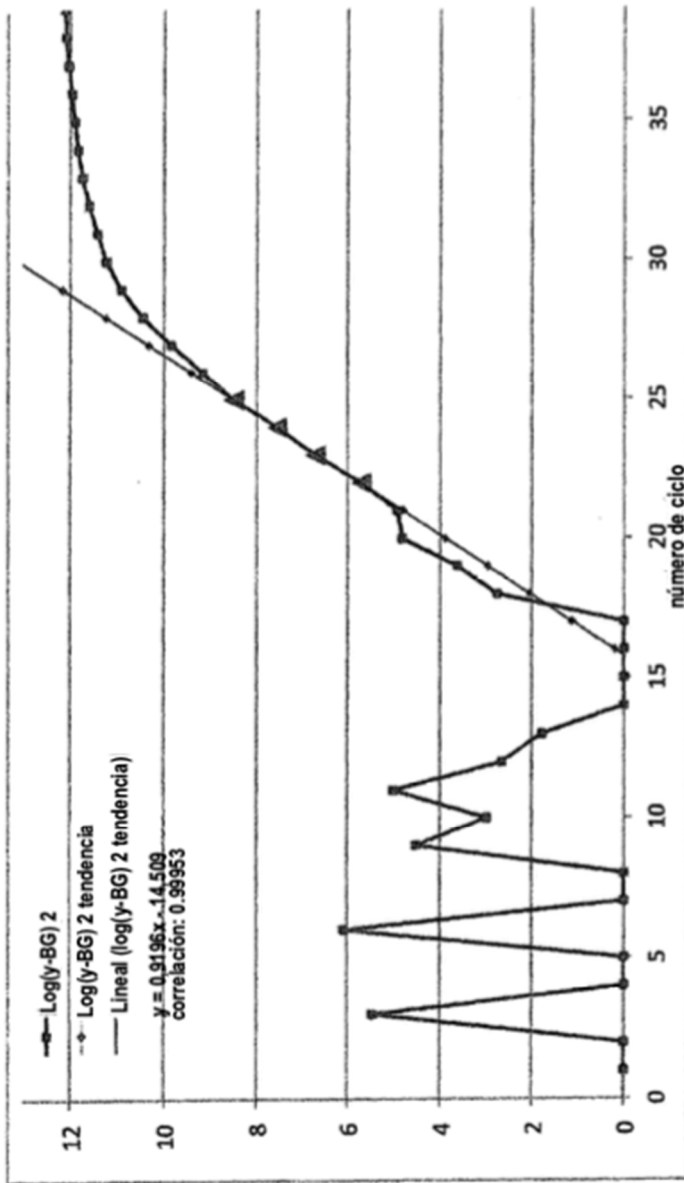


Fig. 2