

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 795 677**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/6851** (2008.01)

**G16B 40/10** (2009.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2014 PCT/US2014/027628**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14143665**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014 E 14716723 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 2971090**

54 Título: **Método, aparato y producto de programa informático para calibración**

30 Prioridad:

**15.03.2013 US 201361792409 P**

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

**24.11.2020**

73 Titular/es:

**GEN-PROBE INCORPORATED (100.0%)  
Patent Dept. 10210 Genetic Center Drive  
San Diego, CA 92121-4326, US**

72 Inventor/es:

**NAIR, SANGEETHA VIJAYSRI;  
WANG, XIANQUN y  
YAMAGATA, SUSAN K.**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 795 677 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, aparato y producto de programa informático para calibración

**Campo**

5 La presente descripción se refiere al campo de la biotecnología. Más específicamente, la descripción se refiere a métodos y sistemas de calibración para cuantificar polinucleótidos utilizando resultados de procedimientos de amplificación en tiempo real.

**Antecedentes**

10 Los métodos que implican el análisis cinético de una amplificación de ácido nucleico *in vitro* se utilizan en la actualidad habitualmente para cuantificar ácidos nucleicos como analito. En estos procedimientos, a veces denominados procedimientos de amplificación en "tiempo real", la cantidad de amplicón presente en una mezcla de reacción de amplificación de ácido nucleico se monitoriza como función del tiempo en el transcurso del procedimiento de amplificación. Los ensayos de ácido nucleico en tiempo real totalmente automatizados requieren algoritmos ejecutables por máquina capaces de analizar los datos dependientes del tiempo adquiridos durante la reacción. A este respecto, existe un requisito para los algoritmos de procesamiento de datos que generan con precisión una cantidad o concentración de un ácido nucleico que daría lugar a un resultado de amplificación observado.

15 Se han apreciado dificultades asociadas con la cuantificación de la cantidad absoluta de un ácido nucleico específico diana en la bibliografía de patentes. Estas dificultades se han atribuido a la naturaleza exponencial del procedimiento de amplificación y al hecho de que pequeñas diferencias en cualquiera de las variables que controlan las velocidades de reacción, incluida la longitud y la secuencia de nucleótidos de los pares de cebadores, pueden conducir a diferencias drásticas en el rendimiento del amplicón. Wang *et al.*, en la Patente de Estados Unidos Núm. 5.219.727 describieron el uso de un patrón interno que se amplificó utilizando los mismos cebadores que amplificaron el polinucleótido analito, y abordaron el hecho de que el uso de un ADNc no relacionado como patrón necesitaba un segundo conjunto de cebadores oligonucleotídicos no relacionados con el ácido nucleico diana específico que se estaba cuantificando. Según Wang *et al.* los análisis que utilizan dos conjuntos de cebadores no relacionados solo pueden proporcionar una comparación relativa de dos reacciones de amplificación independientes en lugar de una medida absoluta de una concentración de ácido nucleico diana. Otros han seguido esta enseñanza y han empleado patrones internos que se asemejan a la diana de interés al tener secuencias similares y al amplificarse con un par común de cebadores (véase la Solicitud de Patente de Estados Unidos publicada 2003/104438). Otros más han descrito métodos cuantitativos que se basan en la determinación de la eficacia de la amplificación (véase la Solicitud de Patente Europea publicada EP 1138784). También se han descrito métodos que implican la determinación de razones de amplificación para secuencias de control y diana (véase la Patente de Estados Unidos Núm. 6.066.458).

20 Los métodos más comunes para realizar el ajuste de calibración interna de los resultados de amplificación de ácido nucleico en tiempo real incluyen el ajuste de calibración "dentro de la ejecución" y el ajuste de una curva de calibración "almacenada". El primero de estos métodos, ilustrado por McMillan *et al.*, in el documento U.S. 6.713.297, requiere dos o más patrones de calibración que se amplifiquen convencionalmente en paralelo con ácidos nucleicos como analitos en réplicas cada vez que se prepara un gráfico de calibración. Desafortunadamente, este requisito cada vez que se recalibra un instrumento consume reactivos limitados que generalmente se adquieren en forma de kit y que pueden ser costosos. El segundo método, ilustrado por Carrick en el documento U.S. 7.930.106, evita ventajosamente la necesidad de ejecutar múltiples calibradores cada vez que se recalibra un instrumento, pero aún requiere la preparación de un gráfico de calibración completo en algún momento (p. ej., ya sea por un fabricante de kit o usuario final). La experiencia con esta técnica ha demostrado una buena capacidad para reproducir resultados cuantitativos utilizando un único patrón de calibración cuando la diana que se debe cuantificar está presente a niveles altos o muy altos. Por ejemplo, las pruebas de comprobación posteriores confirmaron que el ajuste de una curva almacenada utilizando un solo calibrador de ajuste que tenía  $10^7$  copias de la diana reprodujeron ventajosamente la curva local completa casi idénticamente en el intervalo de  $10^4$  a  $10^8$  copias de la diana. En este caso, la curva ajustada se desvió de la curva local en no más de 0,6 log copias a una cantidad de entrada de  $10^2$  copias de la diana utilizando un solo calibrador de ajuste que tiene  $10^2$  copias de la diana, en contraste, dio como resultado una curva ajustada que se desvió en 0,4 log copias a un nivel de diana de entrada de  $10^3$  copias de la diana, y que se desvió 1,6 log copias a un nivel de diana de entrada de  $10^6$  copias de la diana. Por lo tanto, hubo un beneficio claro al ajustar la curva almacenada utilizando patrones de calibración que tenían cantidades de diana altas. El documento WO2008/067567 describe un método cuantitativo que emplea el ajuste de curvas de calibración maestras predefinidas.

25 Incluso en vista de estos enfoques útiles, sigue existiendo la necesidad de soluciones automatizadas que permitan una cuantificación altamente precisa de los ácidos nucleicos utilizando técnicas de amplificación *in vitro*, donde el ajuste de calibración interno se puede ejecutar de manera simplificada. Además, sería deseable poder utilizar un único patrón de calibración que comprenda una baja concentración del patrón de polinucleótido analito para lograr una cuantificación precisa en todo el intervalo dinámico de las cantidades o concentraciones objetivo a medir. La presente descripción aborda estos problemas.

## Compendio

Un primer aspecto de la descripción se refiere a un método, como se define en la reivindicación 1, para establecer una curva de calibración ajustada para un ensayo cuantitativo realizado utilizando un instrumento local que amplifica el ácido nucleico y monitoriza la síntesis de amplicones a medida que se produce la amplificación. El método incluye la etapa (a) de obtención de un par de coordenadas para un punto fijo en una curva de calibración específica para el ensayo cuantitativo, en donde la curva de calibración se ha preparado ajustando una ecuación a una recopilación de resultados obtenidos utilizando una pluralidad de instrumentos, distintos del instrumento local, en donde el par de coordenadas especifica una cantidad de un polinucleótido analito y un indicio normalizado de valor de amplificación. También está la etapa (b) de obtención de un calibrador de ajuste que incluye una cantidad fija de un calibrador interno y una cantidad conocida del polinucleótido analito. También existe la etapa (c) de co-amplificación del polinucleótido analito y el calibrador interno del calibrador de ajuste utilizando el instrumento local. También está la etapa (d) de determinación de indicios de amplificación para cada uno de los polinucleótidos analito y el calibrador interno que se co-amplificó en la etapa (c). También existe la etapa (e) de normalización de los indicios de amplificación determinados para el polinucleótido analito respecto a los indicios de amplificación determinados para el calibrador interno. También existe la etapa (f) de establecimiento de la curva de calibración ajustada mediante la preparación de un gráfico de calibración que incluye un primer punto y un segundo punto, en donde el primer punto incluye coordenadas para la cantidad conocida del polinucleótido analito del calibrador de ajuste y los indicios normalizados de amplificación para el polinucleótido analito determinado en la etapa (e), y en donde el segundo punto incluye el par de coordenadas, obtenido en la etapa (a), para el punto fijo. Más preferiblemente, el método incluye adicionalmente la etapa de co-amplificación con el primer instrumento en tiempo real del polinucleótido analito y el calibrador interno contenido en cada uno de una pluralidad de patrones de calibración, en donde cada uno de la pluralidad de patrones de calibración incluye una concentración inicial diferente del polinucleótido analito del calibrador de ajuste, y en donde las concentraciones del calibrador interno en cada uno de la pluralidad de patrones de calibración y en el calibrador de ajuste son sustancialmente idénticas. Alternativamente, la curva de calibración de la etapa (a) y la curva de calibración ajustada establecida en la etapa (f) pueden ser ambas curvas de calibración lineal descritas por ecuaciones lineales. Según una realización preferida diferente, la etapa (a) y la etapa (b) implican colectivamente la obtención (p. ej., adquisición) de un kit que incluye el calibrador de ajuste y una realización tangible del par de coordenadas para el punto fijo. Cuando este es el caso, la realización tangible puede incluir un código de barras legible por máquina. Según otra realización preferida más, la etapa (f) implica el establecimiento de la curva de calibración ajustada preparando, con un procesador en comunicación con el instrumento local, el gráfico de calibración que comprende el primer punto y el segundo punto. Por ejemplo, el procesador en comunicación con el instrumento local puede ser un componente integrante del instrumento local. Según aún otra realización preferida, el par de coordenadas obtenido en la etapa (a) especifica la cantidad del polinucleótido analito cuando el valor de los indicios normalizados de amplificación de la curva de calibración es cero.

Otro aspecto de la descripción se refiere a un programa informático, como se define en la reivindicación 8, para cuantificar un polinucleótido analito que puede estar presente en una muestra de prueba utilizando un ensayo de amplificación de ácido nucleico que implica co-amplificación, con un instrumento local que amplifica ácidos nucleicos y monitoriza la síntesis de amplicones como una función del tiempo, del polinucleótido analito y una cantidad fija de un calibrador interno. El producto de programa informático incluye una realización tangible de instrucciones de soporte lógico para realizar una serie de etapas. Estas etapas incluyen la etapa (a) de recepción de un par de coordenadas para un punto fijo sobre una curva de calibración específica para el ensayo de amplificación de ácido nucleico que se utilizará para cuantificar el polinucleótido analito, en donde la curva de calibración se ha preparado ajustando una ecuación a una recopilación de resultados obtenidos utilizando una pluralidad de instrumentos, distintos del instrumento local, en donde el par de coordenadas especifica una cantidad del polinucleótido analito y un indicio normalizado de valor de amplificación. También está la etapa (b) de obtención de un valor para los indicios de amplificación para una cantidad conocida del polinucleótido analito normalizado a los indicios de amplificación para la cantidad fija del calibrador interno contenido en un calibrador de ajuste y que se amplificó conjuntamente en una primera reacción de amplificación realizada con el instrumento local. También está la etapa (c) de preparación de una curva de calibración ajustada que incluye un primer punto y un segundo punto, en donde el primer punto incluye coordenadas para la cantidad conocida del polinucleótido analito del calibrador de ajuste y el valor obtenido en la etapa (b), y en donde el segundo punto incluye el par de coordenadas, recibido en la etapa (a), para el punto fijo. También está la etapa (d) de obtención de un valor para los indicios de amplificación para una cantidad desconocida del polinucleótido analito en la muestra de prueba normalizada a los indicios de amplificación para la cantidad fija del calibrador interno que se amplificó conjuntamente en una segunda reacción de amplificación realizada con el instrumento local. También existe la etapa (e) de comparación del valor obtenido en la etapa (d) con la curva de calibración ajustada para producir un resultado cuantitativo para la cantidad desconocida del polinucleótido analito presente en la muestra de prueba. También está la etapa (f) de generación de un registro tangible del resultado cuantitativo de la etapa (e). En una realización preferida, el par de coordenadas recibido en la etapa (a) especifica la cantidad del polinucleótido analito cuando la curva de calibración se proyecta a un indicio normalizado de valor de amplificación de cero. En una realización diferente, la realización tangible de las instrucciones de soporte lógico incluye instrucciones de soporte lógico almacenadas en un medio que puede ser cualquiera de: un disco óptico, un medio de almacenamiento magnético, una memoria flash, un disco duro de ordenador y una unidad de red accesible por al menos un ordenador. En una realización diferente, la etapa (b) y la etapa (d) implican cada una la obtención mediante cálculo matemático. En una realización diferente, las etapas (b) y (d) implican la obtención mediante la recepción de

entradas numéricas para los valores respectivos. En una realización diferente, la curva de calibración ajustada preparada en la etapa (c) se define mediante una ecuación lineal. En una realización diferente, el registro tangible de la etapa (e) se imprime en papel. En una realización diferente, el ensayo de amplificación de ácido nucleico es un ensayo isotérmico de amplificación de ácido nucleico.

5 Otro aspecto de la descripción se refiere a un aparato, como se define en la reivindicación 11, para determinar la cantidad inicial de una secuencia de ácido nucleico diana en una muestra de prueba. El aparato incluye (a) al menos un mecanismo de detección que mide: (i) señales indicativas de las cantidades respectivas de la secuencia de ácido nucleico diana y de un primer calibrador interno que se amplifica en una primera reacción de amplificación de ácido nucleico, en donde el primer calibrador interno incluye una segunda secuencia de ácido nucleico diferente de la  
10 secuencia de ácido nucleico diana; (ii) señales indicativas de las cantidades respectivas de una cantidad conocida de un polinucleótido analito y un segundo calibrador interno que se amplifica en una segunda reacción de amplificación de ácido nucleico, en donde el polinucleótido analito y el segundo calibrador interno son componentes de un calibrador de ajuste, en donde el segundo calibrador interno incluye la segunda secuencia de ácido nucleico, y en donde la cantidad inicial de la segunda secuencia de ácido nucleico es sustancialmente igual en la primera y segunda  
15 reacciones de amplificación de ácido nucleico. El aparato ideado incluye adicionalmente (b) al menos un procesador en comunicación con el mecanismo de detección, en donde el procesador está programado con un par de coordenadas para un punto fijo que especifica una cantidad de polinucleótido analito y un indicio normalizado de valor de amplificación, obteniéndose el punto fijo de una curva de calibración específica para el ensayo cuantitativo, en donde la curva de calibración se ha preparado ajustando una ecuación a una recopilación de resultados obtenidos utilizando una pluralidad de instrumentos, distintos del instrumento local; y en donde el procesador está programado  
20 adicionalmente para realizar las etapas de: (i) determinación a partir de las señales medidas de los valores respectivos para indicios de amplificación para la cantidad conocida del polinucleótido analito, cada uno del primer y segundo calibradores internos, y la secuencia de ácido nucleico diana; (ii) normalización de los indicios de valor de amplificación determinado para la secuencia de ácido nucleico diana a los indicios de valor de amplificación determinado para el primer calibrador interno; (iii) normalización de los indicios de valor de amplificación determinado para la cantidad conocida del polinucleótido analito a los indicios de valor de amplificación determinado para el segundo calibrador interno; (iv) establecimiento de una curva de calibración desde el punto fijo, la cantidad conocida del polinucleótido analito y los indicios normalizados de amplificación para la cantidad conocida del polinucleótido analito; y (v)  
25 determinación de la cantidad inicial de la secuencia de ácido nucleico diana en la muestra de prueba utilizando la curva de calibración y los indicios normalizados de amplificación para la secuencia de ácido nucleico diana. Más preferiblemente, un miembro del par de coordenadas especifica un indicio normalizado de valor de amplificación de cero. Alternativamente, el aparato puede incluir adicionalmente una incubadora de temperatura controlada en la que tienen lugar la primera y segunda reacciones de amplificación de ácido nucleico. En un caso particular, la incubadora con temperatura controlada mantiene una temperatura sustancialmente constante, y la primera y segunda reacciones de amplificación de ácido nucleico son reacciones de amplificación isotérmica de ácido nucleico. Según una realización preferida diferente, la curva de calibración en la etapa (iv) se define mediante una ecuación lineal. Según una realización preferida diferente, el al menos un mecanismo de detección incluye un fluorómetro que mide señales fluorescentes.

Se describe fuera del alcance de las reivindicaciones un método para establecer una curva de calibración ajustada  
40 para un ensayo cuantitativo realizado utilizando un instrumento local que amplifica el ácido nucleico y monitoriza la síntesis de amplicones a medida que se produce la amplificación. El método incluye la etapa (a) de obtención de un par de coordenadas para un punto fijo en una curva de calibración específica para el ensayo cuantitativo, en donde el par de coordenadas especifica una cantidad de un polinucleótido analito y un indicio de valor de amplificación. También existe la etapa (b) de obtención de un patrón de polinucleótido analito que incluye una cantidad conocida del polinucleótido analito. También existe la etapa (c) de amplificación del polinucleótido analito del patrón de polinucleótido analito en una reacción de amplificación de ácido nucleico utilizando el instrumento local. También está la etapa (d) de determinación de indicios de amplificación para el polinucleótido analito que se amplificó en la etapa (c). También existe la etapa (e) de establecimiento de la curva de calibración ajustada mediante la preparación de un gráfico de calibración que incluye un primer punto y un segundo punto, en donde el primer punto incluye coordenadas para la cantidad conocida del polinucleótido analito del patrón del polinucleótido analito e indicios de la amplificación determinada en la etapa (d), y en donde el segundo punto incluye el par de coordenadas, obtenido en la etapa (a), para el punto fijo. Preferiblemente, antes de la etapa (a) está la etapa de preparación de la curva de calibración específica para el ensayo cuantitativo ajustando una ecuación a una recopilación de resultados obtenidos utilizando una pluralidad de instrumentos, distintos del instrumento local, que amplifican el ácido nucleico y monitorizan la síntesis de amplicón a medida que se está produciendo la amplificación, y en donde la recopilación de resultados no incluye los resultados obtenidos utilizando el instrumento local. Alternativamente, la etapa (e) incluye el uso de un procesador en comunicación con el instrumento local para preparar el gráfico de calibración.

## Descripción detallada

### Introducción

60 En la presente memoria se describe un enfoque de calibración interna que emplea resultados determinados en un instrumento de usuario final combinados con un punto almacenado (p. ej., un "punto fijo") en un gráfico de calibración. Opcionalmente, el punto fijo se puede determinar en el instrumento de usuario final y a continuación almacenar para

su uso posterior en ese mismo instrumento. Alternativamente, el punto fijo se puede determinar utilizando uno o más instrumentos (p. ej., en la ubicación del fabricante del kit), y a continuación proporcionarlo para su uso en el instrumento de usuario final. El enfoque descrito facilita ventajosamente la producción de una curva de calibración completa para la cuantificación de ácido nucleico utilizando tan solo un único patrón de calibración de ácido nucleico. El enfoque simplifica también el flujo de trabajo y es más rentable que la producción de una curva de calibración completa utilizando un conjunto completo de calibradores cada vez que se necesita un procedimiento de recalibración. También adicionalmente, el enfoque proporciona una cuantificación sobresaliente sobre un intervalo dinámico extendido y acomoda el uso de reactivos envejecidos o parcialmente degradados.

Los sistemas y métodos particularmente útiles serán capaces de reproducir una curva de calibración completa utilizando un número mínimo de patrones de calibración amplificados en un instrumento de usuario final que se vaya a calibrar. De hecho, mediante el enfoque detallado en la presente memoria, se han logrado resultados sobresalientes utilizando solo un patrón de calibración único para recrear una curva de calibración completa. Esto puede implicar primero establecer una curva de referencia de calibración utilizando una pluralidad de patrones de calibración, cada uno con una cantidad diferente de patrón de polinucleótido analito y la misma cantidad constante de calibrador interno (es decir, "CI"). A continuación, se puede identificar un punto extrapolado en la curva de referencia para utilizarlo como punto fijo. A continuación, se pueden utilizar los resultados de una reacción de amplificación realizada utilizando un patrón de calibración (p. ej., un solo patrón de calibración) en un instrumento de usuario final para determinar un valor de la razón diana/CI (es decir, la razón de los respectivos indicios de amplificación), estableciendo así un punto de datos "local" (p. ej., producido por un usuario final). El punto de datos local y el punto fijo se pueden utilizar combinados para producir una "curva de calibración ajustada", tal como una curva de calibración lineal. Finalmente, hay un etapa para cuantificación de las cantidades de diana presentes en las muestras de prueba en el instrumento de usuario final utilizando la curva de calibración ajustada. Preferiblemente, esto implica comparar un valor de la razón calculado utilizando los indicios de amplificación medido para la diana y el CI obtenido por amplificación de una muestra de prueba con la curva de calibración ajustada.

Se describe que se prepara una curva de calibración maestra utilizando resultados (p. ej., umbral normalizado u otros indicios de valores de amplificación para la diana amplificada y el CI) de dos o más reacciones de amplificación realizadas utilizando diferentes patrones de calibración en un primer instrumento que amplifica ácidos nucleicos y monitoriza la producción de amplicón como una función del tiempo o del número de ciclos. Los valores umbral  $C_T$  u otros indicios de amplificación indicativos de un nivel concreto de progreso de reacción para la amplificación de ácido nucleico diana en los patrones de calibración se normalizan a los valores correspondientes para CI determinados para las mismas reacciones, por ejemplo, mediante división para dar como resultado las razones. El valor de la razón calculado para cada una de las dos o más reacciones de calibración se traza a continuación (p. ej. utilizando una hoja de cálculo electrónica) como una función de la cantidad inicial de entrada de diana en la reacción. En algunos casos preferidos, se establece un gráfico de calibración lineal.

Se puede realizar un procedimiento de calibración o recalibración utilizando tan solo un patrón de calibración que tenga un nivel de copia inicial conocido de ácido nucleico diana, y la misma cantidad constante de CI que se emplea en las reacciones utilizadas para establecer la curva de calibración que se puede utilizar para establecer el punto fijo. La determinación y normalización de los valores umbral para la diana y el CI en la reacción de amplificación en tiempo real produce un punto que se puede utilizar combinado con el punto fijo para generar el gráfico de calibración completo.

Como se indicó anteriormente, existen diferentes formas en las que el punto fijo se puede utilizar combinado con un segundo punto para generar el gráfico de calibración. En un primer caso, el punto fijo y el valor de la razón determinados para el patrón de calibración se generan en el mismo instrumento (p. ej., "primer" instrumento). En un segundo caso, el punto fijo y el valor de la razón determinados para el patrón de calibración se generan en diferentes instrumentos (p. ej., primer y segundo instrumentos). En ambos casos, la técnica corrige ventajosamente los gráficos de calibración para tener en cuenta los reactivos envejecidos, incluidos los reactivos que se han activado y desactivado varias veces en un instrumento en particular. Además, la técnica no depende de la determinación de las eficacias de amplificación. Aún más, no se requiere que se conozca el nivel de copia o la cantidad de CI incluidos en cada reacción. Sin embargo, el nivel de copias o cantidad de CI en cada reacción debe ser el mismo.

#### Definiciones

Los siguientes términos tienen los siguientes significados para los fines de esta descripción, a menos que se indique expresamente lo contrario en el presente memoria.

Como se emplea en la presente memoria, "polinucleótido" significa ARN, ADN o una molécula quimérica que contiene ARN y ADN. El término también abarca moléculas que contienen análogos de nucleótidos de ARN o ADN.

Por "polinucleótido analito" o "ácido nucleico analito" se entiende un polinucleótido de interés que se debe cuantificar. En términos generales, los ácidos nucleicos analito se encontrarán en las muestras de prueba. El genoma de un virus en particular ilustraría un polinucleótido analito.

Como se emplea en la presente memoria, una "muestra de prueba" es cualquier muestra que se debe investigar para detectar la presencia de una secuencia de polinucleótidos concreta. Las muestras de prueba incluyen cualquier tejido

o material que contenga polinucleótidos obtenidos de una muestra humana, animal, ambiental, derivada de laboratorio o sintética. La sangre y la orina son ejemplos preferidos de muestras de prueba.

5 Por "patrón de polinucleótido de analito" se entiende una composición que comprende una cantidad conocida de un polinucleótido analito, o un fragmento del mismo. Por ejemplo, un patrón de polinucleótido de analito de VIH-1 puede contener un número conocido de copias de un genoma de VIH-1, transcrito de VIH-1 o un transcrito sintetizado *in vitro* que representa una porción del genoma viral.

10 Por "patrón de calibración" se entiende una composición que incluye una cantidad conocida o predeterminada de patrón de polinucleótido analito combinado con una cantidad constante conocida de un polinucleótido calibrador interno. Dos patrones de calibración diferentes pueden contener diferentes cantidades de polinucleótido analito o un fragmento del mismo, pero contendrán la misma cantidad de ácido nucleico calibrador interno. El polinucleótido analito del patrón de polinucleótido analito, y el ácido nucleico calibrador interno serán distinguibles entre sí, por ejemplo, por tener secuencias de bases de nucleótidos que son diferentes.

15 Los "calibradores de ajuste" son patrones de calibración utilizados para realizar reacciones de amplificación en un instrumento local, donde los resultados obtenidos de esas reacciones de amplificación proporcionan datos para crear un gráfico de calibración. Por ejemplo, la amplificación de un calibrador de ajuste puede proporcionar un punto de datos que se puede utilizar combinado con un punto fijo para crear un gráfico de calibración completo.

Un "amplicón" es un producto polinucleotídico de una reacción de amplificación, en donde una secuencia de ácido nucleico diana sirvió como molde para la síntesis de copias de polinucleótidos o productos de amplificación.

20 Por "amplificación" o "amplificación de ácido nucleico" o "amplificación de ácido nucleico *in vitro*" y similares se entiende cualquier procedimiento conocido para obtener múltiples copias, permitiendo equivalentes de ARN y ADN, de una secuencia de ácido nucleico diana o su complemento o fragmentos de la misma. La amplificación de "fragmentos de la misma" se refiere a la producción de un ácido nucleico amplificado que contiene menos que la secuencia de ácido nucleico de la región diana completa o su complemento. Tales fragmentos se pueden producir amplificando una porción del ácido nucleico diana, por ejemplo, utilizando un oligonucleótido de amplificación que hibrida e inicia la polimerización desde una posición interna del ácido nucleico diana.

25 Como se emplea en la presente memoria, los términos "co-amplificar" y "co-amplificación" y sus variantes se refieren a un procedimiento en el que diferentes secuencias de ácido nucleico diana se amplifican en una sola (es decir, la misma) reacción de amplificación. Por ejemplo, un polinucleótido analito y un ácido nucleico calibrador interno no relacionado se "co-amplifican" cuando ambos ácidos nucleicos se amplifican en reacciones que tienen lugar en un solo tubo, y cuando ambas reacciones de amplificación comparten al menos un reactivo (p. ej., desoxirribonucleótido trifosfato, enzima, cebador(es), etc.) en común.

30 Como se emplea en la presente memoria, "ciclo térmico" se refiere a cambios repetidos de temperatura, (es decir, aumentos o disminuciones de temperatura) en una mezcla de reacción. Las muestras sometidas a ciclos térmicos pueden cambiar de una temperatura a otra, estabilizarse a esa temperatura, pasar a una segunda temperatura o volver a la temperatura inicial. El ciclo de temperatura se puede repetir tantas veces como sea necesario para estudiar o completar la reacción química concreta de interés.

35 Por "diana" o "ácido nucleico diana" se entiende un ácido nucleico que contiene una secuencia que se debe amplificar, detectar y cuantificar. Una secuencia de ácido nucleico diana que se va a amplificar preferiblemente se colocará entre dos oligonucleótidos dispuestos opuestamente, e incluirá la porción del ácido nucleico diana que sea complementaria a cada uno de los oligonucleótidos.

Por "secuencia de ácido nucleico diana" o "secuencia diana" o "región diana" se entiende una secuencia específica de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos que comprende la totalidad o parte de la secuencia de nucleótidos de una molécula de ácido nucleico de hebra sencilla, y la secuencia de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos complementaria a la misma.

45 Por "amplificación asociada a la transcripción" se entiende cualquier tipo de amplificación de ácido nucleico que utiliza una ARN polimerasa para producir múltiples transcritos de ARN a partir de un molde de ácido nucleico. Convencionalmente, estas reacciones de amplificación emplean al menos un cebador que tiene un extremo 3' que puede extenderse por la actividad de una ADN polimerasa. Un ejemplo de un método de amplificación asociado a la transcripción, llamado "Amplificación Mediada por Transcripción" (TMA, por sus siglas en inglés), generalmente  
50 emplea una ARN polimerasa, una ADN polimerasa, desoxirribonucleósidos trifosfato, ribonucleósidos trifosfato y un oligonucleótido que contiene un promotor complementario al ácido nucleico diana. Las variaciones de TMA son bien conocidas en la técnica como describen en detalle Burg *et al.*, en la Patente de Estados Unidos Núm. 5.437.990; Kacian *et al.*, Patentes de Estados Unidos Núm. 5.399.491 y 5.554.516; Kacian *et al.*, PCT Núm. WO 93/22461; Gingeras *et al.*, PCT Núm. WO 88/01302; Gingeras *et al.*, PCT Núm. WO 88/10315; Malek *et al.*, Patente de Estados  
55 Unidos Núm. 5.130.238; Urdea *et al.*, Patentes de Estados Unidos Núm. 4.868.105 y 5.124.246; McDonough *et al.*, PCT Núm. WO 94/03472; y Ryder *et al.*, PCT Núm. WO 95/03430. Otros métodos de amplificación asociados a la transcripción que emplean solo un cebador único que puede extenderse mediante una ADN polimerasa, como se

describe en la Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 2006/046265 son particularmente aceptados por las definiciones y son altamente preferidos para su uso en relación con el método descrito en la presente memoria.

5 Como se emplea en la presente memoria, un "oligonucleótido" u "oligómero" es una cadena polimérica de al menos dos, generalmente entre aproximadamente cinco y aproximadamente 100, subunidades químicas, comprendiendo cada subunidad un radical de base nucleotídica, un radical de azúcar y un radical conector que une las subunidades en una configuración espacial lineal. Los radicales de bases nucleotídicas comunes son guanina (G), adenina (A), citosina (C), timina (T) y uracilo (U), aunque los expertos en la técnica conocen otras bases nucleotídicas raras o modificadas susceptibles de enlaces de hidrógeno. Los oligonucleótidos pueden incluir opcionalmente análogos de cualquiera de los radicales de azúcar, los radicales de bases y los constituyentes de la cadena principal. Los oligonucleótidos preferidos de la presente descripción se encuentran en un intervalo de tamaño de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 residuos. Los oligonucleótidos se pueden purificar a partir de fuentes naturales, pero preferiblemente se sintetizan utilizando cualquiera de una variedad de métodos enzimáticos o químicos bien conocidos.

15 Por "oligonucleótido de amplificación" u "oligómero de amplificación" se entiende un oligómero que hibrida con un ácido nucleico diana, o su complemento, y participa en una reacción de amplificación de ácido nucleico. Los ejemplos de oligómeros de amplificación incluyen cebadores que contienen un extremo 3' que se extiende como parte del procedimiento de amplificación, pero también incluyen oligómeros que no son extendidos por una polimerasa (p. ej., un oligómero bloqueado 3') pero que pueden participar en, o facilitar amplificación eficaz a partir de un cebador. Los intervalos de tamaño preferidos para los oligómeros de amplificación incluyen aquellos que tienen de aproximadamente 10 a aproximadamente 80 nucleótidos de longitud, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 60 nucleótidos de longitud y contienen al menos aproximadamente 10 bases contiguas, y más preferiblemente al menos 12 bases contiguas que son complementarias a una región de secuencia de ácido nucleico diana (o una hebra complementaria de la misma). Las bases contiguas son preferiblemente al menos aproximadamente 80%, más preferiblemente al menos aproximadamente 90%, y lo más preferiblemente aproximadamente 100% complementarias a la secuencia diana a la que se une el oligómero de amplificación. Un oligómero de amplificación puede incluir opcionalmente nucleótidos modificados o análogos, o nucleótidos adicionales que participan en una reacción de amplificación pero que no son complementarios o están contenidos en el ácido nucleico diana. Un oligómero de amplificación que está bloqueado en 3' pero es capaz de hibridar con un ácido nucleico diana y proporcionar una secuencia promotora aguas arriba que sirve para iniciar la transcripción se denomina oligómero "proveedor de promotor".

30 Un "cebador" es un oligómero de amplificación que hibrida con un ácido nucleico molde y tiene un extremo 3' OH que puede ser extendido por una ADN polimerasa. La región 5' del cebador puede no ser complementaria del ácido nucleico diana (p. ej., una secuencia promotora), dando como resultado un oligómero denominado "promotor-cebador". Los expertos en la técnica apreciarán que cualquier oligómero que pueda funcionar como cebador se puede modificar para incluir una secuencia promotora 5', y por lo tanto podría funcionar como un promotor-cebador. De manera similar, cualquier promotor-cebador se puede modificar mediante la eliminación de, o la síntesis sin, una secuencia promotora y seguir funcionando como cebador.

40 Como se emplea en la presente memoria, un "conjunto" de oligonucleótidos de amplificación se refiere a una colección de dos o más oligonucleótidos de amplificación que cooperativamente participan en un reacción de amplificación de ácido nucleico *in vitro* para sintetizar amplicones.

Como se emplea en la presente memoria, una "sonda" es un oligonucleótido que hibrida específicamente con una secuencia diana en un ácido nucleico, preferiblemente un ácido nucleico amplificado, en condiciones que promueven la hibridación, para formar un híbrido detectable.

45 Como se emplea en la presente memoria, la monitorización "dependiente del tiempo" de la amplificación de ácido nucleico, o la monitorización de la amplificación de ácido nucleico en "tiempo real" se refiere a un procedimiento en donde la cantidad de amplicón presente en una reacción de amplificación de ácido nucleico se mide como una función del tiempo de reacción o del número de ciclos, y a continuación se utiliza para determinar una cantidad inicial de molde que estaba presente en la mezcla de reacción en el momento en que se inició la reacción de amplificación. Por ejemplo, la cantidad de amplicón se puede medir antes de comenzar cada ciclo completo de una reacción de amplificación que comprende ciclos térmicos, tal como PCR. Alternativamente, las reacciones de amplificación isotérmica que no requieren intervención física para iniciar las transiciones entre los ciclos de amplificación se pueden monitorizar continuamente o a intervalos de tiempo regulares para obtener información sobre la cantidad de amplicón presente como una función del tiempo.

55 Como se emplea en la presente memoria, una "curva de crecimiento" se refiere al patrón característico de aparición de un producto sintético, tal como un amplicón, en una reacción como una función del tiempo o el número de ciclos. Una curva de crecimiento se representa convenientemente como un diagrama de tiempo bidimensional (eje x) frente a algún indicador de la cantidad de producto, tal como una medición de la fluorescencia (eje y). Algunas, pero no todas, las curvas de crecimiento tienen una forma sigmoidea.

- 5 Como se emplea en la presente memoria, la "fase de referencia" de una curva de crecimiento se refiere a la fase inicial de la curva en donde la cantidad de producto (tal como un amplicón) aumenta a una velocidad sustancialmente constante, siendo esta velocidad menor que la velocidad de aumento característica de la fase de crecimiento (que puede tener un perfil logarítmico lineal) de la curva de crecimiento. La fase de referencia de una curva de crecimiento generalmente tiene una pendiente muy poco profunda, con frecuencia aproximada a cero.
- 10 Como se emplea en la presente memoria, la "fase de crecimiento" de una curva de crecimiento se refiere a la porción de la curva en donde el producto medible aumenta sustancialmente a lo largo del tiempo. La transición desde la fase de referencia a la fase de crecimiento en una reacción típica de amplificación de ácido nucleico se caracteriza por la aparición de amplicón a una velocidad que aumenta a lo largo del tiempo. La transición de la fase de crecimiento a la fase de meseta de la curva de crecimiento comienza en un punto de inflexión donde la velocidad de aparición de amplicón comienza a disminuir.
- 15 Como se emplea en la presente memoria, la "fase de meseta" de una curva de crecimiento trifásica se refiere a la fase final de la curva. En la fase de meseta, la velocidad de formación de producto medible generalmente es sustancialmente más baja que la velocidad de producción de amplicón en la fase logarítmica lineal, e incluso puede acercarse a cero.
- 20 Como se emplea en la presente memoria, la frase "indicios de amplificación" se refiere a características de curvas ejecutadas en tiempo real que indican un nivel predeterminado de progreso en las reacciones de amplificación de ácido nucleico. Tales indicios se determinan comúnmente mediante análisis matemático de curvas ejecutadas, a veces denominadas "curvas de crecimiento", que muestran una señal medible (tal como una lectura de fluorescencia) cuya intensidad está relacionada con la cantidad de un amplicón presente en una mezcla de reacción como una función del tiempo, número de ciclos, etc.
- 25 Como se emplea en la presente memoria, la frase "indicios de amplificación basados en el umbral" se refiere a los indicios de amplificación que miden el tiempo o el número de ciclos cuando una señal de la curva de crecimiento cruza un valor o umbral arbitrarios. Las determinaciones de TTime son ejemplos de indicios de amplificación basados en el umbral, mientras que las determinaciones de TArc y OTArc son ejemplos de indicios de amplificación no basados en el umbral.
- 30 Como se emplea en la presente memoria, la frase indicios de amplificación "dependientes del tiempo" se refiere generalmente a indicios de amplificación p. ej., un parámetro de progreso de reacción) que se miden en unidades de tiempo (p. ej., minutos). Los indicios de amplificación dependientes del tiempo se utilizan comúnmente para monitorizar el progreso en las reacciones isotérmicas de amplificación de ácido nucleico que no se caracterizan por distintos "ciclos". TTime, TArc y OTArc son ejemplos de indicios de amplificación dependientes del tiempo.
- 35 Como se emplea en la presente memoria, un "calibrador interno" (a veces "CI" en la presente memoria) es un polinucleótido que se puede amplificar en una reacción de amplificación de ácido nucleico *in vitro*, y que es distinguible de un polinucleótido analito que se co-amplificó en la misma reacción. "Interno" significa que el polinucleótido calibrador se amplifica, detecta y cuantifica dentro de la misma mezcla de reacción que el polinucleótido analito, o fragmento del mismo. En términos generales, la cantidad o concentración del calibrador interno será constante en diferentes reacciones utilizadas para preparar curvas de calibración y para cuantificar el polinucleótido analito. Preferiblemente, la cantidad o concentración constante de calibrador interno será una cantidad conocida de calibrador interno, o una concentración conocida de calibrador interno. Preferiblemente, el calibrador interno y el polinucleótido analito se co-amplifican en un *in vitro* reacción de amplificación de ácido nucleico utilizando uno o más oligómeros o cebadores de amplificación diferentes. Por ejemplo, los polinucleótidos analito y calibrador interno empleados en los ejemplos de trabajo detallados a continuación se amplificaron utilizando oligonucleótidos de amplificación que no se compartieron. Alternativamente, el calibrador interno y el polinucleótido analito se co-amplifican en una reacción de amplificación de ácido nucleico *in vitro* utilizando uno o más oligómeros o cebadores de amplificación idénticos.
- 40
- 45 Como se emplea en la presente memoria, la frase "como una función de" describe la relación entre una variable dependiente (es decir, una variable que depende de una o más variables diferentes) y una variable independiente (es decir, una variable que puede tener su valor libremente elegido sin considerar los valores de ninguna otra variable), en donde cada valor de entrada para la variable independiente se refiere a exactamente un valor de salida para la variable dependiente. La notación convencional para una ecuación que relaciona un valor de  $y$  (es decir, la variable dependiente) "como una función de" un valor  $x$  (es decir, la variable independiente) es  $y = f(x)$ .
- 50
- Como se emplea en la presente memoria, "optimizar" o "ajustar" una ecuación se refiere a un procedimiento, como se practica comúnmente en los procedimientos de modelado matemático o de ajuste de curvas, para obtener valores numéricos para los coeficientes en una ecuación para producir una expresión que "se ajuste" o se aproxime a las mediciones experimentales. Por lo general, una ecuación optimizada definirá una curva de mejor ajuste.
- 55 Como se emplea en la presente memoria, los términos "ecuación optimizada" y "ecuación ajustada" son referencias alternativas a una ecuación que contiene valores numéricos fijos para coeficientes como resultado de un procedimiento de optimización. Las curvas "ajustadas" resultan de la optimización de una ecuación.

Por "local" se entiende relacionado con un usuario final. Por ejemplo, un instrumento local se refiere a un instrumento de usuario final. Un gráfico de calibración local se refiere a un gráfico de calibración que utiliza los resultados obtenidos por un usuario final, por ejemplo, realizando una reacción de amplificación en el instrumento local.

5 Por "recalibrar" o "recalibración" se entiende un procedimiento o resultado de calibración posterior a un procedimiento o resultado de calibración anterior que se realiza u obtiene utilizando el mismo instrumento. Por ejemplo, la primera vez que se realiza un procedimiento de calibración utilizando un instrumento que amplifica los ácidos nucleicos y monitoriza la síntesis de amplicones como una función de los números de ciclo o el tiempo (p. ej., un instrumento de PCR en tiempo real), se pueden amplificar dos patrones de calibración diferentes y se puede generar un gráfico de calibración. El gráfico de calibración puede relacionar matemáticamente un valor de relación como una función de la cantidad objetivo inicial introducida en la reacción de amplificación. Un procedimiento de recalibración emplearía ese mismo instrumento para producir un gráfico de calibración posterior o actualizado.

10 Por "gráfico de calibración" se entiende una representación gráfica o matemática que relaciona una cantidad que se puede medir para una reacción de amplificación (p. ej., una razón de valores umbral medidos para la diana amplificada y el calibrador interno) a una cantidad conocida de entrada de sustrato en la reacción de amplificación (p. ej., la cantidad inicial de ácido nucleico diana). Un gráfico de calibración se establece preferiblemente utilizando un soporte lógico de hoja de cálculo de ordenador, e incluye representaciones electrónicas de resultados de calibración o información. "Gráfico de calibración" y "curva de calibración" se utilizan indistintamente. Se debe entender que un gráfico o curva de calibración se puede referir a curvas de calibración lineales y no lineales.

15 Como se emplea en la presente memoria, un "punto fijo" es un punto de datos (p. ej., que tienen coordenadas x e y) que se puede utilizar para establecer un gráfico de calibración en un procedimiento de calibración o recalibración, donde ese punto de datos no cambia con el tiempo. El punto fijo se puede determinar y utilizar en un solo aparato (p. ej., un instrumento local). Alternativamente, el punto fijo se puede determinar utilizando un aparato en el sitio del fabricante de un kit de ensayo, y a continuación utilizar por un cliente o usuario final en un aparato diferente.

20 Por "kit" se entiende una combinación de materiales empaquetados, típicamente destinados a utilizarse en conjunto. Los kits según la descripción pueden incluir instrucciones u otra información en forma "tangibles" (p. ej., información impresa, grabada electrónicamente en un medio legible por ordenador, o grabada de otra manera en un medio legible por máquina, tal como un código de barras para almacenar valores numéricos).

25 Por "que consiste esencialmente en" se entiende que el/los componente(s), la(s) composición/composiciones o etapa(s) del método adicionales que no cambian materialmente las características básicas y novedosas de la presente descripción se pueden incluir en la presente descripción. Cualquiera de los componente(s), composición/composiciones o etapa(s) del método que tengan un efecto material sobre las características básicas y novedosas de la presente descripción quedarían fuera de este término.

#### Métodos preferidos de amplificación de ácido nucleico

35 Los ejemplos de métodos de amplificación útiles con relación a la presente descripción incluyen, pero no se limitan a: amplificación mediada por transcripción (TMA), amplificación de ácido nucleico de cebador único, amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (NASBA), reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación de desplazamiento de hebra (SDA), replicación de secuencia autosostenida (3SR), reacción de la cadena de la ligasa de ADN (LCR) y métodos de amplificación utilizando moléculas de polinucleótidos autorreplicantes y enzimas de replicación tales como ARN de MDV-1 y enzima Q-beta. Los métodos para llevar a cabo estas diversas técnicas de amplificación respectivamente se pueden encontrar en Patente de Estados Unidos Núm. 5.399.491, la Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 2006/046265, Solicitud de Patente Europea Publicada EP 0 525 882, Patente de Estados Unidos Núm. 4.965.188, Patente de Estados Unidos Núm. 5.455.166, Guatelli *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874-1878 (1990), Publicación internacional Núm. WO 89/09835, Patente de Estados Unidos Núm. 5.472.840 y Lizardi *et al.*, *Trends Biotechnol.* 9:53-58 (1991).

40 El algoritmo y el método descritos también se pueden utilizar para procesar resultados obtenidos utilizando reacciones de amplificación que requieren solo un cebador extensible. Estas reacciones incluyen sistemas de amplificación asociados a la transcripción que emplean un único cebador extensible combinado con un oligonucleótido bloqueado en 3' que no puede extenderse por una polimerasa de ácido nucleico. Los métodos para llevar a cabo tales reacciones de amplificación se detallan, por ejemplo, en la Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 2006/046265.

#### Ejemplos de indicios útiles de amplificación

45 Se pueden utilizar una variedad de indicios de amplificación con relación al método descrito. Por ejemplo, las técnicas matemáticas y de computación que serán familiares para aquellos que tienen un nivel normal de conocimiento práctico de la técnica se pueden utilizar para identificar el tiempo de aparición del máximo de la primera derivada, o el tiempo de aparición del máximo de la segunda derivada de una curva ejecutada en tiempo real. Los enfoques para determinar estas características de una curva de crecimiento han sido detallados por Wittwer *et al.*, en la Patente de Estados Unidos Núm. 6.503.720. Otros enfoques útiles implican calcular una derivada de una curva de crecimiento, identificar una característica de la curva de crecimiento y a continuación determinar el tiempo o número de ciclos umbral correspondiente a la característica de la derivada. Tales técnicas se han descrito en la patente de Estados Unidos

6.783.934. Otros indicios útiles más de la amplificación incluyen "TTime" y "TArc". En particular, los diferentes enfoques para determinar los valores de TArc emplean vectores direccionalmente similares (es decir, que dan como resultado un valor identificado simplemente por "TArc") y vectores direccionalmente opuestos (es decir, que dan como resultado un valor identificado como "OTArc"). Otras técnicas más implican la identificación de valores umbral del ciclo (p. ej., "Ct") como el tiempo o número de ciclos durante una reacción en la que una señal, preferiblemente una señal fluorescente, es igual a un umbral estático (p. ej., un valor umbral estático predeterminado). A continuación, se proporcionan descripciones generales de estos métodos.

#### Métodos para determinar los valores TTime

En pocas palabras, los valores TTime estiman el tiempo en el que se pasa un umbral particular que indica la producción de amplicón en una reacción de amplificación en tiempo real. El algoritmo para calcular y utilizar los valores TTime se ha descrito en el documento WO-A-2006/099255. Según este algoritmo, se aplica un procedimiento de ajuste de curva a datos normalizados y ajustados en segundo plano. Aunque se puede emplear cualquiera de las metodologías de ajuste de curva bien conocidas, en una realización preferida, se emplea un ajuste de curva lineal de mínimos cuadrados ("LLS"). El ajuste de la curva se realiza solo para una parte de los datos entre un límite inferior y un límite superior predeterminados. El objetivo final, después de encontrar la curva que se ajusta a los datos, es estimar el tiempo correspondiente al punto en el que la curva o una proyección de la misma se cruza con un valor umbral estático predeterminado. En una realización, el umbral para datos normalizados es 0,11. Los límites superior e inferior se determinan empíricamente como el intervalo en el que las curvas se ajustan a una variedad de conjuntos de datos de control que exhiben la menor variabilidad en el tiempo asociado con el valor umbral dado. En una realización, el límite inferior es 0,04 y el límite superior es 0,36. La curva se ajusta para los datos que se extienden desde el primer punto de datos por debajo del límite inferior hasta el primer punto de datos más allá del límite superior. A continuación, se determina si la pendiente del ajuste es estadísticamente significativa. Por ejemplo, si el valor p del coeficiente de primer orden es menor que 0,05, el ajuste se considera significativo y el procesamiento continúa. Si no, el procesamiento se detiene. Alternativamente, la validez de los datos puede ser determinada por el valor R<sup>2</sup>. La pendiente  $m$  y la intersección de la curva lineal  $y = mx + b$  se determinan para la curva ajustada. Con esa información, se puede determinar TTime.

#### Métodos para determinar los valores TArc

Los indicios de amplificación dependientes del tiempo denominados "TArc" y "OTArc" se determinan utilizando análisis basados en vectores de curvas ejecutadas en tiempo real. El valor TArc identifica el momento en el que una curva de crecimiento comienza a curvarse o "flexionarse" hacia arriba. Este punto determinado se puede utilizar para crear una curva patrón o para establecer un parámetro de una reacción de amplificación que se relacione con la cantidad o concentración de un polinucleótido analito en una muestra de prueba. El análisis vectorial se realiza más convenientemente utilizando curvas de crecimiento que tienen puntos de datos distribuidos en intervalos de tiempo sustancialmente uniformes. Las presentaciones detalladas sobre la determinación y el uso de los valores TArc y OTCArc aparecen en la Patente de Estados Unidos Núm. 7.739.054.

#### Sistemas y aparatos preferidos

Los métodos descritos en la presente memoria se implementan convenientemente utilizando un ordenador o dispositivo de procesamiento similar ("ordenador" de aquí en adelante). Preferiblemente, el soporte lógico o las instrucciones ejecutables por máquina para realizar un algoritmo se pueden cargar o guardar en un componente de memoria de un ordenador independiente, o en un componente de memoria de un ordenador conectado a un dispositivo utilizado para la monitorización, preferiblemente en función del tiempo, de la cantidad de un producto sometido a análisis. Más preferiblemente, el soporte lógico para ejecutar el algoritmo de calibración se mantiene en un componente de memoria de un ordenador que está conectado a, o que es una parte integrante de, un dispositivo capaz de monitorizar la cantidad de un amplicón presente en una mezcla de reacción como una función del tiempo.

De hecho, uno o ambos sistemas de control para controlar un dispositivo de amplificación en tiempo real y/o el sistema de detección del dispositivo de amplificación en tiempo real se pueden acoplar a un ordenador debidamente programado que funcione para instruir el funcionamiento de estos instrumentos según instrucciones preprogramadas o de entrada del usuario. Preferiblemente, el ordenador también puede recibir datos e información de estos instrumentos, e interpretar, manipular y referir esta información al usuario.

En general, el ordenador generalmente incluye un soporte lógico apropiado para recibir instrucciones del usuario, ya sea en forma de entrada del usuario en un conjunto de campos de parámetros o en forma de instrucciones preprogramadas (p. ej., preprogramadas para una variedad de operaciones específicas diferentes). A continuación, el soporte lógico convierte estas instrucciones al lenguaje apropiado para instruir la operación del controlador de amplificación en tiempo real para llevar a cabo la operación deseada. El ordenador también es capaz de recibir datos de uno o más sensores/detectores incluidos en el sistema, e interpreta los datos según la programación. El sistema incluye preferiblemente un soporte lógico que correlaciona una característica de una curva de crecimiento que representa la cantidad de copias amplificadas del ácido nucleico de interés como una función del tiempo, como detectada por el detector, con el número de copias del ácido nucleico de interés presente en una muestra de prueba.

Preferiblemente, cuando el ordenador utilizado para ejecutar el algoritmo de calibración descrito es un componente integrante de un aparato para realizar y analizar reacciones de amplificación de ácido nucleico en tiempo real, el aparato comprende preferiblemente una incubadora con temperatura controlada, un dispositivo de detección para recoger señales, un dispositivo de análisis (p. ej., un ordenador o procesador) para analizar señales y un dispositivo de salida para mostrar los datos obtenidos o generados por el dispositivo de análisis. El dispositivo de análisis puede estar conectado a la incubadora con control de temperatura a través de un dispositivo de entrada conocido en la técnica, y/o conectado a un dispositivo de salida conocido en la técnica para la visualización de los datos. En una realización, la incubadora con temperatura controlada es capaz de realizar ciclos de temperatura.

En términos generales, los diversos componentes de un aparato para realizar la amplificación de ácido nucleico en tiempo real útiles en conexión con los métodos descritos serán componentes convencionales que serán familiares para aquellos que tienen un nivel normal de conocimiento práctico de la técnica. La incubadora de temperatura controlada utilizada para realizar y analizar la amplificación de ácido nucleico en tiempo real puede tener un diseño convencional que puede contener una pluralidad de tubos de reacción o muestras de reacción en un bloque de temperatura controlada en tubos de reacción de amplificación convencionales o en pocillos de una placa multipocillo. En un aspecto, el sistema de detección es adecuado para detectar señales ópticas de una o más marcas fluorescentes. La salida del sistema de detección (p. ej., Señales correspondientes a las generadas durante la reacción de amplificación) se puede alimentar al ordenador para el almacenamiento y manipulación de datos. Preferiblemente, el sistema detecta múltiples tipos diferentes de señales ópticas, tales como múltiples tipos diferentes de marcas fluorescentes y tiene las capacidades de un lector de fluorescencia de microplacas. El sistema de detección es preferiblemente un fluorómetro multiplexado que contiene una fuente de luz de excitación, que puede ser un láser de luz visible o una lámpara ultravioleta o una lámpara halógena, un dispositivo multiplexor para distribuir la luz de excitación a los tubos de reacción individuales y para recibir luz fluorescente del tubos de reacción, un medio de filtración para separar la luz de fluorescencia de la luz de excitación por sus longitudes de onda, y un medio de detección para medir la intensidad de la luz de fluorescencia. Preferiblemente, el sistema de detección de la incubadora con control de temperatura proporciona un amplio intervalo de detección que permite flexibilidad en la elección del fluoróforo, alta sensibilidad y excelente razón señal/ruido. Las señales ópticas recibidas por el sistema de detección generalmente se convierten en señales que pueden ser operadas por el procesador para proporcionar datos que pueden ser visualizados por un usuario en una pantalla de un dispositivo de usuario en comunicación con el procesador. El dispositivo de usuario puede comprender una interfaz de usuario o puede ser un sistema informático convencional disponible comercialmente con un teclado y un monitor de video. Los ejemplos de datos que pueden ser mostrados por el dispositivo del usuario incluyen gráficos de amplificación, gráficos de dispersión, pantallas de valores de muestra para todos los tubos o recipientes de reacción en el ensamblaje y para todas las marcas utilizadas, una pantalla de intensidad de señal óptica (p. ej., pantalla de intensidad de señal fluorescente), resultados de llamadas finales, informes de texto y similares.

#### Productos de programa informático

Se incluyen dentro del alcance de la descripción los productos basados en soporte lógico (p. ej., realizaciones tangibles de soporte lógico para instruir a un ordenador a ejecutar varias etapas de procedimiento) que se pueden utilizar para realizar el método de procesamiento de datos. Estas incluyen instrucciones de soporte lógico almacenadas en medios legibles por ordenador, tales como medios magnéticos, medios ópticos, dispositivos de memoria "flash" y redes informáticas. Además, la descripción abarca un sistema o un aparato que amplifica los ácidos nucleicos, detecta productos de amplificación de ácidos nucleicos y procesa los resultados para indicar un resultado cuantitativo para la diana en una muestra de prueba. Aunque los diversos componentes del aparato funcionan preferiblemente de manera cooperativa, no hay ningún requisito para que los componentes formen parte de un conjunto integrado (p. ej., en un solo chasis). Sin embargo, en una realización preferida, los componentes del aparato están conectados entre sí. En el significado de "conectado" se incluyen conexiones a través de conexiones cableadas e inalámbricas.

Particularmente dentro del alcance de la descripción se encuentra un aparato o sistema que incluye un ordenador conectado a un dispositivo que amplifica ácidos nucleicos y monitoriza la síntesis de amplicones en función del número de ciclos o el tiempo, donde el ordenador está programado para ejecutar el algoritmo cuantitativo descrito en la presente memoria. Un sistema ilustrativo según la descripción incluirá una incubadora con temperatura controlada y un fluorómetro capaz de monitorizar y distinguir al menos dos longitudes de onda de emisiones fluorescentes. Estas emisiones se pueden utilizar para indicar la síntesis de amplicones diana y la síntesis de amplicones CI.

#### Los procedimientos de calibración y recalibración de punto único facilitan el formato de acceso aleatorio

Los dispositivos modernos de "acceso aleatorio" que cuantifican los ácidos nucleicos diana en las muestras de prueba utilizando amplificación en tiempo real de manera ventajosa permitirán al usuario final activar y desactivar los reactivos del instrumento varias veces. Los reactivos para un solo kit pueden, por lo tanto, cargarse/descargarse varias veces antes de que un kit se use por completo. Como resultado, puede ser necesario volver a ejecutar el gráfico de calibración (p. ej., cada vez que se carga el kit en el instrumento). Se podrían gastar recursos significativos del kit para acomodar la función de acceso aleatorio si se emplearon dos o más calibradores para cada procedimiento de calibración o recalibración. Sin embargo, este procedimiento se puede simplificar utilizando un enfoque de punto fijo, como se describe en la presente memoria.

En una realización preferida, el punto fijo es establecido por el fabricante del ensayo y a continuación es proporcionado a un cliente o usuario final en relación con la adquisición de un kit. Por ejemplo, se puede amplificar una colección de patrones de calibración en un instrumento en la ubicación del fabricante del ensayo, por lo que se determinan los indicios de amplificación para cada uno de los patrones de polinucleótidos analito y el CI. Dividiendo estos valores, uno por el otro (p. ej.,  $C_T\text{Diana}/C_T\text{CI}$ ) se establecen los valores de la razón que se pueden trazar utilizando un soporte lógico electrónico de hoja de cálculo. El ajuste de una curva o línea a los puntos recogidos da como resultado un primer gráfico de calibración. La extensión del gráfico de calibración al punto en el que el valor de la razón es igual a cero identifica un punto que se puede utilizar como punto fijo. Más concretamente, el punto extrapolado en el que la cantidad o concentración de la diana de entrada correspondería a un valor de la razón de cero se puede utilizar como punto fijo para preparar gráficos de calibración en el mismo instrumento, o incluso en un instrumento diferente. Dicho de otra manera, todas las gráficas de calibración preparadas utilizando un solo calibrador de ajuste compartirían ese mismo punto fijo.

Se describe fuera del alcance de las reivindicaciones que el usuario final puede preparar el punto fijo que se utilizará para el ajuste de calibración interno utilizando solo el instrumento local. Por ejemplo, esto puede implicar determinar la cantidad de entrada o la concentración del patrón de polinucleótido analito que se espera que produzca un valor de la razón de cero. Por supuesto, esto implicará un esfuerzo adicional, al menos inicialmente, por parte del usuario final. Quizás equilibrar esto es el posible beneficio de crear curvas de referencia específicas para un instrumento en particular.

Se describe fuera del alcance de las reivindicaciones que un usuario final puede establecer un gráfico de calibración convencional en un instrumento local la primera vez que se utiliza un kit. Esto puede implicar la realización de dos reacciones de calibración. La dependencia del tiempo o la dependencia del número de ciclos de la amplificación para la diana y el CI en ambos calibradores se puede determinar y normalizar, por ejemplo, dividiendo los indicios para la diana por los indicios para CI que se amplifican en la misma reacción. Los dos puntos se pueden utilizar para establecer un gráfico de calibración que se puede utilizar inmediatamente para cuantificar los ácidos nucleicos diana en las muestras de prueba. Por separado, el gráfico de calibración resultante se puede proyectar para identificar el punto correspondiente a la cantidad o concentración de diana de entrada asociadas con un valor de la razón de cero. Este punto proyectado se puede utilizar como punto fijo para preparar gráficos de recalibración. Aunque no se utiliza para crear el gráfico de calibración inicial, el punto fijo identificado se puede almacenar para su uso junto con los procedimientos de recalibración.

La recalibración del sistema se puede llevar a cabo utilizando tan solo un calibrador de ajuste único. Dada la disponibilidad de un punto fijo, los indicios de amplificación para la diana y el CI co-amplificado se pueden normalizar para proporcionar un valor de la razón, y el resultado normalizado se utiliza combinado con el punto fijo para dar como resultado una curva de calibración completa.

En términos generales, existe una clara ventaja de realizar procedimientos de calibración y recalibración utilizando recursos mínimos para facilitar la calibración periódica del instrumento. De hecho, la conservación de los recursos de laboratorio es una razón para emplear el procedimiento de calibración o recalibración del sistema de punto único.

#### Métodos preferidos para seleccionar curvas de calibración de referencia y puntos fijos

Los puntos fijos en los gráficos de calibración de la razón de los indicios de amplificación para la diana y el CI en función de la cantidad o concentración objetivo de entrada, como se emplea en el enfoque de calibración descrito, se pueden determinar de varias maneras. En el método reivindicado, se combinan los resultados agrupados de la amplificación y detección de una pluralidad de patrones de calibración utilizando diferentes instrumentos de amplificación y detección en tiempo real, y se ajusta una única curva de calibración de mejor ajuste a los datos agrupados (es decir, indicios agrupados de puntos de datos de amplificación de cada uno de los diferentes patrones de calibración). Esto promedia eficazmente la variación en la gráfica de calibración que resulta de realizar el ensayo en diferentes instrumentos (p. ej., pertenecientes al fabricante del ensayo y al usuario final). En un enfoque alternativo (demostrado en los Ejemplos de trabajo, en la presente memoria), se estableció una sola curva de calibración utilizando los resultados de un solo instrumento en tiempo real. En términos generales, una vez que la curva de calibración se establece por algún medio, sigue un procedimiento de selección de un punto fijo que se va a utilizar combinado con un resultado de un solo calibrador de ajuste ejecutado en el mismo instrumento o en uno diferente. Esto puede implicar probar puntos candidatos de la curva de calibración (p. ej., correspondientes a los diferentes patrones de calibración, puntos de datos interpolados o puntos de datos extrapolados) combinados con los resultados del calibrador de ajuste para producir una curva de calibración "ajustada" útil para cuantificar el polinucleótido analito bajo una variedad de condiciones. Estas diferentes condiciones pueden incluir la ejecución del ensayo en diferentes instrumentos, o el uso de condiciones de reactivo envejecido o "estresado", etc.

En otros enfoques preferidos, el punto fijo se identifica como la cantidad o concentración de diana de entrada que, por extrapolación de un gráfico de calibración produciría un valor de la razón (p. ej.,  $C_T\text{Diana}/C_T\text{CI}$  o  $T\text{TimeDiana}/T\text{TimeCI}$ , etc.) de cero. En el método reivindicado, los gráficos se generan utilizando datos de calibración producidos en diferentes instrumentos. Por ejemplo, se pueden utilizar uno o más instrumentos en el sitio del fabricante de un ensayo para determinar el punto fijo que a continuación se proporciona a un usuario final del kit para su uso en el instrumento de usuario final (es decir, un instrumento diferente del/de los utilizado(s) para realizar la determinación). Fuera del

alcanse de la invención, el punto fijo se puede determinar en el mismo instrumento que se utiliza para cuantificar el ácido nucleico diana en muestras sometidas a prueba (p. ej., un instrumento local). En este caso, el usuario final puede llevar a cabo reacciones de amplificación en un solo instrumento, utilizar los datos resultantes para producir una pluralidad de gráficos de calibración y a continuación utilizar los gráficos de calibración para determinar el punto fijo.

5 Si hay más de dos gráficos de calibración disponibles, puede ser conveniente determinar el punto fijo promediando los valores de la diana de entrada asociados con valores de la razón de cero. En ciertas realizaciones preferidas, los gráficos de calibración utilizados para establecer puntos fijos se preparan utilizando una pluralidad de patrones de calibración diferentes. En ciertas realizaciones altamente preferidas, los gráficos de calibración utilizados para establecer puntos fijos se preparan utilizando dos patrones de calibración diferentes.

## 10 Ejemplos de trabajo

Los procedimientos de captura y amplificación de dianas de ácido nucleico en todos los siguientes ejemplos se realizaron en Gen-Probe Incorporated (San Diego, CA) utilizando un instrumento automatizado capaz de amplificar ácidos nucleicos en condiciones de temperatura controlada y monitorizar la producción de amplicones (p. ej., mediante monitorización óptica de la fluorescencia) como una función del número de ciclos o del tiempo. La Solicitud de Patente de Estados Unidos Publicada 2011/0147610, detalla las características de un instrumento preferido para realizar procedimientos de amplificación en tiempo real. Otro instrumento preferido se describe en el documento U.S. 6.713.297. Los transcritos sintéticos para la diana analito y el CI sirvieron como moldes en las reacciones. Las muestras que se debían procesar y amplificar se prepararon combinando 150.000 copias constantes del transcrito de CI sintético, y una alícuota de 0,5 ml que contenía una cantidad de un transcrito de la diana analito que sirvió como molde para la amplificación. La concentración del ácido nucleico diana utilizado en el procedimiento varió de  $10^2$  a  $10^7$  copias/ml en conjuntos de seis reacciones. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo utilizando ácidos nucleicos molde siguiendo las etapas de captura y lavado de la diana para eliminar o reducir las impurezas en las muestras. Las moldes de la diana y de CI se co-amplificaron en la misma reacción utilizando conjuntos de cebadores independientes (es decir, sin cebadores compartidos). Los productos de amplificación se detectaron y monitorizaron utilizando sondas de hibridación de antorcha molecular específicas de amplicón marcadas de forma distintiva, cada una con un indicador fluorescente diferente. Todas las reacciones de amplificación se realizaron en réplicas. Los valores de tiempo umbral que representan indicios de amplificación para cada uno de la diana y CI co-amplificados se determinaron utilizando el algoritmo TTime, esencialmente como se describe en la Solicitud de Patente de Estados Unidos publicada Núm. 2006/0276972. Los valores de la razón se calcularon dividiendo el valor TTime determinado para la diana (es decir,  $TTime_{Diana}$ ) por el valor TTime determinado para CI (es decir,  $TTime_{CI}$ ) que se amplificaron en la misma reacción.

Para ser claros, el polinucleótido calibrador interno fue el mismo en los patrones de calibración, en el calibrador de ajuste y en las reacciones de amplificación de la muestra de prueba. Además, la cantidad (p. ej., concentración inicial) de polinucleótido calibrador interno fue la misma en todas las reacciones.

35 El Ejemplo 1 describe cómo se utilizó un gráfico de calibración de referencia lineal generado utilizando un primer instrumento que amplificaba el ácido nucleico y monitorizaba la producción de amplicones en un formato en tiempo real para establecer un punto fijo para su uso posterior en procedimientos de calibración de punto único. El primer instrumento se denomina a continuación instrumento "V35".

### Ejemplo 1

#### 40 Establecimiento de un Punto Fijo para el Ajuste de Calibración Interna

Se amplificaron seis patrones de calibración de ácido nucleico en réplicas de cinco utilizando un primer instrumento en tiempo real identificado como V35. Todas las reacciones en el instrumento V35 se llevaron a cabo utilizando un reactivo de captura de la diana convencional ("TCR") para enriquecer el ácido nucleico diana antes de la amplificación. Las muestras utilizadas para las reacciones de calibración tenían volúmenes de 0,5 ml cada una y concentraciones de la diana de ácido nucleico que oscilaban entre  $10^2$  a  $10^7$  copias/ml. Los ácidos nucleicos capturados de las diferentes muestras se co-amplificaron con 150.000 copias fijas de CI en réplicas. Los indicios de amplificación TTime medidos para la diana y el CI se normalizaron para producir valores de la razón umbral (es decir,  $TTime_{Diana}/TTime_{CI}$ ). Se estableció un gráfico de calibración lineal de los valores de la razón como una función de la cantidad (p. ej., concentración) de la diana de entrada y se utilizó para asignar cantidades iniciales de diana reales, denominadas en la presente memoria como cantidades de "valor asignado", a cada patrón de calibración diferente. La Tabla 1 presenta resultados resumidos y concentraciones de valores asignados de los patrones de calibración, donde las asignaciones de valores se establecieron utilizando los seis calibradores. Los resultados numéricos en la Tabla 1 se presentan utilizando más de los dos decimales apropiados.

Tabla 1

Resultados Resumidos para los Patrones de Calibración Amplificados en el Instrumento V35

Núm. Cal.	Cantidad de Diana Aproximada (copias log/ml)	Cantidad de Diana de Valor Asignado (copias log/ml)	Razón (TTime <sub>Diana</sub> /TTime <sub>ci</sub> )
1	2	2,0491	1,0582
2	3	2,9624	0,9424
3	4	3,9637	0,8155
4	5	4,9962	0,6847
5	6	6,0212	0,5548
6	7	7,0073	0,4298

5 El gráfico de calibración lineal ajustado establecido utilizando los datos del instrumento V35 (p. ej., que representa una primera curva de referencia de calibración) fue definida por la Ecuación 1, en donde X e Y son la cantidad de la diana (p. ej., concentración) y valores de la razón, respectivamente.

$$Y = -0,1267 X + 1,3179 \quad \text{[Ecuación 1]}$$

La intersección con X (es decir, el punto en el cual el valor de la razón es igual a cero) calculada utilizando la Ecuación 1 fue 10,3989. Por lo tanto, el punto fijo establecido por este procedimiento fue (10,3989, 0).

10 El ejemplo 2 ilustra cómo el punto fijo establecido en el primer instrumento en tiempo real (es decir, V35) podría utilizarse para procesar los resultados obtenidos en un segundo instrumento en tiempo real (es decir, referido a continuación como "V53"). Los resultados obtenidos con el instrumento V53 para amplificar diferentes patrones de calibración se emparejaron individualmente con el punto fijo que se había establecido utilizando el instrumento V35 para crear gráficos de calibración lineal. Estos gráficos de calibración se utilizaron posteriormente para los resultados de las pruebas de comprobación posteriores de las reacciones restantes realizadas en el instrumento V53. Dicho de otra manera, un patrón de calibración se trató como un calibrador de ajuste, mientras que otros patrones de calibración se trataron como muestras de prueba simuladas, y las cantidades de ácido nucleico diana presentes en las muestras de prueba simuladas se determinaron utilizando la curva de calibración ajustada determinada utilizando los resultados del calibrador de ajuste y el punto fijo.

Ejemplo 2

20 Preparación de una Curva de Calibración Ajustada que Incorpora el Punto Fijo

25 Se realizaron reacciones de amplificación de ácido nucleico similares a las descritas en el Ejemplo 1 y se monitorizaron utilizando el instrumento en tiempo real V53. La Tabla 2 presenta resultados resumidos y concentraciones de valores asignados de los patrones de calibración, donde las asignaciones de valores se realizaron utilizando los seis calibradores. Las cantidades de valor asignado se consideran generalmente valores cuantitativos verdaderos. Los resultados numéricos en la Tabla 2 se presentan utilizando más de los dos decimales apropiados.

Tabla 2

Resultados Resumidos para los Patrones de Calibración Amplificados en el instrumento V53

Núm. Cal.	Cantidad de Diana Aproximada (copias log/ml)	Cantidad de Diana de Valor Asignado (copias log/ml)	Razón (TTime <sub>Diana</sub> /TTime <sub>ci</sub> )
1	2	2,0252	1,0421
2	3	3,0338	0,9174
3	4	3,9105	0,8090

## ES 2 795 677 T3

4	5	4,9968	0,6746
5	6	6,0139	0,5488
6	7	7,0198	0,4244

5 La Tabla 3 ilustra cómo un punto fijo establecido con un primer instrumento (V35) podría utilizarse combinado con un  
único resultado generado en un segundo instrumento (V53) para producir una curva de calibración ajustada. La razón  
y los resultados de valor asignado de los patrones de calibración individuales 1-6 en la Tabla 2 se emparejaron con el  
punto fijo (10,3989, 0) para producir seis curvas de calibración lineal ajustadas diferentes. Por ejemplo, el primer gráfico  
de calibración lineal se basó en los dos puntos (2,0252, 1,0424) y (10,3989, 0). De esta manera, cada patrón de  
calibración se trató independientemente como un patrón de calibración de ajuste simulado. Las entradas restantes en  
la Tabla 2 que no se utilizaron para establecer las curvas de calibración lineal ajustadas a continuación sirvieron como  
muestras de prueba simuladas, y se calcularon las cantidades de la diana. Las diferencias entre las cantidades de la  
diana de valor asignado y los valores calculados utilizando las curvas de calibración ajustadas también se presentan  
10 en la Tabla 3. Todos los valores tabulados están en copias log/ml.

Tabla 3

### Calibración de un Solo Punto Utilizando un Punto Fijo y Resultados del Calibrador de Un Ajuste

Núm. Cal.	Núm. Cal. 1		Núm. Cal. 2		Núm. Cal. 3		Núm. Cal. 4		Núm. Cal. 5		Núm. Cal. 6	
	Diana Calc.	Diferencia										
1	N/A	N/A	2,03	0,01	2,04	0,02	2,05	0,03	2,07	0,05	2,10	0,08
2	3,03	-0,01	N/A	N/A	3,04	0,01	3,05	0,02	3,07	0,03	3,09	0,06
3	3,90	-0,01	3,90	-0,01	N/A	N/A	3,92	0,01	3,93	0,02	3,96	0,05
4	4,98	-0,02	4,98	-0,01	4,99	-0,01	N/A	N/A	5,01	0,01	5,03	0,03
5	5,99	-0,02	5,99	-0,02	6,00	-0,02	6,00	-0,01	N/A	N/A	6,03	0,02
6	6,99	-0,03	6,99	-0,03	7,00	-0,02	7,00	-0,02	7,01	-0,01	N/A	N/A

Todos los valores numéricos en copias log/ml

N/A = no aplicable

15 El ejemplo 3 ilustra cómo el punto fijo establecido por el método descrito anteriormente también se podría utilizar en  
un procedimiento para cuantificar la diana de ácido nucleico utilizando reactivos comprometidos por la degradación  
acelerada.

#### Ejemplo 3

#### Cuantificación de Ácidos Nucleicos Diana Utilizando Reactivos Sometidos a Condiciones de Degradación Acelerada

20 Se amplificaron seis patrones de calibración de ácido nucleico utilizando un tercer instrumento en tiempo real  
identificado como V47. Todas las reacciones se llevaron a cabo utilizando un TCR que se había sometido a  
calentamiento a 55°C durante 28 días para promover la degradación acelerada. Todas las demás condiciones de  
reacción de amplificación y monitorización fueron similares a las descritas anteriormente.

La Tabla 4 presenta resultados resumidos y concentraciones de valores asignados de los patrones de calibración, donde las asignaciones de valores se realizaron utilizando los seis calibradores. Los resultados numéricos en la Tabla 4 se presentan utilizando más de los dos decimales apropiados.

Tabla 4

5 Resultados Resumidos para Patrones de Calibración Amplificados en el instrumento V47 Utilizando Reactivos Sometidos a Degradación Acelerada

Núm. Cal.	Cantidad de Diana Aproximada (copias log/ml)	Cantidad objetivo asignada al valor (copias log/ml)	Ratio (TTime <sup>Diana</sup> /TTime <sub>ci</sub> )
1	2	2,1562	0,8380
2	3	2,8550	0,7628
3	4	3,9198	0,6482
4	5	4,9764	0,5344
5	6	6,0870	0,4148
6	7	7,0057	0,3159

10 Como se indicó anteriormente, los resultados de los patrones de calibración individuales 1-6 en la Tabla 4 se emparejaron con el punto fijo (10,3989, 0) establecido utilizando el instrumento V35 para producir seis curvas de calibración lineal ajustadas diferentes. De esta manera, cada patrón de calibración se trató independientemente como un patrón de calibración de ajuste simulado. Las entradas restantes en la Tabla 4 que no se utilizaron para establecer las curvas de calibración lineal ajustadas sirvieron como muestras de prueba simuladas y se calcularon las cantidades de la diana. Las diferencias entre las cantidades de la diana de valor asignado y los valores calculados utilizando las curvas de calibración ajustadas también se presentan en la Tabla 5. Todos los valores tabulados están en copias log/ml.

15 Tabla 5

Calibración de un Solo Punto Utilizando Un Punto Fijo y Resultados Obtenidos Utilizando Reactivos Envejecidos

Núm. Cal.	Núm. Cal. 1		Núm. Cal. 2		Núm. Cal. 3		Núm. Cal. 4		Núm. Cal. 5		Núm. Cal. 6	
	Diana Calc.	Diferencia										
1	N/A	N/A	2,11	-0,04	2,02	-0,13	1,90	-0,26	1,69	-0,47	1,40	-0,76
2	2,90	0,04	N/A	N/A	2,77	-0,08	2,66	-0,20	2,47	-0,39	2,21	-0,65
3	4,02	0,10	3,99	0,07	N/A	N/A	3,82	-0,10	3,66	-0,26	3,44	-0,48
4	5,14	0,17	5,11	0,14	5,06	0,08	N/A	N/A	4,84	-0,13	4,66	-0,32
5	6,32	0,23	6,30	0,21	6,25	0,17	6,19	0,10	N/A	N/A	5,94	-0,14
6	7,29	0,29	7,27	0,27	7,24	0,24	7,19	0,19	7,12	0,11	N/A	N/A

Todos los valores numéricos en copias log/ml

N/A = no aplicable

5 El Ejemplo 4 ilustra las ventajas del enfoque de calibración de un solo punto descrito procesando los datos de las Tablas 2 y 4 utilizando un punto fijo diferente. Más concretamente, en lugar de utilizar el punto fijo establecido en el Ejemplo 1, se estableció un punto diferente en la curva de calibración producida utilizando el instrumento V35. Como se indica a continuación, este punto fijo diferente arrojó resultados muy buenos cuando se procesaron los datos obtenidos utilizando reactivos convencionales, pero tuvo un mal funcionamiento cuando se procesaron los datos obtenidos utilizando reactivos que habían sido sometidos a condiciones de degradación acelerada.

Ejemplo 4

Uso de un Punto Fijo Diferentes Conduce a una Capacidad Cuantitativa Diferencial

10 La ecuación 1 se resolvió para determinar las coordenadas de un punto en la curva de calibración lineal producida utilizando el instrumento V35, donde el punto correspondía a un nivel de diana de entrada de 7 copias log/ml del patrón de polinucleótido analito. Este punto tenía las coordenadas (7, 0,431).

15 Los resultados de los patrones de calibración individuales 1-6 en la Tabla 2 se emparejaron con el punto fijo (7, 0,431) para producir seis curvas de calibración lineal ajustadas diferentes. De esta manera, cada patrón de calibración se trató independientemente como un patrón de calibración de ajuste simulado. Las entradas restantes en la Tabla 2 que no se utilizaron para establecer las curvas de calibración lineal ajustadas a continuación sirvieron como muestras de prueba simuladas, y se calcularon las cantidades de la diana. Las diferencias entre las cantidades de la diana de valor asignado (es decir, que representan los valores de referencia) y los valores determinados utilizando las curvas de calibración ajustadas también se presentan en la Tabla 6. Todos los valores tabulados están en copias log/ml.

20 Tabla 6

Calibración de un Solo Punto Utilizando Un Punto Fijo y Resultados Obtenidos Utilizando Reactivos Convencionales

Núm. Cal.	Núm. Cal. 1		Núm. Cal. 2		Núm. Cal. 3		Núm. Cal. 4		Núm. Cal. 5	
	Diana Calc.	Diferencia								
1	N/A	N/A	2,02	-0,01	2,01	-0,02	1,97	-0,05	1,88	-0,14
2	3,04	0,01	N/A	N/A	3,02	-0,01	3,00	-0,03	2,93	-0,11
3	3,92	0,01	3,92	0,01	N/A	N/A	3,89	-0,02	3,84	-0,07
4	5,02	0,02	5,01	0,02	5,01	0,01	N/A	N/A	4,96	-0,04
5	6,04	0,03	6,04	0,03	6,04	0,02	6,03	0,02	N/A	N/A
6	7,05	0,03	7,05	0,03	7,05	0,03	7,05	0,03	7,06	0,04

Todos los valores numéricos en copias log/ml

N/A = no aplicable

25 Los resultados de los patrones de calibración individuales 1-6 en la Tabla 4 se emparejaron con el punto fijo (7, 0,431) para producir seis curvas de calibración lineal ajustadas diferentes. De esta manera, cada patrón de calibración se trató independientemente como un patrón de calibración de ajuste simulado. Las entradas restantes en la Tabla 4 que no se utilizaron para establecer las curvas de calibración lineal ajustadas sirvieron a continuación como muestras de prueba simuladas y se calcularon las cantidades de la diana. Las diferencias entre las cantidades de la diana de valor asignado y los valores calculados utilizando las curvas de calibración ajustadas también se presentan en la Tabla 7.

30 Todos los valores tabulados están en copias log/ml.

Tabla 7

Calibración de un Solo Punto Utilizando Un Punto Fijo y Resultados Obtenidos Utilizando Reactivos Sometidos a Degradación Acelerada

Núm. Cal.	Núm. Cal. 1		Núm. Cal. 2		Núm. Cal. 3		Núm. Cal. 4		Núm. Cal. 5	
	Diana Calc.	Diferencia								
1	N/A	N/A	1,92	-0,24	1,23	-0,93	-0,97	-3,12	29,94	27,78
2	3,05	0,20	N/A	N/A	2,29	-0,56	0,51	-2,35	25,7	22,84
3	4,42	0,50	4,29	0,37	N/A	N/A	2,75	-1,17	19,24	15,32
4	5,77	0,79	5,71	0,73	5,53	0,56	N/A	N/A	12,83	7,85
5	7,19	1,11	7,20	1,12	7,23	1,14	7,32	1,23	N/A	N/A
6	8,37	1,36	8,44	1,43	8,63	1,63	9,25	2,25	0,51	-6,49

Todos los valores numéricos en copias log/ml

5 N/A = no aplicable

10 Lo anterior ilustra cómo diferentes puntos de una sola curva de calibración (p. ej., una "primera" curva de calibración) se pueden evaluar como puntos fijos candidato para su uso combinado con un resultado de un solo calibrador de ajuste para reproducir una curva de calibración completa (es decir, la curva de calibración ajustada). Claramente, existen diferencias entre el valor de las curvas de calibración ajustadas resultantes con respecto a la cuantificación del polinucleótido analito en las muestras de prueba. Si bien se utilizaron la intersección con x y un punto de la primera curva de calibración para ilustrar la técnica, se debe entender que se puede elegir cualquier número de puntos de la primera curva de calibración para el análisis. Por ejemplo, los puntos adicionales de la primera curva de calibración que se podrían probar incluirían, sin limitación: la intersección con el eje y, la intersección con el eje x, los valores correspondientes a las cantidades de entrada de polinucleótido analito utilizado en los diversos patrones de calibración, o incluso los puntos interpolados entre la puntos de datos convencionales de calibración, o extrapolados más allá del intervalo dinámico del ensayo.

20 El procedimiento para seleccionar qué punto se debe utilizar como un punto fijo, para procesar resultados cuantitativos obtenidos utilizando un instrumento local que genera una curva de crecimiento, puede tener en cuenta diferentes consideraciones. Estas consideraciones incluyen, de nuevo sin limitación: estabilidad de reactivos, reactivos de ciclo entre diferentes temperaturas, el uso de diferentes condiciones de temperatura para realizar la amplificación de ácido nucleico, etc. Puede ser deseable evaluar la precisión en la concentración recuperada de los patrones de calibración, y seleccionar el punto fijo basado en la más alta precisión proporcionado de ese modo.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para establecer una curva de calibración ajustada para un ensayo cuantitativo realizado utilizando un instrumento local que amplifica un ácido nucleico y monitoriza la síntesis de amplicones a medida que se produce la amplificación, comprendiendo dicho método las etapas de:
- 5 (a) obtención de un par de coordenadas para un punto fijo en una curva de calibración específica para el ensayo cuantitativo, en donde la curva de calibración se ha preparado ajustando una ecuación a una recopilación de resultados obtenidos utilizando una pluralidad de instrumentos, distintos del instrumento local, y
- en donde el par de coordenadas especifica una cantidad de un polinucleótido analito y un indicio normalizado de valor de amplificación;
- 10 (b) obtención de un calibrador de ajuste que comprende una cantidad fija de un calibrador interno y una cantidad conocida del polinucleótido analito;
- (c) co-amplificación del polinucleótido analito y el calibrador interno del calibrador de ajuste utilizando el instrumento local;
- (d) determinación de indicios de amplificación para cada uno del polinucleótido analito y el calibrador interno que se co-amplifican en la etapa (c);
- 15 (e) normalización de los indicios de amplificación determinados para el polinucleótido analito a los indicios de amplificación determinados para el calibrador interno; y
- (f) establecimiento de la curva de calibración ajustada preparando un gráfico de calibración que comprende un primer punto y un segundo punto,
- 20 en donde el primer punto comprende coordenadas para la cantidad conocida del polinucleótido analito del calibrador de ajuste y los indicios normalizados de amplificación para el polinucleótido analito determinado en la etapa (e), y
- en donde el segundo punto comprende el par de coordenadas, obtenido en la etapa (a), para el punto fijo.
2. El método de la reivindicación 1, en donde la cantidad del polinucleótido analito especificado por el par de coordenadas obtenido en la etapa (a) se determina co-amplificando con dicha pluralidad de instrumentos el polinucleótido analito y el calibrador interno contenidos en cada uno de una pluralidad de patrones de calibración,
- 25 en donde cada uno de la pluralidad de patrones de calibración comprende una concentración inicial diferente del polinucleótido analito del calibrador de ajuste, y
- en donde las concentraciones del calibrador interno en cada uno de la pluralidad de patrones de calibración y en el calibrador de ajuste son sustancialmente idénticas.
- 30 3. El método de la reivindicación 2, en donde la curva de calibración de la etapa (a) y la curva de calibración ajustada establecida en la etapa (f) son ambas curvas de calibración lineal descritas por ecuaciones lineales.
4. El método de la reivindicación 2, en donde la etapa (a) y la etapa (b) comprenden colectivamente obtener un kit que comprende el calibrador de ajuste y el par de coordenadas para el punto fijo; preferiblemente,
- 35 en donde el par de coordenadas para el punto fijo comprende un código de barras legible por máquina.
5. El método de la reivindicación 1,
- en donde, la etapa (f) comprende establecer la curva de calibración ajustada preparando, con un procesador en comunicación con el instrumento local, el gráfico de calibración que comprende el primer punto y el segundo punto; preferiblemente,
- 40 en donde el procesador en comunicación con el instrumento local es un componente integrante del instrumento local.
6. El método de la reivindicación 1 o 5, en donde el par de coordenadas obtenido en la etapa (a) especifica la cantidad del polinucleótido analito cuando los indicios normalizados del valor de amplificación de la curva de calibración son cero; o
- en donde la obtención de la etapa (b) comprende combinar la cantidad fija del calibrador interno y la cantidad conocida del polinucleótido analito.
- 45 7. El método de la reivindicación 2, en donde el par de coordenadas obtenido en la etapa (a) especifica la cantidad de polinucleótido analito cuando los indicios normalizados del valor de amplificación de la curva de calibración son cero.

- 5 8. Un producto de programa informático para cuantificar un polinucleótido analito que puede estar presente en una muestra de prueba utilizando un ensayo de amplificación de ácido nucleico que comprende co-amplificación, con un instrumento local que amplifica ácidos nucleicos y monitoriza la síntesis de amplicones como función del tiempo, del polinucleótido analito y una cantidad fija de un calibrador interno, comprendiendo dicho producto de programa informático instrucciones de soporte lógico que, cuando el programa es ejecutado por un ordenador, hacen que el ordenador realice las etapas de:
- (a) recepción de un par de coordenadas para un punto fijo en una curva de calibración específica para el ensayo de amplificación de ácido nucleico que se va a utilizar para cuantificar el polinucleótido analito,
- 10 en donde la curva de calibración se ha preparado ajustando una ecuación a una recopilación de resultados obtenidos utilizando una pluralidad de instrumentos, distintos del instrumento local, y en donde el par de coordenadas específica una cantidad del polinucleótido analito y un indicio normalizado de valor de amplificación;
- (b) obtención de un valor para indicios de amplificación para una cantidad conocida del polinucleótido analito normalizada a indicios de amplificación para la cantidad fija del calibrador interno contenido en un calibrador de ajuste y que se co-amplifica en una primera reacción de amplificación realizada con el instrumento local;
- 15 (c) preparación de una curva de calibración ajustada que comprende un primer punto y un segundo punto, en donde el primer punto comprende coordenadas para la cantidad conocida del polinucleótido analito del calibrador de ajuste y el valor obtenido en la etapa (b), y en donde el segundo punto comprende el par de coordenadas, recibido en la etapa (a), para el punto fijo;
- (d) obtención de un valor para indicios de amplificación para una cantidad desconocida del polinucleótido analito en la muestra de prueba normalizada a indicios de amplificación para la cantidad fija del calibrador interno que se co-amplifica con el mismo en una segunda reacción de amplificación realizada con el instrumento local ;
- 20 (e) comparación del valor obtenido en la etapa (d) con la curva de calibración ajustada para producir un resultado cuantitativo para la cantidad desconocida del polinucleótido analito presente en la muestra de prueba; y
- (f) generación de un registro del resultado cuantitativo de la etapa (e).
- 25 9. El producto de programa informático de la reivindicación 8, en donde el par de coordenadas recibidas en la etapa (a) especifica la cantidad del polinucleótido analito cuando la curva de calibración se proyecta a un indicio normalizado de valor de amplificación de cero; o
- en donde las instrucciones de soporte lógico comprenden instrucciones de soporte lógico almacenadas en un medio seleccionado del grupo que consiste en: un disco óptico, un medio de almacenamiento magnético, una unidad flash, un disco duro de ordenador, y una unidad de red accesible por al menos un ordenador; o
- 30 en donde la etapa (b) y la etapa (d) comprenden cada una la obtención mediante cálculo matemático; o en donde las etapas (b) y (d) comprenden la obtención mediante la recepción de entradas numéricas para los valores respectivos.
- 35 10. El producto de programa informático de la reivindicación 8 o 9, en donde la curva de calibración ajustada preparada en la etapa (c) se define mediante una ecuación lineal; o en donde el registro de la etapa (e) está impreso en papel; o en donde el ensayo de amplificación de ácido nucleico es un ensayo de amplificación isotérmica de ácido nucleico.
11. Un aparato para determinar la cantidad inicial de una secuencia de ácido nucleico diana en una muestra de prueba, comprendiendo el aparato:
- 40 (a) al menos un mecanismo de detección que mide:
- (i) señales indicativas de las cantidades respectivas de la secuencia de ácido nucleico diana y de un primer calibrador interno que se amplifica en una primera reacción de amplificación de ácido nucleico, en donde el primer calibrador interno comprende una segunda secuencia de ácido nucleico diferente de la secuencia de ácido nucleico diana;
- 45 (ii) señales indicativas de las cantidades respectivas de una cantidad conocida de un polinucleótido analito y un segundo calibrador interno que se amplifica en una segunda reacción de amplificación de ácido nucleico, en donde el polinucleótido analito y el segundo calibrador interno son ambos componentes de un calibrador de ajuste,

en donde el segundo calibrador interno comprende la segunda secuencia de ácido nucleico, y

en donde la cantidad inicial de la segunda secuencia de ácido nucleico es sustancialmente igual en la primera y segunda reacciones de amplificación de ácido nucleico;

(b) al menos un procesador en comunicación con el mecanismo de detección,

5 en donde el procesador está programado con un par de coordenadas para un punto fijo que especifica una cantidad de polinucleótido analito y un indicio normalizado de valor de amplificación, obteniéndose el punto fijo a partir de una curva de calibración específica para el ensayo cuantitativo, en donde la curva de calibración ha sido preparada ajustando una ecuación a una recopilación de resultados obtenidos utilizando una pluralidad de instrumentos, distintos del instrumento local; y

10 en donde el procesador se programa adicionalmente para realizar las etapas de:

(i) determinación a partir de los valores respectivos de las señales medidas para indicios de amplificación para la cantidad conocida del polinucleótido analito, de cada uno del primer y segundo calibradores internos, y la secuencia de ácido nucleico diana;

15 (ii) normalización de los indicios de valor de amplificación determinado para la secuencia de ácido nucleico diana a los indicios de valor de amplificación determinado para el primer calibrador interno;

(iii) normalización de los indicios de valor de amplificación determinado para la cantidad conocida el polinucleótido analito a los indicios de valor de amplificación determinado para el segundo calibrador interno;

(iv) establecimiento de una curva de calibración desde el punto fijo, la cantidad conocida del polinucleótido analito y los indicios normalizados de amplificación para la cantidad conocida del polinucleótido analito; y

20 (v) determinación de la cantidad inicial de la secuencia de ácido nucleico diana en la muestra de prueba utilizando la curva de calibración y los indicios normalizados de amplificación para la secuencia de ácido nucleico diana.

25 12. El aparato de la reivindicación 11, en donde el par de coordenadas para el punto fijo se determina utilizando resultados de una pluralidad de reacciones de amplificación de ácido nucleico realizadas utilizando solo un aparato que no sea el aparato que realizó la primera y segunda reacciones de amplificación de ácido nucleico; preferiblemente,

en donde un miembro de dicho par de coordenadas especifica un indicio normalizado de valor de amplificación de cero; o

en donde la curva de calibración en la etapa (iv) se define mediante una ecuación lineal.

30 13. El aparato de la reivindicación 11 o 12, en donde dicho al menos un mecanismo de detección comprende un fluorómetro que mide señales fluorescentes; o

el aparato comprende adicionalmente una incubadora con temperatura controlada en la que tienen lugar la primera y la segunda reacciones de amplificación de ácido nucleico; preferiblemente,

en donde la incubadora con temperatura controlada mantiene una temperatura sustancialmente constante, y

35 en donde la primera y segunda reacciones de amplificación de ácido nucleico son reacciones de amplificación isotérmicas de ácido nucleico.