



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 31 913 T2** 2006.07.13

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 915 169 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 31 913.3**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 109 364.4**

(96) Europäischer Anmeldetag: **22.05.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **12.05.1999**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **19.10.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **13.07.2006**

(51) Int Cl.⁸: **C12Q 1/68 (2006.01)**

G06F 19/00 (2000.01)

G06F 17/18 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

862905 23.05.1997 US

(73) Patentinhaber:

**Becton, Dickinson and Co., Franklin Lakes, N.J.,
US**

(74) Vertreter:

Weickmann & Weickmann, 81679 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, CH, DE, ES, FR, IT, LI

(72) Erfinder:

**Haaland, Perry D., Chapel Hill, North Carolina
27516, US**

(54) Bezeichnung: **Verfahren, Geräte und Rechnerprogrammeprodukte zum Nachweis der Mengen von Nukleinsäure-Sequenzen in Proben**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Gebiet der Erfindung

[0001] Diese Erfindung bezieht sich auf Verfahren, Apparate und Computerprogrammprodukte zum Kennzeichnen von Nucleinsäuresequenzen und genauer gesagt auf Verfahren, Apparate und Computerprogrammprodukte zum Bestimmen der Mengen von Nucleinsäuresequenzen in Proben.

Allgemeiner Stand der Technik

[0002] Die quantitative Nucleinsequenzanalyse spielt auf den Gebieten der biologischen und medizinischen Forschung eine zunehmend wichtige Rolle. Beispielsweise wurde eine quantitative Genanalyse zur Bestimmung der Genommenge eines bestimmten Gens eingesetzt, wie im Fall des menschlichen HER-2-Oncogens, das in ungefähr 30% der Fälle von Brustkrebs beim Menschen amplifiziert wird. D. J. Slamon et al., *Science* 235, 177–182 (1987). In jüngerer Zeit wurde die Gen- und Genomquantifizierung auch bei der Bestimmung und Überwachung der Pegel des menschlichen Immunschwächevirus (HIV) bei einem Patienten in all den verschiedenen Phasen der HIV-Infektion und Erkrankung angewandt. M. R. Furtado et al., *J Virol.* 69, 2092–2100 (1995). Es wurde behauptet, dass höhere Pegel von zirkulierendem HIV und das Unvermögen, die Virusreplikation nach der Infektion wirksam zu kontrollieren, mit einer negativen Prognose der Erkrankung zusammenhängen könnten; anders ausgedrückt, es könnte ein Zusammenhang zwischen dem Virusgehalt (HIV-Replikation) und der Pathogenese der Erkrankung bestehen. M. Paitak et al., *Science* 259, 1749–1754 (1993). Demgemäß kann eine genaue Bestimmung der HIV-Nucleinsäurepegel in einer frühen Phase der Infektion als nützliches Instrument zur Diagnostizierung der Krankheit dienen, während die Fähigkeit zur korrekten Überwachung der veränderlichen Pegel an viraler Nucleinsäure bei einem Patienten im gesamten Krankheitsverlauf den Klinikern entscheidende Informationen über die Wirksamkeit einer Behandlung und das Fortschreiten der Erkrankung liefern kann. Außerdem stellt die Bestimmung von Virion-assoziierten HIV RNA-Pegeln im Plasma eine Markierung der Virusreplikation dar, und zwar mit einer umfassenden potentiellen Anwendbarkeit bei der Bewertung der Wirksamkeit einer Antiretrovirus-Therapie. Id.

[0003] Mehrere Verfahren zur quantitativen Analyse von Nucleinsäuresequenzen wurden beschrieben. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und die Reverse-Transcriptase-PCR (RT-PCR) ermöglichten die Analyse kleiner Ausgangsmengen von Nucleinsäure (d.h. so wenig wie ein Zelläquivalent). Siehe z.B. S. Edmands et al. 1994, *PCR Methods Applic.* 3, 317–19; I. R. Rodriguez et al. 1992, *Nucleic Acids*

Res. 20, 3528. Frühe Berichte über eine quantitative PCR handeln von einer Quantifizierung des PCR-Produkts, messen jedoch nicht die anfängliche Zielsequenzmenge. F. Ferre 1992, *PCR Methods Applic.* 2, 1–9. Im Allgemeinen umfassen diese Verfahren das Messen des PCR-Produkts am Ende eines Temperaturwärmewechsels und das In-Beziehung-Setzen dieses Pegels mit der DNA-Ausgangskonzentration. Leider weist die absolute Menge an erzeugtem Produkt nicht immer ein folgerichtiges Verhältnis zur Menge an Zielsequenz auf, die am Beginn der Reaktion vorhanden ist, und zwar insbesondere bei klinischen Proben. Eine solche „Endpunkt“-Analyse zeigt das Vorhandensein oder Fehlen einer Ausgangsnucleinsäure, bietet jedoch im Allgemeinen keine genaue Maßeinheit für die Anzahl von DNA-Zielen. Id. Sowohl die Kinetik als auch die Effizienz der Amplifikation einer Zielsequenz hängen von der Ausgangsabundanz dieser Sequenz ab, sowie von der Sequenzübereinstimmung der Primer und der Zielmatrize, und können auch von in der Probe vorhandenen Inhibitoren beeinflusst sein. Bei einer PCR-Analyse von RNA-Proben sind die variablen Effizienzen sowohl beim Reverse-Transcription- als auch beim Amplifikationsschritt mögliche Quellen einer Variabilität. Aus diesen Gründen liefert ein Vergleich der Menge an von der Probe abgeleitetem PCR-Produkt mit der Menge an Produkt aus einem separat amplifizierten externen Kontrollstandard keine genaue Basis für eine Quantifizierung.

[0004] Ein spezifischer Ansatz für eine Nucleinsäureamplifikation besteht in der Messung der Menge an PCR-Produkt in der Logarithmus-Phase der Reaktion vor dem Plateau. Siehe z.B. Kellogg et al. 1990, *Anal. Biochem.* 189, 202–208; S. Pang et al. 1990, *Nature* 343, 85–89. Dieses Verfahren erfordert, dass jede Probe dieselben Einsatzmengen an Nucleinsäure aufweist und dass jede Probe bei der Analyse mit identischer Effizienz amplifiziert, und zwar bis hinauf zur quantitativen Analyse. Eine Gensequenz (die in allen Proben in einer relativ konstanten Menge vorhanden ist) kann für eine Normalisierung der Effizienz der Probenamplifikation verwendet werden. Bei Anwendung herkömmlicher Verfahren zur PCR-Detektion und Quantifizierung ist es jedoch äußerst mühsam sicherzustellen, dass alle Proben während der Logarithmus-Phase der Reaktion analysiert werden, und zwar sowohl für das Zielgen als auch für das Normalisierungsgen.

[0005] Ein weiteres Verfahren, die quantitative Konkurrenz-PCR (QC-PCR), wurde entwickelt und ebenfalls weithin für die PCR-Quantifizierung verwendet. Siehe z.B. P. D. Siebert und J. W. Larrick 1992, *Nature* 359, 557–558; M. J. Piatak et al. 1993, *BioTechniques* 14, 70–81; X. Tan et al. 1994, *Biochim. Biophys. Acta* 1215, 157–162; L. Raeymaekers 1995, *Genome Res.* 5, 91–94. Die QC-PCR beruht auf der Einbeziehung einer bekannten Menge eines internen

Kontrollkonkurrenten bei jeder Reaktionsmischung. Die Effizienz jeder Reaktion wird auf den internen Konkurrenten normiert. Um eine relative Quantifizierung zu erhalten, wird das unbekannte Ziel-PCR-Produkt üblicherweise durch Gelelektrophorese mit dem bekannten Konkurrenz-PCR-Produkt verglichen. Die relative Menge an zielspezifischer und Konkurrenz-DNA wird gemessen; dieses Verhältnis wird zur Berechnung der Ausgangszahl von Zielmatrizen herangezogen. Grundsätzlich ist bei dieser Art von Analyse die DNA-Ausgangskonzentration umso höher, je größer das Verhältnis zwischen zielspezifischem Produkt und konkurrenzspezifischem Produkt ist. Der Erfolg einer QC-PCR-Analyse beruht auf der Entwicklung einer internen Kontrolle, welche mit derselben Effizienz wie das Zielmolekül amplifiziert. Das Design des Konkurrenten und die Prüfung der Amplifikationseffizienzen erfordern jedoch großen Aufwand. Beim QC-PCR-Verfahren zur RNA-Quantifizierung wird eine konkurrierende RNA-Matrize, welche auf die Zielsequenz, die von Interesse ist, abgestimmt ist, sich von dieser aber durch eine eingebrachte interne Deletion unterscheidet, bei einer konkurrierenden Titration der Reverse-Transcription- und PCR-Schritte verwendet, wobei sie eine strikte interne Kontrolle schafft. Siehe z.B. A. Rashtchian 1994, PCR Methods. Applic. 4, S83–S91. M. Clementi et al. 1993, PCR Methods Applic. 2, 191–196; M. Becker-Andre 1991, Meth. Molec. Cell. Biol. 2, 189–201; R. K. McCulloch et al. 1995, PCR Methods Applic. 4, 219–226. Zunehmende Mengen bekannter Kopienzahlen einer konkurrierenden Matrize werden zu Replikationsanteilen der Testprobe hinzugefügt, und die Quantifizierung beruht auf einer Bestimmung der relativen (nicht absoluten) Mengen der verschiedenen bemessenen amplifizierten Produkte, die von den Wildtyp- und konkurrierenden Matrizen abgeleitet sind, und zwar nach einer elektrophoretischen Trennung.

[0006] Abgesehen davon, dass sie ein zeitaufwendiges und mühsames stromabwärts gerichtetes Processing wie z.B. eine Hybridisierung oder Gelelektrophorese erfordern, sind diese Analysen im dynamischen Bereich eingeschränkt (d.h. hinsichtlich der Sensibilität gegenüber einem Bereich von Zielnucleinsäurekonzentrationen). Bei Konkurrenzanalysen kann die Sensibilität gegenüber Unterschieden in der Matrizenkonzentration beispielsweise beeinträchtigt werden, wenn entweder die Ziel-DNA oder die hinzugefügte Konkurrenz-DNA in viel größerer Menge als die jeweils andere vorhanden ist. Der dynamische Bereich der die Menge an Endprodukt messenden Analysen kann auch dadurch eingeschränkt sein, dass die gewählte Anzahl an Zyklen bei manchen Reaktionen vor den anderen Reaktionen eine „Plateau“-Stufe des Produkts erreicht haben könnte. Siehe z.B. L. Raeymaekers, oben. Unterschiede in den Matrizen-Ausgangspegeln könnten daher bei diesen Reaktionen nicht gut widerspiegelt werden. Wei-

ters können geringe Unterschiede in der gemessenen Menge an Produkt zu weithin variierenden Schätzungen der Matrizen-Ausgangskonzentration führen, was Ungenauigkeiten aufgrund veränderlicher Reaktionsbedingungen, Veränderungen bei der Probenahme oder aufgrund des Vorhandenseins von Inhibitoren zur Folge hat.

[0007] Im Bestreben, den zur Bestimmung einer anfänglichen Nucleinsäuremenge nötigen Umfang an Postamplifikationsanalyse zu verringern, wurden zusätzliche Verfahren zur Messung der Nucleinsäureamplifikation in „Echtzeit“ entwickelt. Diese Verfahren nutzen im Allgemeinen fluoreszierende Markierungen (z.B. fluoreszierende Farbstoffe), welche die Menge an Nucleinsäure, die amplifiziert wird, anzeigen können, und nutzen das Verhältnis zwischen der Anzahl an Zyklen, die zur Erzielung eines ausgewählten Fluoreszenzsignalpegels erforderlich ist, und der Konzentration von amplifizierbaren Zielen, die am Beginn des PCR-Prozesses vorhanden sind. Die EP-A-0 640 828 beschreibt beispielsweise eine quantitative Analyse für eine amplifizierbare Nucleinsäure-Zielsequenz, welche die Anzahl an Temperaturzyklen, die zum Erreichen einer bestimmten Konzentration von Zielsequenz erforderlich ist, mit der Menge an Ziel-DNA, die am Beginn des PCR-Prozesses vorhanden ist, in eine Wechselbeziehung bringt. Bei diesem Analysesystem wird ein Satz von Reaktionsmischungen für die Amplifikation vorbereitet, wobei eine Zubereitung eine unbekannte Konzentration an Zielsequenz umfasst und andere Zubereitungen bekannte Konzentrationen (Standards) der Sequenz enthalten. Die Reaktionsmischungen enthalten auch einen fluoreszierenden Farbstoff, der fluoresziert, wenn er an doppelsträngige DNA bindet. Die Reaktionsmischungen werden für eine Reihe von Zyklen parallel in einem Wärmekreislauf geführt, um eine ausreichende Amplifikation der Ziele zu erreichen. Die von den Reaktionsmischungen ausgestrahlte Fluoreszenz wird in Echtzeit überwacht (d.h. beim Auftreten der Amplifikationsreaktionen), und die Anzahl an Zyklen, die für jede Reaktionsmischung erforderlich ist, um bis zu einer beliebigen Intensitätsschwelle (einem beliebigen Fluoreszenzwert oder AFV) fluoreszieren zu können, wird bestimmt. Die Anzahl an Zyklen, die für die Mischung einer unbekanntes Nucleinsäure zur Erreichung des AFV-Werts erforderlich ist (C_T), wird danach mit der Anzahl an Zyklen, die für die bekannten Mischungen zur Erreichung des AFV-Werts erforderlich ist, verglichen. Dieses Verfahren beruht auf einem direkten Zusammenhang zwischen der Anzahl an Zyklen, die zur Erzielung einer bestimmten Fluoreszenzintensität erforderlich ist, und dem Logarithmus der Konzentration der Nucleinsäureziele. Dieses Verhältnis wird somit verwendet, um in der Mischung von unbekannter Konzentration die anfängliche Menge an Zielnucleinsäuresequenz zu erhalten. Das Verfahren sorgt für die Auswahl eines beliebigen Schwellenwerts, an

dem die Anzahlen von Amplifikationszyklen zu messen sind, und zwar indem aufgezeichnete Amplifikationsprofile (Amplifikationskurven) analysiert werden, um einem AFV zu finden, bei dem die unbekanntesten Amplifikationsprofile mit dem Standard-Amplifikationsprofil zu vergleichen sind. Der anfänglichen Auswahl des AFV- oder Grenzwerts wird jedoch keine besondere Bedeutung zugeschrieben, da ein beispielhafter AFV-Wert dazu ausgewählt wird, in der Mitte eines Bereichs zu liegen, in dem alle Amplifikationskurven relativ gerade sind (d.h. im Übergang von einer exponentiell ansteigenden Amplifikation zu einer Abwärtskurve, bis hin zu einer Asymptote). Überdies werden ähnliche Ergebnisse bei der Nucleinsäurequantifizierung für einen recht umfassenden Bereich von AFV-Werten gemeldet. Ein Defizit dieses bekannten Verfahrens besteht darin, dass das Verfahren unterhalb einer anfänglichen Kopienzahl von 10^3 Zielsequenzmolekülen hinsichtlich einer genauen Bestimmung der Anfangskonzentration unzuverlässig ist. Ein weiteres Defizit dieses Verfahrens besteht darin, dass angenommen wird, dass die Form jeder Amplifikationskurve dieselbe bleibt, egal, ob dies tatsächlich der Fall ist oder nicht. Letztendlich werden nur einige Datenpunkte in der Nähe des beliebigen Grenzwerts zur Bestimmung der anfänglichen Zielnucleinsäurekonzentration herangezogen.

[0008] C. A. Heid et al. 1996 (Genome Research 6, 986–994) und U. Gibson et al. 1996 (Genome Research 6, 995–1001) berichten über Verfahren zur quantitativen Echtzeit-PCR für eine DNA- bzw. RNA-Quantifizierungsanalyse. Beide Analysen nutzen Doppelfluoreszenz-Reportersysteme und beruhen auf der Verwendung der 5'-Nuclease-Analyse, die von Holland et al. 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 7276–7280, beschrieben wurde. Bei diesen Verfahren erzeugt ein Computeralgorithmus ein Amplifikationsdiagramm durch einen Vergleich der Menge an Reporterfarbstoff-Emission mit der Anzahl an Amplifikationszyklen, die aufgetreten sind. Der Algorithmus berechnet den Zyklus (C_T), bei dem jede PCR-Amplifikation einen willkürlich ausgewählten Schwellen- oder Grenzwert (d.h. üblicherweise das 10-Fache der Standardabweichung von der Grundlinie) erreicht. Die relative Fluoreszenzemissionsschwelle beruht auf der Grundlinie der Reporterfarbstoff-Emission während der ersten 10–15 Amplifikationszyklen. Es wurde gezeigt, dass der berechnete C_T -Wert zur Anzahl der in der Probe vorhandenen Zielkopien proportional ist. Somit erweist sich der C_T -Wert als quantitative Messung der Kopien des Ziels, die in jeder Probe zu finden sind.

[0009] Wie in der vorhergehenden Erörterung aufgezeigt, lehrt der Stand der Technik, dass eine Methode zur Durchführung einer quantitativen Analyse einer Echtzeit-Nucleinsäureamplifikation darin besteht, eine Reihe von Ablesungen genau oberhalb und unterhalb eines auserkorenen Grenzpegels aus-

zuwählen, eine lineare Regression an diese Punkte anzupassen und für jene „Zykluszahl“ aufzulösen, bei welcher die angepasste Linie den Grenzpegel durchschneidet. Die Auswahl eines Grenzpegels ist demgemäß einigermaßen willkürlich, wie das Auswählen eines Grenzpegels, der etwa das 10-Fache eines Grundlinienwerts ist, oder des Höchstwerts von Proben, die kein Ziel enthalten, oder eines bestimmten Grenzpegels, wobei das Darüberliegende als akzeptabler „Lärm“ angesehen wurde. Ein Defizit eines solchen Grenz-Auswahlkriteriums besteht darin, dass eine lineare Anpassung an die Daten unangebracht ist, wenn der Grenzwert mit einem Zeitpunkt in der Amplifikation übereinstimmt, während welchem sich die Amplifikationsgeschwindigkeit verändert (d.h. in einer frühen Phase der Amplifikation).

[0010] Früher wurde nicht erkannt, dass geringe Unterschiede in der Auswahl von Grenzpegeln, die bei Quantifizierungsalgorithmen verwendet werden, eine erhebliche Auswirkung auf die endgültige Qualität (d.h. Genauigkeit) der Quantifizierung haben können. Es besteht weiterhin ein Bedarf an der Bereitstellung eines objektiven und automatischen Verfahrens zum Auswählen bevorzugter Grenzwerte, welches den Anwendern von Amplifikationsverfahren eine genauere und zuverlässigere Bestimmung der Anfangskonzentrationen von Zielnucleinsäuren ermöglicht, als dies bei derzeitigen Verfahren der Fall ist. Es besteht auch weiterhin ein Bedarf an der Bereitstellung von Verfahren zur Bestimmung dynamischer Grenzpegel, die von einem Versuch oder von einer Bestimmung zum anderen bzw. zur anderen leicht verändert werden können.

Kurzfassung der Erfindung

[0011] Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht daher in der Bereitstellung verbesserter Verfahren, Apparate und Computerprogrammprodukte zum Bestimmen der Mengen von Nucleinsäuresequenzen in Testproben.

[0012] Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht in der Bereitstellung von Verfahren, Apparaten und Computerprogrammprodukten zum genaueren Messen der Mengen von Nucleinsäuresequenzen in Testproben, wobei eine Mehrzahl von Kalibrier- und Vergleichsproben verwendet wird, welche entsprechende bekannte Mengen der Nucleinsäuresequenz enthalten.

[0013] Diese und andere Aufgaben, Merkmale und Vorteile werden gemäß der vorliegenden Erfindung bereitgestellt durch Verfahren, Apparate und Computerprogrammprodukte zum Bestimmen der Mengen von Nucleinsäuresequenzen, die amplifiziert werden, wobei ein bevorzugter Grenzpegel verwendet wird, welcher durch ein statistisches Kriterium bestimmt wird. Gemäß einer Ausführungsform der vorliegen-

den Erfindung werden insbesondere eine Mehrzahl von bekannten Mengen einer Nucleinsäuresequenz in entsprechenden Kalibrierproben (d.h. Standards) und eine unbekannte Menge der Nucleinsäuresequenz in einer Testprobe während eines Zeitintervalls parallel amplifiziert. Diese Proben können beispielsweise unter Anwendung eines isothermen Amplifikationsreaktionsverfahrens wie z.B. der Strangverdrängungsamplifikation (SDA) oder eines Wärmewechselreaktionsverfahrens wie z.B. der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert werden. Kennwerte der Mengen der Nucleinsäuresequenz, die in den Kalibrier- und Testproben amplifiziert wird, werden danach unter Anwendung herkömmlicher Techniken an Messpunkten im Zeitintervall gemessen. Die Kennwerte der Mengen der Nucleinsäuresequenz, die amplifiziert wird, können die Form von Fluoreszenzsignalen (z.B. Fluoreszenzintensitäten oder einer nachweisbaren Fluoreszenzenergieübertragung) annehmen, wenn die Proben fluoreszierende Indikatoren (z.B. fluoreszierende Farbstoffe, Markierungen, interkalierende Substanzen etc.) enthalten. Andere Kennwerte, die für eine Echtzeitmessung geeignet sind (z.B. radioaktive Signale), können ebenfalls verwendet werden.

[0014] Danach wird ein Schritt durchgeführt, um für einen ersten potentiellen Grenzpegel einen entsprechenden ersten Satz von Zeitpunkten im Zeitintervall zu bestimmen, in dem die gemessenen Kennwerte der Mengen der Nucleinsäuresequenz, die in jeder Kalibrierprobe amplifiziert wird, dem ersten Grenzpegel entsprechen. Dieser Schritt wird danach für jeden aus einer Anzahl von verschiedenen potentiellen Grenzpegeln wiederholt, so dass für jeden potentiellen Grenzpegel entsprechende Sätze von Zeitpunkten im Zeitintervall erhalten werden können. Gemäß einem bevorzugten Aspekt der vorliegenden Erfindung wird danach ein Schritt durchgeführt, um bezüglich eines statistischen Kriteriums zu bestimmen, welcher der Sätze von Punkten im Zeitintervall das statistische Kriterium verglichen mit den bekannten Mengen der Nucleinsäuresequenz in den Kalibrierproben besser erfüllt. Eine Menge der Nucleinsäuresequenz in der Testprobe wird dann basierend auf jenem Satz von Punkten bestimmt, von dem festgestellt wurde, dass er das statistische Kriterium besser oder am besten erfüllt.

[0015] Der Schritt des Bestimmens, welcher der Sätze von Punkten das statistische Kriterium besser erfüllt, kann den Schritt des Bestimmens, welcher der Sätze von Punkten im Zeitintervall eine bessere lineare Anpassung gegenüber Logarithmen der bekannten Ausgangsmengen der Nucleinsäuresequenz in den Kalibrierproben liefert, umfassen. Vorzugsweise umfasst dieser Schritt die Schritte des Anpassens von Regressionslinien an entsprechende „Graphs“ jedes Satzes von Zeitpunkten im Zeitintervall über Logarithmen der bekannten Ausgangsmengen der

Nucleinsäuresequenz in den Kalibrierproben. Daraufhin werden Standardabweichungen der Anpassungen zwischen jedem Satz von Zeitpunkten und entsprechenden Regressionslinien bestimmt. Der Satz von Zeitpunkten, der vorzugsweise mit der geringsten Standardabweichung der Anpassung übereinstimmt, wird dann dazu verwendet, aus den potentiellen Grenzpegeln den bevorzugten Grenzpegel auszuwählen und danach, basierend auf dem bevorzugten Grenzpegel, die Ausgangsmenge der Nucleinsäure in der Testprobe zu bestimmen. Dieses vorteilhafte Ergebnis wird vorzugsweise dadurch erzielt, indem eine Zeit bestimmt wird, in der die gemessenen Kennwerte der Mengen der Nucleinsäuresequenz in der Testprobe dem bevorzugten Grenzpegel entsprechen, und diese Zeit daraufhin an die „bevorzugte“ Regressionslinie angepasst wird, die mit dem bevorzugten Satz von Zeitpunkten übereinstimmt. Der Logarithmus der Ausgangskonzentration der Nucleinsäuresequenz in der Testprobe kann danach aus der bevorzugten Regressionslinie ermittelt werden.

[0016] Gemäß einem weiteren bevorzugten Aspekt der vorliegenden Erfindung wird eine Kurvenanpassungsoperation durchgeführt, um den bevorzugten Kennwert-Grenzpegel (z.B. den bevorzugten Fluoreszenzsignal-Grenzpegel) genauer abzuschätzen. Vorzugsweise sind entsprechende „Daten“-Kurven insbesondere an „Graphs“ von gesonderten Punkten der gemessenen Fluoreszenzsignale einzelner Kalibrier- und Testproben angepasst, und zwar verglichen mit Punkten im Zeitintervall, in dem die entsprechenden Fluoreszenzsignale gemessen wurden. Hier kann eine nicht parametrische Kurvenglättungsoperation durchgeführt werden, nachdem die gesonderten Punkte auf eine gemeinsame Grundlinie normiert wurden. Wie von den Erfindern hier festgestellt, ist es möglich, die Genauigkeit des bevorzugten Kennwert-Grenzpegels sogar noch weiter zu verbessern, indem für alle „geglätteten“ Datenkurven untere Vertrauensgrenzkurven ermittelt werden. Die unteren Vertrauensgrenzkurven können ebenso unter Anwendung einer nicht parametrischen Glättungsoperation geglättet werden. Jeder der obenstehend beschriebenen Sätze von Zeitpunkten im Zeitintervall kann dann durch Bestimmung von Schnittpunkten zwischen jeder geglätteten unteren Vertrauensgrenzkurve und den entsprechenden potentiellen Grenzpegeln bestimmt werden.

[0017] Wie obenstehend beschrieben, kann ein Satz von Zeitpunkten, der mit einer geringsten Standardabweichung der Anpassung übereinstimmt, dazu verwendet werden, einen bevorzugten Grenzpegel genau zu bestimmen und danach, basierend auf dem bevorzugten Grenzpegel, die Ausgangsmenge der Nucleinsäure in der Testprobe zu bestimmen. Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung können jedoch Vergleichsproben, die

bekannte Ausgangsmengen der Nucleinsäuresequenz enthalten, ebenfalls zur Ermöglichung einer Bestimmung eines bevorzugten Grenzpegels verwendet werden. Nach der Anpassung entsprechender Regressionslinien für jeden Satz von Zeitpunkten im Zeitintervall, der den Kalibrierproben entspricht, kann insbesondere ein mittlerer Vorhersagefehler (APE) zwischen jeder Regressionslinie und jenen eines entsprechenden Satzes von Zeitpunkten, der den Vergleichsproben entspricht, bestimmt werden. Der potentielle Grenzpegel, welcher jener Regressionslinie entspricht, die den geringsten, damit verbundenen mittleren Vorhersagefehler aufweist, kann dann zur Bestimmung der Ausgangskonzentration der Nucleinsäuresequenz in der Testprobe verwendet werden.

[0018] Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst einen Apparat zum Bestimmen einer Menge einer Nucleinsäuresequenz in einer Testprobe. Dieser bevorzugte Apparat umfasst Mittel, wie zum Beispiel ein Fluoreszenzmesswerkzeug, zum Messen von Kennwerten der Mengen einer Nucleinsäuresequenz, die in zumindest einer Testprobe, die eine unbekannte Ausgangsmenge der Nucleinsäuresequenz enthält, und auch in einer Mehrzahl von Kalibrierproben, die entsprechende bekannte Ausgangsmengen der Nucleinsäuresequenz enthalten, amplifiziert wird, und zwar an entsprechenden Messpunkten im Zeitintervall. Ebenso wird ein Computerprogrammprodukt zum Steuern der Funktion der Messmittel und zum Durchführen numerischer Operationen bezüglich der obenstehend beschriebenen Schritte bereitgestellt.

[0019] Das bevorzugte Computerprogrammprodukt umfasst insbesondere ein computerlesbares Speichermedium mit computerlesbaren Programmcode-mitteln, die in dem Medium verwirklicht sind. Die bevorzugten computerlesbaren Programmcodemittel umfassen computerlesbare Programmcodemittel zum Bestimmen – für einen ersten potentiellen Kennwert-Grenzpegel – von ersten Punkten in dem Zeitintervall, in dem die Kennwerte der Mengen der Nucleinsäuresequenz, die in den Kalibrierproben amplifiziert wird, dem ersten Grenzpegel entsprechen. Vorzugsweise werden Programmcodemittel auch bereitgestellt zum Bestimmen – für einen zweiten potentiellen Kennwert-Grenzpegel – von zweiten Punkten in dem Zeitintervall, in dem die Kennwerte der Mengen der Nucleinsäuresequenz, die in den Kalibrierproben amplifiziert wird, dem zweiten Grenzpegel entsprechen. Außerdem bestimmen die Programmcodemittel bezüglich eines statistischen Kriteriums, wie z.B. der geringsten Standardabweichung der Anpassung an eine Regressionslinie oder des geringsten mittleren Vorhersagefehlers bezüglich einer Regressionslinie, welche von der ersten oder zweiten Mehrzahl von Punkten im Zeitintervall das statistische Kriterium verglichen mit den bekannten Mengen der Nucleinsäuresequenz in den Kalibrierproben besser erfüllt.

insäuresequenz in den Kalibrierproben besser erfüllt. Daraufhin wird die Ausgangsmenge der Nucleinsäuresequenz in der Testprobe bestimmt, und zwar basierend auf jenen der ersten oder zweiten Grenzpunkte, von denen festgestellt wurde, dass sie das statistische Kriterium besser erfüllen. Bevorzugte Programmcodemittel werden auch bereitgestellt, um detailliertere Versionen der obenstehend beschriebenen Schritte als numerische Operationen durchzuführen. Die vorliegende Erfindung stellt daher ein Werkzeug bereit, welches die Mengen von Nucleinsäuresequenzen in Testproben genauer bestimmen kann, indem die Grenzpegel, bei denen Messungen der Kennwerte der Mengen der Nucleinsäuresequenzen in Kalibrierproben ausgewertet werden, genauer bestimmt werden.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0020] [Fig. 1](#) ist ein Flussdiagramm, welches Schritte darstellt, die durch Verfahren zum Bestimmen der Mengen von Nucleinsäuresequenzen in Proben gemäß der vorliegenden Erfindung durchgeführt werden.

[0021] [Fig. 2](#) ist eine grafische Darstellung von Amplifikationsdaten für Kalibrier- und Testproben, welche Mengen einer Nucleinsäuresequenz enthalten.

[0022] [Fig. 3](#) ist eine grafische Darstellung von Amplifikationsdaten und glatten Kurven, die unter Anwendung einer nicht parametrischen Glättungsoperation gemäß der vorliegenden Erfindung daraus ermittelt wurden.

[0023] [Fig. 4A](#) ist eine grafische Darstellung der Zeit zum Überschreiten eines potentiellen Grenzpegels im Vergleich zu einer Nucleinsäure-Ausgangskonzentration, und zwar für einen potentiellen Fluoreszenzgrenzpegel von 1,12.

[0024] [Fig. 4B](#) ist eine grafische Darstellung der Zeit zum Überschreiten eines potentiellen Grenzpegels im Vergleich zu einer Nucleinsäure-Ausgangskonzentration, und zwar für einen potentiellen Fluoreszenzgrenzpegel von 1,103.

[0025] [Fig. 4C](#) ist eine grafische Darstellung der Zeit zum Überschreiten eines potentiellen Grenzpegels im Vergleich zu einer Nucleinsäure-Ausgangskonzentration, und zwar für einen potentiellen Fluoreszenzgrenzpegel von 1,094.

[0026] [Fig. 5](#) ist eine grafische Darstellung, die bevorzugte Fluoreszenzgrenzpegel vergleicht, welche unter Anwendung eines anderen statistischen Kriteriums bestimmt wurden.

[0027] [Fig. 6](#) stellt eine allgemeine Hardware-Beschreibung eines Apparats zum Bestimmen der Men-

gen von Nucleinsäuresequenzen in Testproben gemäß der vorliegenden Erfindung dar.

Beschreibung von bevorzugten Ausführungsformen

[0028] Die vorliegende Erfindung wird nachstehend unter Bezugnahme auf die angeschlossenen Zeichnungen, in denen bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung gezeigt werden, detaillierter beschrieben. Diese Erfindung kann jedoch in verschiedenen Formen verwirklicht sein und sollte nicht als auf die hier dargelegten Ausführungsformen beschränkt gedeutet werden. Vielmehr werden diese Ausführungsformen bereitgestellt, damit diese Offenbarung gründlich und vollständig ist, und vermitteln dem Fachmann den vollen Umfang der Erfindung. Gleiche Ziffern beziehen sich durchwegs auf gleiche Elemente.

[0029] Unter Bezugnahme auf die [Fig. 1–Fig. 5](#) werden nun bevorzugte Verfahren 10 zum Bestimmen der Mengen von Nucleinsäuresequenzen in Proben detaillierter beschrieben. Diese Verfahren umfassen die Schritte **12**, **14** des Amplifizierens einer Mehrzahl von bekannten Ausgangsmengen einer Nucleinsäuresequenz (z.B. RNA, DNA) in entsprechenden Kalibrierproben (d.h. Standards) und auch des Amplifizierens einer unbekanntem Ausgangsmenge der Nucleinsäuresequenz in zumindest einer Testprobe während entsprechender Zeitintervalle. Vorzugsweise sind die Nucleinsäuresequenzen in den Kalibrier- und Testproben dieselben, die Proben können jedoch möglicherweise unterschiedliche Nucleinsäuresequenzen enthalten oder verschiedene Mengen unterschiedlicher Nucleinsäuresequenzen können in einer Durchschnittsprobe parallel amplifiziert werden. Diese Amplifikationsschritte können unter Anwendung herkömmlicher Techniken durchgeführt werden und können während entsprechender, nicht überlappender Zeitintervalle für jede Probe getrennt durchgeführt werden. Diese getrennten Zeitintervalle können dann für Analysezwecke auf eine gemeinsame Ausgangszeit und ein gemeinsames Zeitintervall normiert werden. Noch bevorzugter werden die Schritte **12**, **14** des Amplifizierens jeder Nucleinsäuresequenz in den Kalibrier- und Testproben jedoch an getrennten Proben während eines einzigen Zeitintervalls parallel durchgeführt.

[0030] Wie der Fachmann versteht, können die Proben gemäß irgendeinem bekannten Nucleinsäureamplifikationsverfahren, einschließlich Wärmewechsel-Amplifikationsverfahren sowie isothermer Amplifikationsverfahren, amplifiziert werden. Die vorliegende Erfindung ist vorteilhaft in Hinblick auf eine Verbesserung der Quantifizierung von Nucleinsäuren, die entweder durch Wärmewechselverfahren oder durch isotherme Verfahren amplifiziert wurden, obwohl die vorliegende Erfindung für isotherme Amplifikationsverfahren besondere Vorteile bieten kann.

Geeignete Wärmewechselverfahren, die bei der Anwendung der vorliegenden Erfindung nützlich sind, umfassen die Polymerase-Kettenreaktion (PCR; US-A-4 683 202, US-A-4 683 195 und US-A-4 965 188); die Reverse-Transcriptase-PCR (RT-PCR); die DNA-Ligase-Kettenreaktion (LCR; internationale Patentanmeldung Nr. WO-A-89/09835); und die Amplifikation auf Basis einer Transcription (D. Y. Kwoh et al. 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 1173–1177), ohne darauf beschränkt zu sein. Geeignete isotherme Amplifikationsverfahren, die bei der Anwendung der vorliegenden Erfindung nützlich sind, umfassen die Strangverdrängungsamplifikation (SDA; Walker et al. 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 392–396); die Q- β -Replikase (Lizardi et al. 1988, Bio/Technology 6, 1197–1202); die auf Nucleinsäure basierende Sequenzamplifikation (NASBA; R. Sooknana und L. Malek 1995, Bio/Technology 13, 563–65) und die sich selbst erhaltende Sequenzreplikation (3SR; Guatelli et al. 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 1874–1878), ohne darauf beschränkt zu sein. Beispielhafte SDA-Verfahren sind in der U.S.-A-5 445 166 von Walker und in der U.S.-A-5 270 184 von Walker et al. beschrieben.

[0031] Danach werden Kennwerte der Mengen der Nucleinsäuresequenz, die in den Kalibrier- und Testproben amplifiziert wird, an entsprechenden Messpunkten im Zeitintervall gemessen, Schritt 16, wobei ein Messwerkzeug zur Anwendung kommt, wie zum Beispiel der Model 7700 Sequence Detector, hergestellt und vertrieben von Applied Biosystems, einer Abteilung von Perkin Elmer, Foster City, Kalifornien, oder der Fluoroskan II, hergestellt von LabSystems, Inc., Rochester, New York. Die Kennwerte der Mengen der Nucleinsäuresequenz, die in den Kalibrier- und Testproben amplifiziert wird, können die Form von Fluoreszenzsignalen (z.B. Fluoreszenzintensitäten oder einer Fluoreszenzenergieübertragung) annehmen, wenn die Proben Fluoreszenzindikatoren (z.B. fluoreszierende Markierungen) enthalten. Demgemäß kann das Messwerkzeug einen oder mehrere Photodetektoren zum Messen der Fluoreszenzsignale aus den Proben, die eine parallele Amplifikation durchmachen, enthalten. Das Messwerkzeug kann auch einen computergesteuerten Schrittschaltmotor enthalten, damit jede Kalibrier- und Testprobe als Probenreihe angeordnet und während des Schritts des Messens der Fluoreszenzintensität automatisch und wiederholt gegenüber einem Photodetektor positioniert werden kann. Ein bevorzugtes Messwerkzeug wird nachstehend unter Bezugnahme auf [Fig. 6](#) detaillierter beschrieben.

[0032] Wie obenstehend dargelegt, können die Kennwerte einer Zielnucleinsäurekonzentration die Form fluoreszierender Signale annehmen, obwohl der Fachmann erkennen wird, dass andere Kennwerte einer Nucleinsäurekonzentration bekannt sind und bei der Anwendung der vorliegenden Erfindung ver-

wendet werden können. Zur Veranschaulichung können Kennwerte einer Nucleinsäurekonzentration durch Markierungen bereitgestellt werden, welche Signale produzieren, die durch Fluoreszenz, Radioaktivität, Kolorimetrie, Röntgenstrahlbeugung oder -absorption, Magnetismus oder enzymatische Aktivität nachweisbar sind. Geeignete Markierungen umfassen beispielsweise Fluorophore, Chromophore, radioaktive Isotope (z.B. ^{32}P oder ^{125}I), elektronendichte Reagenzien, Enzyme und Liganden mit spezifischen Bindungspartnern (z.B. Biotin-Avidin). Das Markieren von Nucleinsäuren kann durch eine Reihe von Mitteln erzielt werden, einschließlich durch chemische Modifikation eines Nucleinsäureprimers oder einer Sonde. Geeignete fluoreszierende Markierungen können nicht kovalent bindende Markierungen (z.B. interkalierende Farbstoffe) wie z.B. Ethidiumbromid, Propidiumbromid, Chromomycin, Acridinorange und dergleichen umfassen. Bei der Anwendung der vorliegenden Erfindung wird jedoch die Verwendung kovalent bindender fluoreszierender Mittel bevorzugt. Solche kovalent bindende fluoreszierende Markierungen umfassen Fluorescein und Derivate davon wie z.B. FAM, HEX, TET und JOE (welche alle von der Applied Biosystems Division von Perkin Elmer, Foster City, Kalifornien, zu erhalten sind); Rhodamin und Derivate wie z.B. Texas Red (Molecular Probes, Eugene, Oregon); ROX und TAMRA (Applied Biosystems, Foster City, CA); Lucifer Yellow; Cumarinderivate und dergleichen. Andere bevorzugte Kennwerte einer Nucleinsäurekonzentration bestehen in der Fluoreszenzenergieübertragung (FET), bei der eine fluoreszierende Reporter (oder „Donor“)-Markierung und eine Quencher (oder „Acceptor“)-Markierung hintereinander verwendet werden, um ein nachweisbares Signal zu produzieren, das zu der in der Reaktionsmischung vorhandenen Menge an amplifiziertem Nucleinsäureprodukt (z.B. in Form einer doppelsträngigen Nucleinsäure) proportional ist. Wiederum eine andere, bei der Anwendung der vorliegenden Erfindung nützliche Nachweismethode ist die von Walker et al. in der U.S.-A-5 593 867 beschriebene Fluoreszenzpolarisierungs(FP)-Detektion einer Nucleinsäureamplifikation.

[0033] Nach dem Messen von Kennwerten der Mengen von Nucleinsäuresequenzen in Schritt **16** wird danach ein Schritt **18** durchgeführt, um für einen ersten potentiellen Grenzpegel (z.B. einen ersten normierten Fluoreszenzpegel) einen entsprechenden ersten Satz von Zeitpunkten zu bestimmen, und zwar in dem Zeitintervall, in dem die Kennwerte (z.B. ein Fluoreszenzsignal) der Mengen der Nucleinsäuresequenz, die in jeder Kalibrier- und Testprobe amplifiziert wird, dem ersten Grenzpegel entsprechen. Dieser Schritt wird daraufhin für jeden aus einer Mehrzahl verschiedener potentieller Grenzpegel wiederholt, so dass für jeden potentiellen Grenzpegel entsprechende Sätze von Zeitpunkten im Zeitintervall erhalten werden können. Wie nachstehend detaillier-

ter beschrieben, können die „Kennwerte“ (z.B. Fluoreszenzsignale) ungefilterte Kennwerte (d.h. Ursprungsdaten) sein, oder die Kennwerte können beispielsweise durch Erzeugung einer unteren Vertrauensgrenzkurve aus den ungefilterten Kennwerten gefiltert werden.

[0034] Gemäß einem bevorzugten Aspekt der vorliegenden Erfindung wird danach ein Schritt **20** durchgeführt, um bezüglich eines statistischen Kriteriums zu bestimmen, welcher der Sätze von Punkten im Zeitintervall das statistische Kriterium verglichen mit den bekannten Mengen der Nucleinsäuresequenz in den Kalibrierproben besser erfüllt. Eine Menge der Nucleinsäuresequenz in der Testprobe wird dann basierend auf jenem Satz von Punkten bestimmt, von dem festgestellt wurde, dass er das statistische Kriterium besser oder am besten erfüllt. Wie nachstehend unter Bezugnahme auf die [Fig. 2–Fig. 5](#) detaillierter erläutert, kann der Schritt des Bestimmens, welcher der Sätze von Zeitpunkten das statistische Kriterium besser erfüllt, beispielsweise den Schritt des Bestimmens, welcher der Sätze von Zeitpunkten im Zeitintervall eine bessere lineare Anpassung gegenüber Logarithmen der bekannten Ausgangsmengen der Nucleinsäuresequenz in den Kalibrierproben liefert, umfassen. Dieser Schritt umfasst vorzugsweise die Schritte des Anpassens von Regressionslinien an entsprechende „Graphs“ jedes Satzes von Zeitpunkten im Zeitintervall über Logarithmen der bekannten Ausgangsmengen der Nucleinsäuresequenz in den Kalibrierproben. Daraufhin werden Standardabweichungen der Anpassungen zwischen jedem Satz von Zeitpunkten und entsprechenden Regressionslinien bestimmt. Der Satz von Zeitpunkten, der vorzugsweise mit der geringsten Standardabweichung der Anpassung übereinstimmt, wird dann dazu verwendet, den bevorzugten Grenzpegel auszuwählen und danach, basierend auf dem bevorzugten Grenzpegel, die Ausgangsmenge der Nucleinsäuresequenz in der Testprobe zu bestimmen.

[0035] Die Bestimmung jenes Satzes von Punkten, der das statistische Kriterium besser erfüllt, wird vorzugsweise dadurch erzielt, indem eine Zeit bestimmt wird, in der das gefilterte (oder ungefilterte) Fluoreszenzsignal der Testprobe dem bevorzugten Grenzpegel entspricht, und diese Zeit daraufhin an die „bevorzugte“ Regressionslinie angepasst wird, die mit dem bevorzugten Satz von Zeitpunkten übereinstimmt. Danach wird ein Schritt **22** durchgeführt, um aus der bevorzugten Regressionslinie die Ausgangskonzentration der Nucleinsäuresequenz in den Testproben zu ermitteln. Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung können Vergleichsproben, die bekannte Ausgangsmengen der Nucleinsäuresequenz enthalten, ebenfalls zur Ermöglichung einer Bestimmung eines bevorzugten Grenzpegels verwendet werden. Nach der Anpassung entsprechen-

der Regressionslinien für jeden Satz von Zeitpunkten im Zeitintervall, der den Kalibrierproben entspricht, kann insbesondere ein mittlerer Vorhersagefehler (APE) zwischen jeder Regressionslinie und jenen eines entsprechenden Satzes von Zeitpunkten, der den Vergleichsproben entspricht, bestimmt werden. Der potentielle Grenzpegel, welcher jener Regressionslinie entspricht, die den geringsten, damit verbundenen mittleren Vorhersagefehler aufweist, kann dann zur Bestimmung der Ausgangskonzentration der Nucleinsäuresequenz in der Testprobe verwendet werden. Ein anderes statistisches Kriterium kann ebenfalls verwendet werden. Beispielsweise kann ein Kreuzvalidierungsvorhersagefehler auf ein Mindestmaß reduziert werden, um die Bestimmung einer Ausgangskonzentration zu ermöglichen. Alternativ kann bei Verwendung mehrerer verschiedener Kriterien der „Durchschnitt“ der bevorzugten Grenzpegel, welcher durch jedes unterschiedliche Kriterium erzielt wird, verwendet werden.

[0036] Wie nachstehend detaillierter beschrieben, kann der Schritt **18** des Bestimmens von Sätzen von Punkten im Zeitintervall für jeden potentiellen Grenzpegel die anfänglichen Schritte des Anpassens von Kurven an entsprechende Graphs der gemessenen Kennwerte der Mengen der Nucleinsäuresequenz, die in entsprechenden Kalibrier- oder Testproben amplifiziert wird, umfassen, und zwar verglichen mit entsprechenden Messzeitpunkten, wobei eine nicht parametrische Glättungsoperation zur Anwendung kommt. Hier kann die Amplifikation jeder Probe durch einen Satz von gesonderten Datenpunkten dargestellt werden, welcher einen Satz von x-Werten, die aus Messzeitpunkten bestehen, und einen übereinstimmenden Satz von y-Werten, die aus gemessenen Fluoreszenzsignalen bestehen, enthält. Diese x- und y-Werte werden für jede Probe unter Anwendung herkömmlicher Techniken auf eine gemeinsame Grundlinie normiert, und danach wird an jedem Satz von x- und y-Werten eine nicht parametrische Glättungsoperation durchgeführt.

[0037] Für jeden Satz von x- und y-Werten, die zu einer entsprechenden Kalibrier- oder Testprobe passen und eine entsprechende Amplifikationskurve bilden, wird insbesondere eine Wavelet-Anpassung erhalten, und über eine Waveshrink-Operation, die im S + WAVELETS™-Modul des S-PLUS™-Software-Pakets im Handel erhältlich ist, wird eine glatte Amplifikationskurve erhalten. Dieses Software-Paket ist bei MathSoft, Inc., Seattle, Washington, im Handel erhältlich. Wie der Fachmann versteht, wird durch die bevorzugte Glättungsoperation typischerweise eine Abschätzung des Lärms im Satz von x- und y-Werten und/oder einer Standardabweichung (σ) um die geglättete Kurve erzeugt.

[0038] Als nächstes wird gemäß einem weiteren bevorzugten Aspekt der vorliegenden Erfindung für jede

Amplifikationskurve eine entsprechende untere Vertrauensgrenzkurve (LCL) bestimmt, so dass eine Schätzung der Amplifikationszeit, die zur Erreichung eines potentiellen Grenzpegels erforderlich ist, mit einer verringerten Anfälligkeit für Lärm in den gemessenen Kennwerten (y-Werten) oder für lokale Unregelmäßigkeiten bei den Amplifikationsgeschwindigkeiten festgelegt werden kann. Jede untere Vertrauensgrenzkurve kann beispielsweise dadurch bestimmt werden, indem für jede geglättete Amplifikationskurve 2σ (oder ein anderer bevorzugter Wert) im Fluoreszenzsignal von den y-Werten abgezogen wird. Jede untere Vertrauensgrenzkurve wird vorzugsweise auch unter Anwendung einer nicht parametrischen Glättungsoperation wie z.B. einer Thin-Plate-Splines-Operation, die aus dem FUN-FITS-Modul im STATLIB-Programmarchiv zu erhalten ist, „geglättet“. Dieses Archiv ist im World Wide Web unter <http://lib.stat.cmu.edu> verfügbar. Diese unteren Vertrauensgrenzkurven stellen ein Verhältnis zwischen gemessenen Kennwerten, die gefiltert wurden, und der Zeit dar.

[0039] Zu Veranschaulichungszwecken wird nunmehr eine Anwendung der obenstehend beschriebenen Operationen beschrieben. Unter Bezugnahme auf [Fig. 2](#) werden insbesondere x-y-Graphs von ungefilterten normierten Kennwerten der Mengen einer Nucleinsäuresequenz (d.h. eines Fluoreszenzsignals), die in einer Mehrzahl von Kalibrier- und Testproben amplifiziert wird, im Vergleich zur Zeit (d.h. zu Amplifikationskurven) dargestellt. Wie obenstehend beschrieben, wurden auch Wavelet-Glättungsoperationen durchgeführt, um für jede Amplifikationskurve eine glatte Kurve zu erzeugen. Diese glatten Kurven sind durch die durchgezogenen Linien veranschaulicht. Bei dieser Anwendung wurden Kalibrierproben (d.h. Standards) für eine Amplifikation vorbereitet, indem unter Anwendung von dem Fachmann bekannten Techniken 0, 0, 40, 400, 4000, 15.000 und 40.000 Zielkopien einer Nucleinsäuresequenz in Reaktionspuffer gemischt wurden. Diese Kalibrierproben sind durch die Zeichenerklärung in [Fig. 2](#) als CS1 = 0, CS2 = 0, CS3 = 40, CS4 = 400, CS5 = 4.000, CS6 = 15.000 und CS7 = 40.000 dargestellt. Zur Bestätigung der Genauigkeit der vorliegenden Erfindung wurden auch sechs „unbekannte“ Testproben vorbereitet. Drei der Testproben wurden mit 1.144 Zielkopien der Nucleinsäuresequenz versetzt und die anderen drei Testproben wurden mit 10.560 Zielkopien versetzt. Diese Testproben sind durch die Zeichenerklärung als T1 = 1.144, T2 = 1.144, T3 = 1.144, T4 = 10.560, T5 = 10.560 und T6 = 10.560 dargestellt. Diese sechs Testproben wurden ebenfalls als Vergleichsproben behandelt, um ein statistisches Kriterium basierend auf einem mittleren Vorhersagefehler (APE) darzustellen, wie nachfolgend detaillierter erläutert wird.

[0040] Danach werden an den Amplifikationskurven

(CS1-7 und T1-6) der [Fig. 2](#) numerische Operationen durchgeführt, um entsprechende untere Vertrauensgrenzkurven zu erzeugen, welche Verhältnisse zwischen „gefilterten“ Fluoreszenzsignalen und der Amplifikationszeit darstellen. Insbesondere können Waveshrink-Operationen durchgeführt werden, um geglättete Amplifikationskurven zu erzeugen und eine entsprechende Standardabweichung um jede Kurve zu bestimmen. Danach können untere Vertrauensgrenzkurven durch „Filtern“ der Amplifikationskurven festgelegt werden, indem an jedem Messzeitpunkt „ 2σ “ vom Fluoreszenzsignal abgezogen wird. Diese Operation wird vorzugsweise durchgeführt, damit anschließend festgelegte Schätzungen der Amplifikationszeiten, die zur Erreichung eines potentiellen Fluoreszenzgrenzpegels erforderlich sind, mit einer verringerten Anfälligkeit für Lärm oder lokale Unregelmäßigkeiten festgelegt werden können. Dann können die „geglätteten“ unteren Vertrauensgrenzkurven (SLCL) festgelegt werden, indem unter Verwendung; des zuvor erwähnten Software-Pakets an jeder unteren Vertrauensgrenzkurve eine Thin-Plate-Spline-Anpassung durchgeführt wird. Andere Glättungstechniken können ebenfalls angewandt werden. Solche Techniken können zum Beispiel Kernel-Smoother, kubische Splines, b-Splines und eine lokal gewichtete Regression umfassen. Dann kann ein passender Expansionsbereich für potentielle Fluoreszenzgrenzpegel (FCL_L-FCL_H) ausgewählt werden. Wie hier vom Erfinder festgelegt, ist eine genaue Auswahl eines bevorzugten Grenzpegels für die genaue Bestimmung der Ausgangsmenge einer Nucleinsäuresequenz in einer Testprobe entscheidend.

[0041] Zur Veranschaulichung können die obenstehend beschriebenen Operationen durchgeführt werden, um aus den Amplifikationsdaten, die der vierten Kalibrierprobe CS4 entsprechen, eine geglättete untere Vertrauensgrenzkurve (SLCL_{CS4}) zu ermitteln. Diese untere Vertrauensgrenzkurve ist in [Fig. 3](#) am besten dargestellt. Danach werden dieselben Operationen durchgeführt, um aus jeder der anderen Amplifikationskurven, die den anderen Proben entsprechen, geglättete untere Vertrauensgrenzkurven zu erzeugen. Dann werden unter Anwendung von dem Fachmann bekannten Techniken Schnittpunkte zwischen jeder geglätteten unteren Vertrauensgrenzkurve und jedem aus einer Mehrzahl von beabstandeten potentiellen Fluoreszenzgrenzpegeln im Bereich (FCL_L-FCL_H) numerisch ermittelt. Aus den Schnittpunkten zwischen einem jeweiligen Fluoreszenzgrenzpegel und jeder der geglätteten unteren Vertrauensgrenzkurven, die den jeweiligen Grenzpegel durchschneiden, werden dann Sätze von Zeitpunkten entlang der x-Achse im Bereich T_L-T_H ermittelt.

[0042] Unter Bezugnahme auf [Fig. 4A](#) und unter Verwendung eines potentiellen Fluoreszenzgrenzpegels von 1,12 als Beispiel kann ein Graph der Zeitpunkte (ermittelt aus den Schnittpunkten zwischen

jeder SLCL-Kurve und einer horizontalen Linie bei $y = 1,12$) über Logarithmen der bekannten Ausgangskonzentrationen der Kalibrierproben (x-Achse) bestimmt werden. Eine Regressionslinie (RL_{1,12}) kann dann, wie dargestellt, an den Graph der Zeitpunkte über Logarithmen der bekannten Ausgangskonzentrationen angepasst werden. Unter Anwendung herkömmlicher Techniken, die dem Fachmann wohlbekannt sind, wird ebenso festgestellt, dass eine Standardabweichung der Anpassung zwischen der Regressionslinie und Punkten im Graph 0,428 beträgt. Unter Verwendung eines potentiellen Fluoreszenzgrenzpegels von 1,103 wird ein Graph der Zeitpunkte (ermittelt aus den Schnittpunkten zwischen jeder SLCL-Kurve und einer horizontalen Linie bei $y = 1,103$) über Logarithmen der bekannten Ausgangskonzentrationen der Kalibrierproben (x-Achse) bestimmt, wie in [Fig. 4B](#) am besten dargestellt. Eine Regressionslinie (RL_{1,103}) wird dann an den Graph der Zeitpunkte über Logarithmen der bekannten Ausgangskonzentrationen angepasst. Dann wird festgestellt, dass eine Standardabweichung der Anpassung zwischen der Regressionslinie und den Punkten im Graph 0,180 beträgt. Schließlich kann unter Verwendung eines potentiellen Fluoreszenzgrenzpegels von 1,094 ein Graph der Zeitpunkte (ermittelt aus den Schnittpunkten zwischen jeder SLCL-Kurve und einer horizontalen Linie bei $y = 1,094$) über Logarithmen der bekannten Ausgangskonzentrationen der Kalibrierproben (x-Achse) bestimmt werden, wie in [Fig. 4C](#) am besten dargestellt. Eine Regressionslinie (RL_{1,094}) wird dann, wie dargestellt, an den Graph der Zeitpunkte über Logarithmen der bekannten Ausgangskonzentrationen angepasst. Dann wird festgestellt, dass eine Standardabweichung der Anpassung zwischen der Regressionslinie und den Punkten im Graph 0,226 beträgt.

[0043] Wie obenstehend beschrieben, wird dann jener Grenzpegel, der die geringste Standardabweichung der Anpassung ergibt, zum Abbilden der Schnittpunkte zwischen dem ausgewählten Grenzpegel und den geglätteten unteren Vertrauensgrenzkurven, die den Testproben entsprechen, gemäß den Logarithmen der Ausgangskonzentrationen der Testproben verwendet. Basierend auf einer Analyse von nur drei potentiellen Fluoreszenzgrenzpegeln im Bereich FCL_L-FCL_H sollte die Regressionslinie RL_{1,103}, die einem normierten Fluoreszenzgrenzpegel von 1,103 entspricht, beispielsweise zum Bestimmen der Ausgangskonzentration der Testproben T1-T6 verwendet werden.

[0044] Gemäß einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung kann eine Mehrzahl von „Vergleichs“-Proben mit bekannten Konzentrationen der Nucleinsäuresequenz parallel zu den Kalibrier- und Testproben amplifiziert werden. Die Zeiten, die mit den Schnittpunkten (d.h. Schnittpunktzeiten) zwischen einem potentiellen Fluoreszenzgrenzpegel

(z.B. 1,12, 1,103 und 1,094) und den geglätteten unteren Vertrauensgrenzkurven, die den Vergleichsproben entsprechen, übereinstimmen, können dann mit entsprechenden Regressionslinien verglichen werden. Ein mittlerer Vorhersagefehler kann dann als das arithmetische Mittel jedes Zeitfehlers zwischen einer jeweiligen Schnittpunktzeit und der übereinstimmenden „Schnittpunktzeit“, die durch die Regressionslinie an der bekannten Ausgangskonzentration der Vergleichsprobe vorhergesagt wurde, ermittelt werden.

[0045] Basierend auf der Regressionslinie der [Fig. 4A](#) wird ein mittlerer Vorhersagefehler (APE) von 26,8% ermittelt, wenn die „Test“-Proben T1–T6 (mit bekannten Ausgangskonzentrationen) ausschließlich zu Veranschaulichungszwecken als Vergleichsproben C1–C6 behandelt werden. Wie durch die Zeichenerklärung der [Fig. 4A](#) gezeigt, wird vorhergesagt, dass die bekannten Ausgangskonzentrationen der Testproben (d.h. 1.144 und 10.560 Zielkopien) bei den „Vergleichs“-Proben C1–C3 zwischen 904 und 2.406 Zielkopien und bei den Vergleichsproben C4–C6 zwischen 10.323 und 14.858 Zielkopien aufweisen. Basierend auf der Regressionslinie der [Fig. 4B](#) wird bei den „Vergleichs“-Proben C1–C6 ein mittlerer Vorhersagefehler (APE) von 9% festgestellt. Wie durch die Zeichenerklärung der [Fig. 4B](#) gezeigt, wird schließlich vorhergesagt, dass die bekannten Ausgangskonzentrationen der Testproben bei den Vergleichsproben C1–C3 zwischen 1.042 und 1.875 Zielkopien und bei den Vergleichsproben C4–C6 zwischen 8.865 und 13.179 Zielkopien aufweisen. Basierend auf der Regressionslinie der [Fig. 4C](#) wird bei den „Vergleichs“-Proben C1–C6 ein mittlerer Vorhersagefehler (APE) von 0,9% festgestellt. Wie durch die Zeichenerklärung der [Fig. 4C](#) gezeigt, wird vorhergesagt, dass die bekannten Ausgangskonzentrationen der Testproben bei den Vergleichsproben C1–C3 zwischen 1.049 und 1.675 Zielkopien und bei den Vergleichsproben C4–C6 zwischen 8.236 und 12.264 Zielkopien aufweisen. Gemäß dieser Ausführungsform wird jener Grenzpegel, der den geringsten mittleren Vorhersagefehler ergibt, dann vorzugsweise zum Abbilden der Schnittpunkte zwischen dem ausgewählten Grenzpegel und den geglätteten unteren Vertrauensgrenzkurven, die den Testproben entsprechen, gemäß den Logarithmen der Ausgangskonzentrationen der Testproben verwendet. Basierend auf der APE-Analyse von nur drei potentiellen Fluoreszenzgrenzpegeln im Bereich FCL_L – FCL_H sollte die Regressionslinie $RL_{1,094}$, die einem normierten Fluoreszenzgrenzpegel von 1,094 entspricht, beispielsweise zum Bestimmen der Ausgangskonzentration der Testproben T1–T6 verwendet werden.

[0046] Unter Bezugnahme auf [Fig. 5](#) ist ein Vergleich zwischen den beiden obenstehend beschriebenen statistischen Kriterien dargestellt. Ein Diagramm der Standardabweichung der Anpassung an

eine Regressionslinie im Vergleich zu einem potentiellen Grenzpegel ergibt insbesondere einen bevorzugten Grenzpegel von 1,103. Ein Diagramm des mittleren Vorhersagefehlers (APE) im Vergleich zu einem potentiellen Grenzpegel ergibt einen bevorzugten Grenzpegel von 1,094, was relativ nahe bei 1,103 liegt. Wie der Fachmann versteht, veranschaulicht [Fig. 5](#) die Abhängigkeit zweier Maßstäbe der „Güte“ der Kalibrierung, nämlich der Präzision (Standardabweichung um die Regressionslinie) und der durchschnittlichen Verzerrung (mittlerer Vorhersagefehler), von der Auswahl der Grenzpegel. Somit kann eine vernünftige Auswahl statistischer Kriterien Grenzpegel ergeben, die ungefähr gleich sind. Wie durch die große Anzahl von x-y-Datenpunkten in [Fig. 5](#) dargestellt, können ferner genauere Schätzungen der Ausgangsmengen der Nucleinsäuresequenz in den Testproben festgelegt werden, indem eine größere Anzahl eng beabstandeter potentieller Grenzpegel verwendet wird.

[0047] Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst einen Apparat **30** zum Bestimmen der Mengen von Nucleinsäuresequenzen in Testproben. Dieser bevorzugte Apparat umfasst Mittel **32**, wie z.B. das zuvor erwähnte Fluoreszenzmesswerkzeug, zum Messen von Kennwerten der Mengen einer Nucleinsäuresequenz, die in zumindest einer Testprobe (die eine unbekannte Ausgangsmenge der Nucleinsäuresequenz enthält) und in einer Mehrzahl von Kalibrierproben (die entsprechende bekannte Ausgangsmengen der Nucleinsäuresequenz enthalten) an entsprechenden Messpunkten im Zeitintervall amplifiziert wird. Der Apparat **30** funktioniert auch computergesteuert. Insbesondere ist das Messwerkzeug **32** vorzugsweise betriebsfähig an ein Allzweck- oder anwendungsspezifisches Computersteuergerät **34** gekoppelt. Das Steuergerät **34** umfasst vorzugsweise ein Computerprogrammprodukt zum Steuern der Funktion des Messwerkzeugs **32** und zum Durchführen numerischer Operationen bezüglich der obenstehend beschriebenen Schritte. Das Steuergerät **34** kann über eine Datei **36**, Disketteneingabe **38** oder Datenbusleitung **40** Setupdaten und andere verwandte Daten empfangen. Ebenso sind vorzugsweise ein Bildschirm **42** und ein Drucker **44** vorgesehen, um die vom Steuergerät **34** durchgeführten Operationen visuell darzustellen. Der Fachmann versteht, dass die vom Steuergerät **34** durchgeführten Funktionen gänzlich oder teilweise als Softwaremodule realisiert werden können, die auf einem Universalrechnersystem ablaufen. Alternativ kann ein dediziertes Einplatzsystem mit anwendungsspezifischen integrierten Schaltungen zum Durchführen der obenstehend beschriebenen Funktionen und Operationen bereitgestellt werden.

[0048] Ein bevorzugtes Computerprogrammsystem umfasst insbesondere ein computerlesbares Spei-

chermedium mit computerlesbaren Programmcode-mitteln, die in dem Medium verwirklicht sind. Die bevorzugten computerlesbaren Programmcodemittel umfassen computerlesbare Programmcodemittel zum Bestimmen – für einen ersten potentiellen Fluoreszenzgrenzpegel – von ersten Punkten in dem Zeitintervall, in dem die Kennwerte der Mengen der Nucleinsäuresequenz, die in den Kalibrierproben amplifiziert wird, dem ersten Grenzpegel entsprechen. Vorzugsweise werden Programmcodemittel auch bereitgestellt zum Bestimmen – für einen zweiten potentiellen Fluoreszenzgrenzpegel – von zweiten Punkten in dem Zeitintervall, in dem die Kennwerte der Mengen der Nucleinsäuresequenz, die in den Kalibrierproben amplifiziert wird, dem zweiten Grenzpegel entsprechen. Außerdem bestimmen die Programmcodemittel bezüglich eines statistischen Kriteriums, wie z.B. der geringsten Standardabweichung der Anpassung an eine Regressionslinie oder des geringsten mittleren Vorhersagefehlers bezüglich einer Regressionslinie, welche von der ersten oder zweiten Mehrzahl von Punkten im Zeitintervall das statistische Kriterium verglichen mit den bekannten Mengen der Nucleinsäuresequenz in den Kalibrierproben besser erfüllt. Daraufhin wird die Ausgangsmenge der Nucleinsäuresequenz in der Testprobe bestimmt, und zwar basierend auf jenen der ersten oder zweiten Grenzpunkte, von denen festgestellt wurde, dass sie das statistische Kriterium besser erfüllen. Bevorzugte Programmcodemittel werden auch bereitgestellt, um detailliertere Versionen der obenstehend beschriebenen Schritte als numerische Operationen durchzuführen. Die vorliegende Erfindung stellt daher ein Werkzeug bereit, welches die Mengen von Nucleinsäuresequenzen in Testproben genauer bestimmen kann, indem die Grenzpegel, bei denen Messungen der Kennwerte der Mengen der Nucleinsäuresequenzen in Kalibrierproben ausgewertet werden, genauer bestimmt werden.

[0049] In den Zeichnungen und in der Beschreibung wurden typische bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung geoffenbart, und trotz der Verwendung spezifischer Begriffe werden diese nur in einem allgemeinen und beschreibenden Sinn und nicht zu Einschränkungszwecken verwendet, wobei der Umfang der Erfindung in den nachfolgenden Ansprüchen dargelegt ist. Überdies soll die Terminologie in den Ansprüchen bezüglich Graphs, die Linien und Kurven an Graphs anpassen und Kurven festlegen, die Verarbeitung von Daten (z.B. x-y-Daten) und Variablen umfassen, welche im Inneren einer Speicher enthaltenden Verarbeitungseinheit (z.B. eines Computers) zu finden sind, und ist, wie der Fachmann versteht, nicht auf die physischen Tätigkeiten des Ausdrucks oder Auftragens von Linien, Kurven und Graphs beschränkt.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Bestimmen einer Menge einer Nucleinsäuresequenz in einer Probe, umfassend die folgenden Schritte:

das Amplifizieren einer Mehrzahl von bekannten Mengen einer Nucleinsäuresequenz in entsprechenden Kalibrierproben und einer unbekannt Menge einer Nucleinsäuresequenz in einer Testprobe während eines Zeitintervalls;

das Messen von Kennwerten der Mengen einer Nucleinsäuresequenz, die in den Kalibrier- und Testproben amplifiziert wird, an Messpunkten im Zeitintervall;

das Bestimmen – für einen ersten Grenzpegel – von ersten Punkten in dem Zeitintervall, in dem die Kennwerte der Mengen einer Nucleinsäuresequenz, die in den Kalibrierproben amplifiziert wird, dem ersten Grenzpegel entsprechen, und zwar unter Verwendung der gemessenen Kennwerte der Mengen einer Nucleinsäuresequenz, die in den Kalibrierproben amplifiziert wird;

das Bestimmen – für einen zweiten Grenzpegel – von zweiten Punkten in dem Zeitintervall, in dem die Kennwerte der Mengen einer Nucleinsäuresequenz, die in den Kalibrierproben amplifiziert wird, dem zweiten Grenzpegel entsprechen, und zwar unter Verwendung der gemessenen Kennwerte der Mengen einer Nucleinsäuresequenz, die in den Kalibrierproben amplifiziert wird;

das Bestimmen bezüglich eines statistischen Kriteriums, welcher der ersten oder zweiten Punkte im Zeitintervall verglichen mit den bekannten Mengen einer Nucleinsäuresequenz in den Kalibrierproben einen kleineren Regressionsfehlerwert basierend auf dem statistischen Kriterium liefert; und

das Bestimmen einer Menge einer Nucleinsäuresequenz in der Testprobe basierend auf jenen der ersten oder zweiten. Grenzpegel, von denen festgestellt wurde, dass sie den kleineren Regressionsfehlerwert basierend auf dem statistischen Kriterium liefern; wobei dieser Schritt des Bestimmens, welcher der ersten oder zweiten Punkte im Zeitintervall einen kleineren Regressionsfehlerwert basierend auf dem statistischen Kriterium liefert, den Schritt des Bestimmens, welcher der ersten oder zweiten Punkte im Zeitintervall einen kleineren linearen Regressionsfehler gegenüber Logarithmen der bekannten Mengen einer Nucleinsäuresequenz in den Kalibrierproben liefert, umfasst.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der Schritt des Bestimmens von ersten Punkten im Zeitintervall die folgenden Schritte umfasst:

das Anpassen einer ersten Kurve an einen Graph der gemessenen Kennwerte der Menge einer Nucleinsäuresequenz, die in einer ersten der Kalibrierproben amplifiziert wird, gegen erste Messpunkte im Zeitintervall unter Anwendung einer nicht parametrischen Glättungsoperation;

das Ermitteln einer ersten unteren Vertrauensgrenzkurve aus der ersten Kurve;
 das Anpassen einer zweiten Kurve an einen Graph der gemessenen Kennwerte der Menge einer Nucleinsäuresequenz, die in einer zweiten der Kalibrierproben amplifiziert wird, gegen zweite Messpunkte im Zeitintervall unter Anwendung einer nicht parametrischen Glättungsoperation;
 das Ermitteln einer zweiten unteren Vertrauensgrenzkurve aus der zweiten Kurve;
 das Bestimmen erster Schnittpunkte zwischen dem ersten Grenzpegel und der ersten und der zweiten unteren Vertrauensgrenzkurve; und
 das Ermitteln der ersten Punkte im Zeitintervall aus den ersten Schnittpunkten.

3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der Schritt des Bestimmens von ersten Punkten im Zeitintervall die folgenden Schritte umfasst:

das Anpassen einer ersten Kurve an einen Graph der gemessenen Kennwerte der Menge einer Nucleinsäuresequenz, die in einer ersten der Kalibrierproben amplifiziert wird, gegen erste Messpunkte im Zeitintervall unter Anwendung einer nicht parametrischen Glättungsoperation;
 das Anpassen einer zweiten Kurve an einen Graph der gemessenen Kennwerte der Menge einer Nucleinsäuresequenz, die in einer zweiten der Kalibrierproben amplifiziert wird, gegen zweite Messpunkte im Zeitintervall unter Anwendung einer nicht parametrischen Glättungsoperation;
 das Ermitteln erster Schnittpunkte zwischen dem ersten Grenzpegel und der ersten und der zweiten Kurve; und
 das Ermitteln der ersten Punkte im Zeitintervall aus den ersten Schnittpunkten.

4. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der Schritt des Bestimmens von ersten Punkten im Zeitintervall die folgenden Schritte umfasst:

das Anpassen einer ersten Kurve an einen Graph der gemessenen Kennwerte der Menge einer Nucleinsäuresequenz, die in einer ersten der Kalibrierproben amplifiziert wird, gegen erste Messpunkte im Zeitintervall unter Anwendung einer nicht parametrischen Glättungsoperation;
 das Ermitteln einer ersten unteren Vertrauensgrenzkurve aus der ersten Kurve unter Anwendung einer nicht parametrischen Glättungsoperation;
 das Anpassen einer zweiten Kurve an einen Graph der gemessenen Kennwerte der Menge einer Nucleinsäuresequenz, die in einer zweiten der Kalibrierproben amplifiziert wird, gegen zweite Messpunkte im Zeitintervall unter Anwendung einer nicht parametrischen Glättungsoperation;
 das Ermitteln einer zweiten unteren Vertrauensgrenzkurve aus der zweiten Kurve unter Anwendung einer nicht parametrischen Glättungsoperation;
 das Bestimmen erster Schnittpunkte zwischen dem ersten Grenzpegel und der ersten und der zweiten

unteren Vertrauensgrenzkurve; und
 das Ermitteln der ersten Punkte im Zeitintervall aus den ersten Schnittpunkten.

5. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der Amplifizierungsschritt das Amplifizieren einer Mehrzahl von bekannten Mengen einer Nucleinsäuresequenz in entsprechenden Kalibrier- und Vergleichsproben und einer unbekanntem Menge einer Nucleinsäuresequenz in einer Testprobe während des Zeitintervalls umfasst;

wobei der Schritt des Bestimmens erster Punkte im Zeitintervall das Bestimmen – für einen ersten Grenzpegel – von ersten Punkten in dem Zeitintervall, in dem die Kennwerte der Mengen einer Nucleinsäuresequenz, die in den Kalibrier- und Vergleichsproben amplifiziert wird, dem ersten Grenzpegel entsprechen, umfasst, und zwar basierend auf den gemessenen Kennwerten der Mengen einer Nucleinsäuresequenz, die in den Kalibrierproben amplifiziert wird; und

wobei der Schritt des Bestimmens, welcher der ersten oder zweiten Punkte im Zeitintervall einen kleineren Regressionsfehlerwert basierend auf dem statistischen Kriterium liefert, die Schritte des Anpassens einer ersten Linie an einen Graph der ersten Punkte über Logarithmen der bekannten Mengen einer Nucleinsäuresequenz in den Kalibrierproben und danach des Bestimmens eines mittleren Vorhersagefehlers zwischen jenen der ersten Punkte, die den Vergleichsproben und der ersten Linie entsprechen, umfasst.

6. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der Schritt des Bestimmens von ersten Punkten im Zeitintervall die folgenden Schritte umfasst:

das Ermitteln einer ersten unteren Vertrauensgrenzkurve aus einem Graph der gemessenen Kennwerte der Menge einer Nucleinsäuresequenz, die in einer ersten der Kalibrierproben amplifiziert wird, gegen erste Messpunkte im Zeitintervall;
 das Ermitteln einer zweiten unteren Vertrauensgrenzkurve aus einem Graph der gemessenen Kennwerte der Menge einer Nucleinsäuresequenz, die in einer zweiten der Kalibrierproben amplifiziert wird, gegen zweite Messpunkte im Zeitintervall;
 das Bestimmen erster Schnittpunkte zwischen dem ersten Grenzpegel und der ersten und der zweiten unteren Vertrauensgrenzkurve; und
 das Ermitteln der ersten Punkte im Zeitintervall aus den ersten Schnittpunkten.

7. Apparat zum Bestimmen einer Menge einer Nucleinsäuresequenz in einer Testprobe, umfassend:

Mittel zum Messen von Kennwerten der Mengen einer Nucleinsäuresequenz, die in einer Testprobe, die eine unbekanntem Ausgangsmenge einer Nucleinsäuresequenz enthält, und in einer Mehrzahl von Kalibrierproben, die entsprechende bekannte Mengen einer Nucleinsäuresequenz enthalten, amplifiziert wird,

und zwar an Messpunkten in einem Zeitintervall; und ein Computerprogrammprodukt, umfassend ein computerlesbares Speichermedium, mit computerlesbaren Programmcodemitteln, die in diesem Medium verwirklicht sind, wobei die computerlesbaren Programmcodemittel Folgendes umfassen:

computerlesbare Programmcodemittel zum Bestimmen – für einen ersten Grenzpegel – von ersten Punkten in dem Zeitintervall, in dem die Kennwerte der Mengen einer Nucleinsäuresequenz, die in den Kalibrierproben amplifiziert wird, dem ersten Grenzpegel entsprechen, und zwar unter Verwendung der gemessenen Kennwerte der Mengen einer Nucleinsäuresequenz, die in den Kalibrierproben amplifiziert wird;

computerlesbare Programmcodemittel zum Bestimmen – für einen zweiten Grenzpegel – von zweiten Punkten in dem Zeitintervall, in dem die Kennwerte der Mengen einer Nucleinsäuresequenz, die in den Kalibrierproben amplifiziert wird, dem zweiten Grenzpegel entsprechen, und zwar unter Verwendung der gemessenen Kennwerte der Mengen einer Nucleinsäuresequenz, die in den Kalibrierproben amplifiziert wird;

computerlesbare Programmcodemittel zum Bestimmen bezüglich eines statistischen Kriteriums, welcher der ersten oder zweiten Punkte im Zeitintervall verglichen mit den bekannten Mengen einer Nucleinsäuresequenz in den Kalibrierproben einen kleineren Regressionsfehlerwert basierend auf dem statistischen Kriterium liefert; und

computerlesbare Programmcodemittel zum Bestimmen einer Menge einer Nucleinsäuresequenz in der Testprobe basierend auf jenen der ersten oder zweiten Grenzpegel, von denen festgestellt wurde, dass sie den kleineren Regressionsfehlerwert basierend auf dem statistischen Kriterium liefern;

wobei dieser Schritt des Bestimmens, welcher der ersten oder zweiten Punkte im Zeitintervall einen kleineren Regressionsfehlerwert basierend auf dem statistischen Kriterium liefert, den Schritt des Bestimmens, welcher der ersten oder zweiten Punkte im Zeitintervall einen kleineren linearen Regressionsfehler gegenüber Logarithmen der bekannten Mengen einer Nucleinsäuresequenz in den Kalibrierproben liefert, umfasst.

8. Apparat nach Anspruch 7, wobei die computerlesbaren Programmcodemittel zum Bestimmen erster Punkte im Zeitintervall Folgendes umfassen:

computerlesbare Programmcodemittel zum Anpassen einer ersten Kurve an einen Graph der gemessenen Kennwerte der Menge einer Nucleinsäuresequenz, die in einer ersten der Kalibrierproben amplifiziert wird, gegen erste Messpunkte im Zeitintervall; computerlesbare Programmcodemittel zum Ermitteln einer ersten unteren Vertrauensgrenzkurve aus der ersten Kurve;

computerlesbare Programmcodemittel zum Anpassen einer zweiten Kurve an einen Graph der gemessenen

senen Kennwerte der Menge einer Nucleinsäuresequenz, die in einer zweiten der Kalibrierproben amplifiziert wird, gegen zweite Messpunkte im Zeitintervall;

computerlesbare Programmcodemittel zum Ermitteln einer zweiten unteren Vertrauensgrenzkurve aus der zweiten Kurve;

computerlesbare Programmcodemittel zum Bestimmen erster Schnittpunkte zwischen dem ersten Grenzpegel und der ersten und der zweiten unteren Vertrauensgrenzkurve; und

computerlesbare Programmcodemittel zum Ermitteln der ersten Punkte im Zeitintervall aus den ersten Schnittpunkten.

9. Apparat nach Anspruch 7, wobei die computerlesbaren Programmcodemittel zum Bestimmen erster Punkte im Zeitintervall Folgendes umfassen:

computerlesbare Programmcodemittel zum Anpassen einer ersten Kurve an einen Graph der gemessenen Kennwerte der Menge einer Nucleinsäuresequenz, die in einer ersten der Kalibrierproben amplifiziert wird, gegen erste Messpunkte im Zeitintervall unter Anwendung einer nicht parametrischen Glättungsoperation;

computerlesbare Programmcodemittel zum Ermitteln einer ersten unteren Vertrauensgrenzkurve aus der ersten Kurve;

computerlesbare Programmcodemittel zum Anpassen einer zweiten Kurve an einen Graph der gemessenen Kennwerte der Menge einer Nucleinsäuresequenz, die in einer zweiten der Kalibrierproben amplifiziert wird, gegen zweite Messpunkte im Zeitintervall unter Anwendung einer nicht parametrischen Glättungsoperation;

computerlesbare Programmcodemittel zum Ermitteln einer zweiten unteren Vertrauensgrenzkurve aus der zweiten Kurve;

computerlesbare Programmcodemittel zum Bestimmen erster Schnittpunkte zwischen dem ersten Grenzpegel und der ersten und der zweiten unteren Vertrauensgrenzkurve; und

computerlesbare Programmcodemittel zum Ermitteln der ersten Punkte im Zeitintervall aus den ersten Schnittpunkten.

10. Apparat nach Anspruch 7, wobei die computerlesbaren Programmcodemittel zum Bestimmen erster Punkte im Zeitintervall Folgendes umfassen:

computerlesbare Programmcodemittel zum Anpassen einer ersten Kurve an einen Graph der gemessenen Kennwerte der Menge einer Nucleinsäuresequenz, die in einer ersten der Kalibrierproben amplifiziert wird, gegen erste Messpunkte im Zeitintervall unter Anwendung einer nicht parametrischen Glättungsoperation;

computerlesbare Programmcodemittel zum Ermitteln einer ersten unteren Vertrauensgrenzkurve aus der ersten Kurve unter Anwendung einer nicht parametrischen Glättungsoperation;

computerlesbare Programmcodemittel zum Anpassen einer zweiten Kurve an einen Graph der gemessenen Kennwerte der Menge einer Nucleinsäuresequenz, die in einer zweiten der Kalibrierproben amplifiziert wird, gegen zweite Messpunkte im Zeitintervall unter Anwendung einer nicht parametrischen Glättungsoperation;

computerlesbare Programmcodemittel zum Ermitteln einer zweiten unteren Vertrauensgrenzkurve aus der zweiten Kurve unter Anwendung einer nicht parametrischen Glättungsoperation;

computerlesbare Programmcodemittel zum Bestimmen erster Schnittpunkte zwischen dem ersten Grenzpegel und der ersten und der zweiten geglätteten unteren Vertrauensgrenzkurve; und

computerlesbare Programmcodemittel zum Ermitteln der ersten Punkte im Zeitintervall aus den ersten Schnittpunkten.

11. Apparat nach Anspruch 7, wobei der Schritt des Bestimmens, welcher der ersten oder zweiten Punkte im Zeitintervall einen kleineren linearen Regressionsfehler liefert, die folgenden Schritte umfasst:

das Anpassen einer ersten Regressionslinie an einen Graph der ersten Punkte über Logarithmen der bekannten Mengen einer Nucleinsäuresequenz in den Kalibrierproben;

das Anpassen einer zweiten Regressionslinie an einen Graph der zweiten Punkte über Logarithmen der bekannten Mengen einer Nucleinsäuresequenz in den Kalibrierproben;

das Bestimmen einer Standardabweichung der Anpassung zwischen den ersten Punkten und der ersten Regressionslinie; und

das Bestimmen einer Standardabweichung der Anpassung zwischen den zweiten Punkten und der zweiten Regressionslinie.

12. Apparat nach Anspruch 7, wobei der Schritt des Bestimmens erster Punkte im Zeitintervall die folgenden Schritte umfasst:

das Anpassen einer ersten Kurve an einen Graph der gemessenen Kennwerte der Menge einer Nucleinsäuresequenz, die in einer ersten der Kalibrierproben amplifiziert wird, gegen erste Messpunkte im Zeitintervall;

das Ermitteln einer ersten unteren Vertrauensgrenzkurve aus der ersten Kurve;

das Anpassen einer zweiten Kurve an einen Graph der gemessenen Kennwerte der Menge einer Nucleinsäuresequenz, die in einer zweiten der Kalibrierproben amplifiziert wird, gegen zweite Messpunkte im Zeitintervall;

das Ermitteln einer zweiten unteren Vertrauensgrenzkurve aus der zweiten Kurve;

das Bestimmen erster Schnittpunkte zwischen dem ersten Grenzpegel und der ersten und der zweiten unteren Vertrauensgrenzkurve; und

das Ermitteln der ersten Punkte im Zeitintervall aus

den ersten Schnittpunkten.

13. Computerprogrammprodukt, das durch eine Maschine lesbar ist, an der Mittel zum Messen von Kennwerten von Mengen einer Nucleinsäuresequenz betriebsfähig gekoppelt sind, welche Nucleinsäuresequenz in einer Testprobe, die eine unbekannte Ausgangsmenge einer Nucleinsäuresequenz enthält, und in einer Mehrzahl von Kalibrierproben, die entsprechende bekannte Mengen einer Nucleinsäuresequenz enthalten, amplifiziert wird, und zwar an Messpunkten in einem Zeitintervall, und das konkret ein Programm von Instruktionen verkörpert, das von der Maschine ausführbar ist, um die folgenden Verfahrensschritte durchzuführen:

das Bestimmen – für einen ersten Grenzpegel – von ersten Punkten in dem Zeitintervall, in dem die Kennwerte der Mengen einer Nucleinsäuresequenz, die in den Kalibrierproben amplifiziert wird, dem ersten Grenzpegel entsprechen, und zwar unter Verwendung der gemessenen Kennwerte der Mengen einer Nucleinsäuresequenz, die in den Kalibrierproben amplifiziert wird;

das Bestimmen – für einen zweiten Grenzpegel – von zweiten Punkten in dem Zeitintervall, in dem die Kennwerte der Mengen einer Nucleinsäuresequenz, die in den Kalibrierproben amplifiziert wird, dem zweiten Grenzpegel entsprechen, und zwar unter Verwendung der gemessenen Kennwerte der Mengen einer Nucleinsäuresequenz, die in den Kalibrierproben amplifiziert wird;

das Bestimmen bezüglich eines statistischen Kriteriums, welcher der ersten oder zweiten Punkte im Zeitintervall verglichen mit den bekannten Mengen einer Nucleinsäuresequenz in den Kalibrierproben einen kleineren Regressionsfehlerwert basierend auf dem statistischen Kriterium liefert; und

das Bestimmen einer Menge einer Nucleinsäuresequenz in der Testprobe basierend auf jenen der ersten oder zweiten Grenzpegel, von denen festgestellt wurde, dass sie den kleineren Regressionsfehlerwert basierend auf dem statistischen Kriterium liefern; wobei dieser Schritt des Bestimmens, welcher der ersten oder zweiten Punkte im Zeitintervall einen kleineren Regressionsfehlerwert basierend auf dem statistischen Kriterium liefert, den Schritt des Bestimmens, welcher der ersten oder zweiten Punkte im Zeitintervall einen kleineren linearen Regressionsfehler gegenüber Logarithmen der bekannten Mengen einer Nucleinsäuresequenz in den Kalibrierproben liefert, umfasst.

14. Computerprogrammprodukt nach Anspruch 13, wobei der Schritt des Bestimmens erster Punkte im Zeitintervall die folgenden Schritte umfasst:

das Anpassen einer ersten Kurve an einen Graph der gemessenen Kennwerte der Menge einer Nucleinsäuresequenz, die in einer ersten der Kalibrierproben amplifiziert wird, gegen erste Messpunkte im Zeitintervall;

das Ermitteln einer ersten unteren Vertrauensgrenzkurve aus der ersten Kurve;
das Anpassen einer zweiten Kurve an einen Graph der gemessenen Kennwerte der Menge einer Nucleinsäuresequenz, die in einer zweiten der Kalibrierproben amplifiziert wird, gegen zweite Messpunkte im Zeitintervall;
das Ermitteln einer zweiten unteren Vertrauensgrenzkurve aus der zweiten Kurve;
das Bestimmen erster Schnittpunkte zwischen dem ersten Grenzpegel und der ersten und der zweiten unteren Vertrauensgrenzkurve; und
das Ermitteln der ersten Punkte im Zeitintervall aus den ersten Schnittpunkten.

Es folgen 8 Blatt Zeichnungen

FIG-1

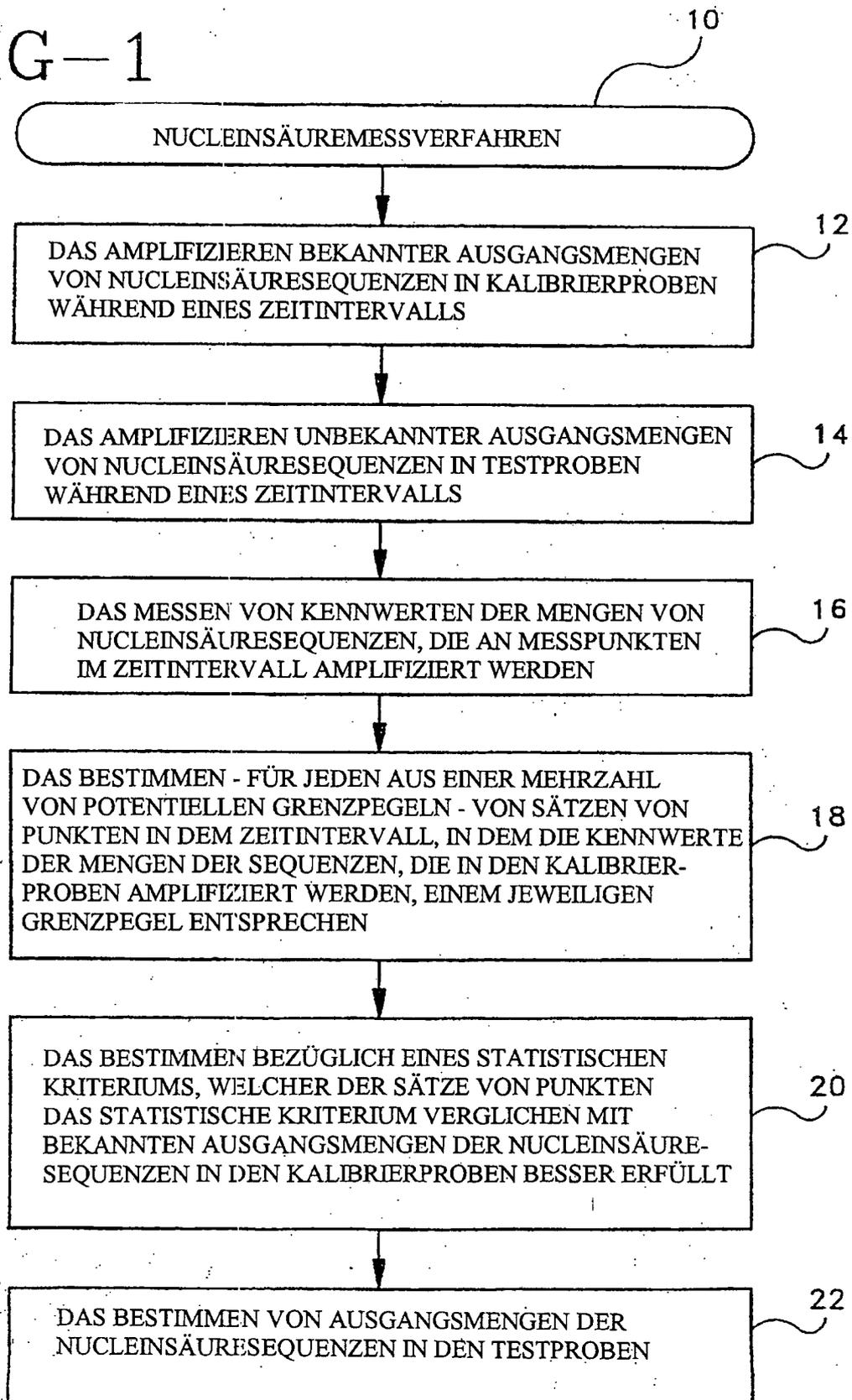
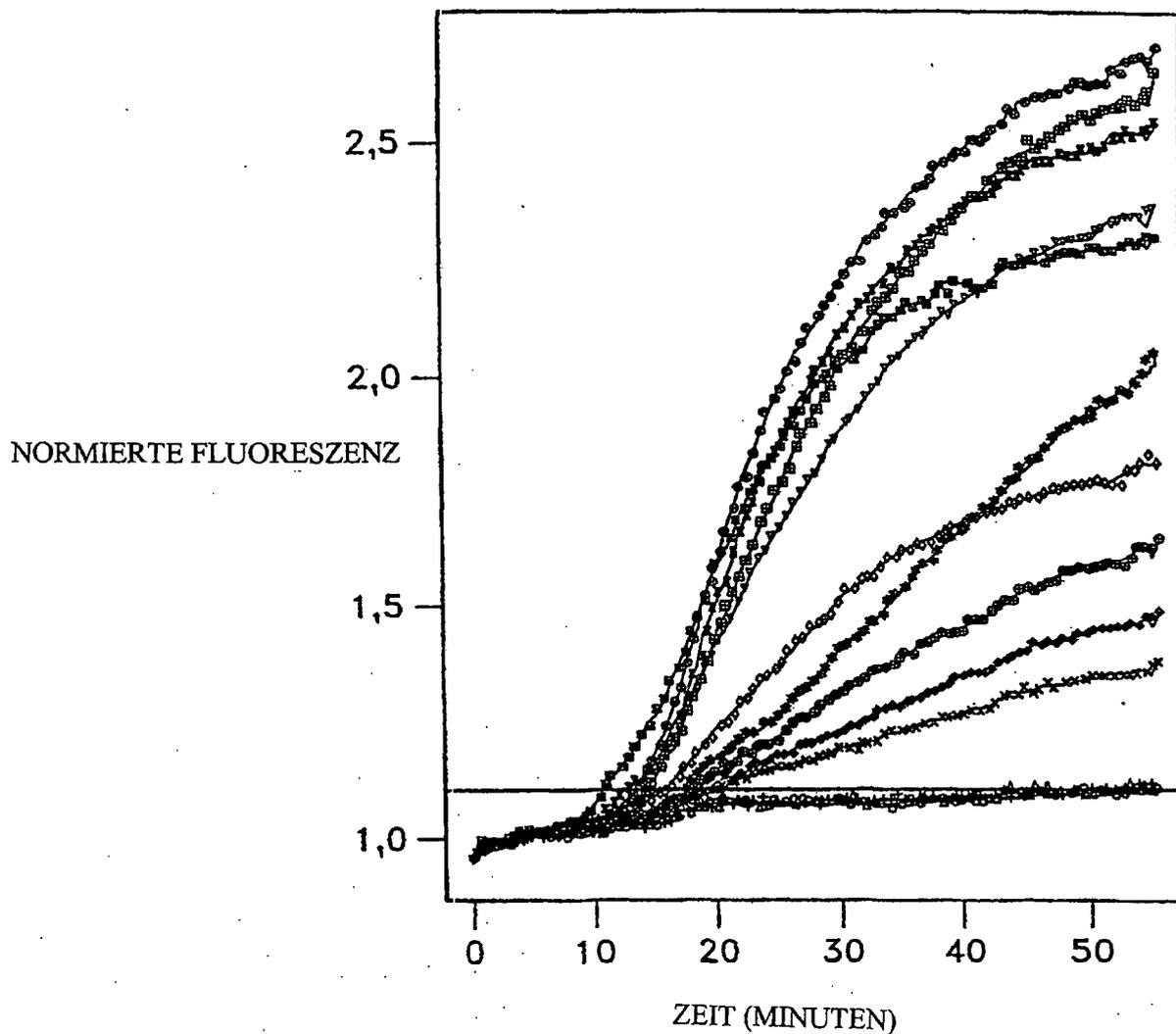


FIG-2



- | | |
|---------------|--------------|
| ○ CS1 = 0 | * T1 = 1144 |
| △ CS2 = 0 | ⊕ T2 = 1144 |
| + CS3 = 40 | ⊗ T3 = 1144 |
| x CS4 = 400 | ⊗ T4 = 10560 |
| ◇ CS5 = 4000 | ⊗ T5 = 10560 |
| ▽ CS6 = 15000 | ⊗ T6 = 10560 |
| ⊠ CS7 = 40000 | |

FIG-3

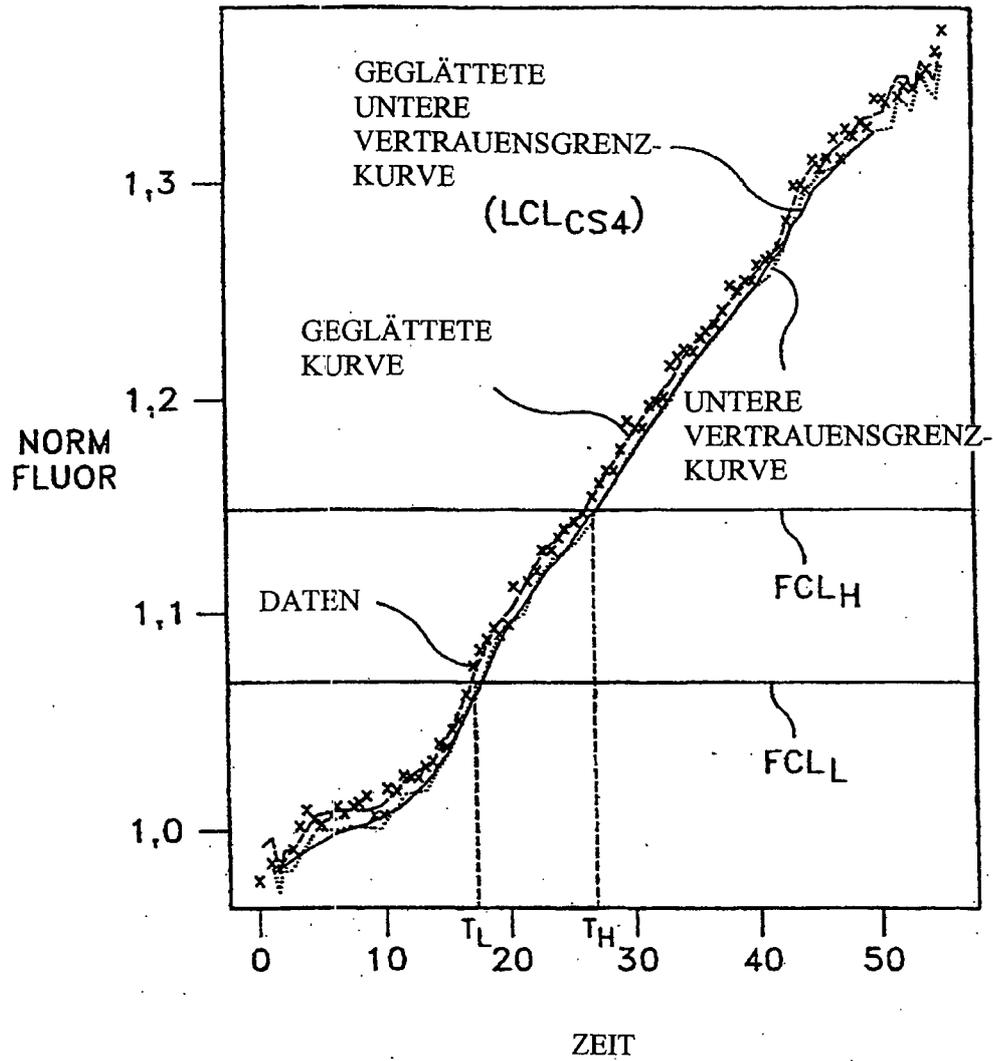


FIG-4A

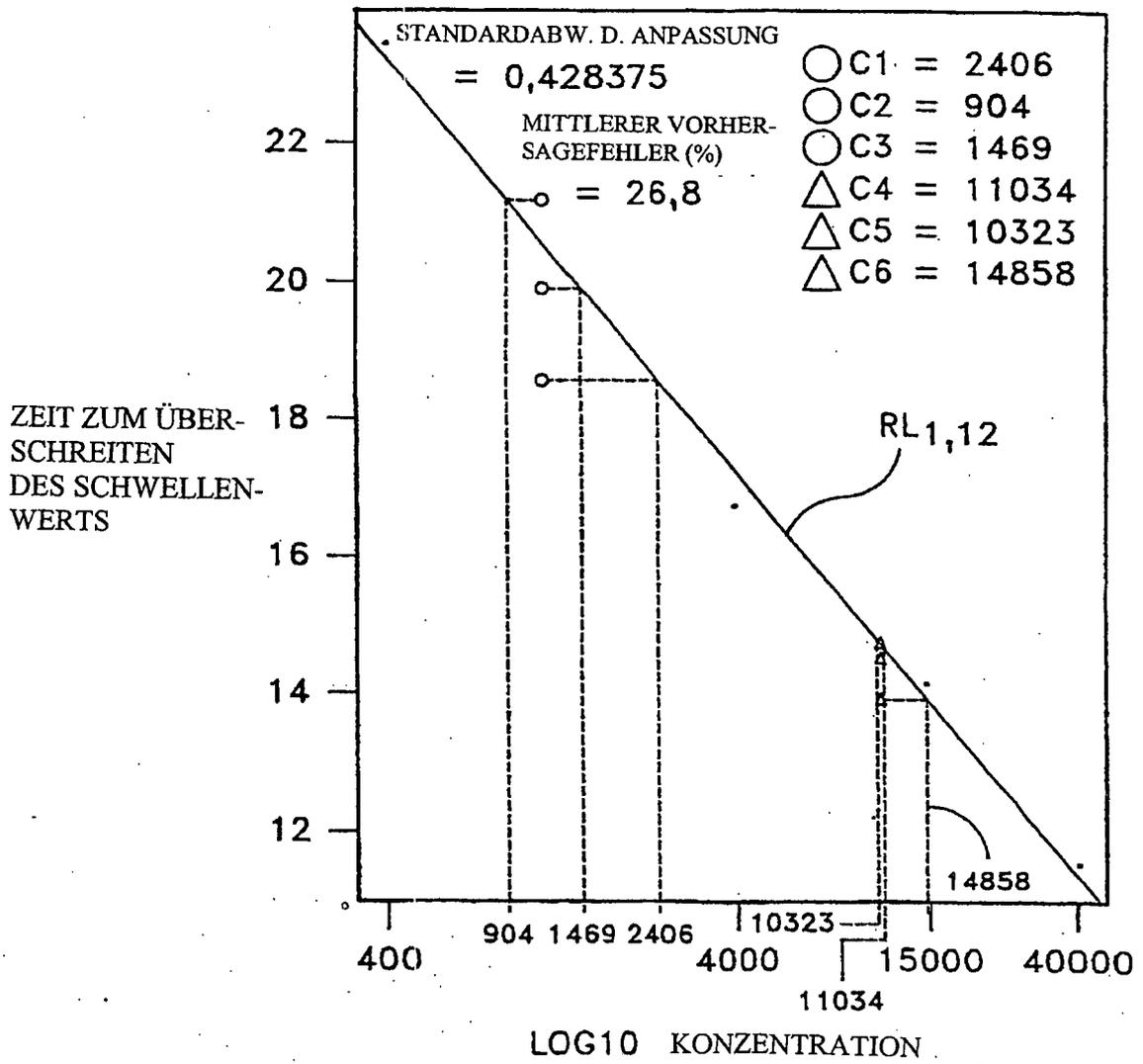


FIG-4B

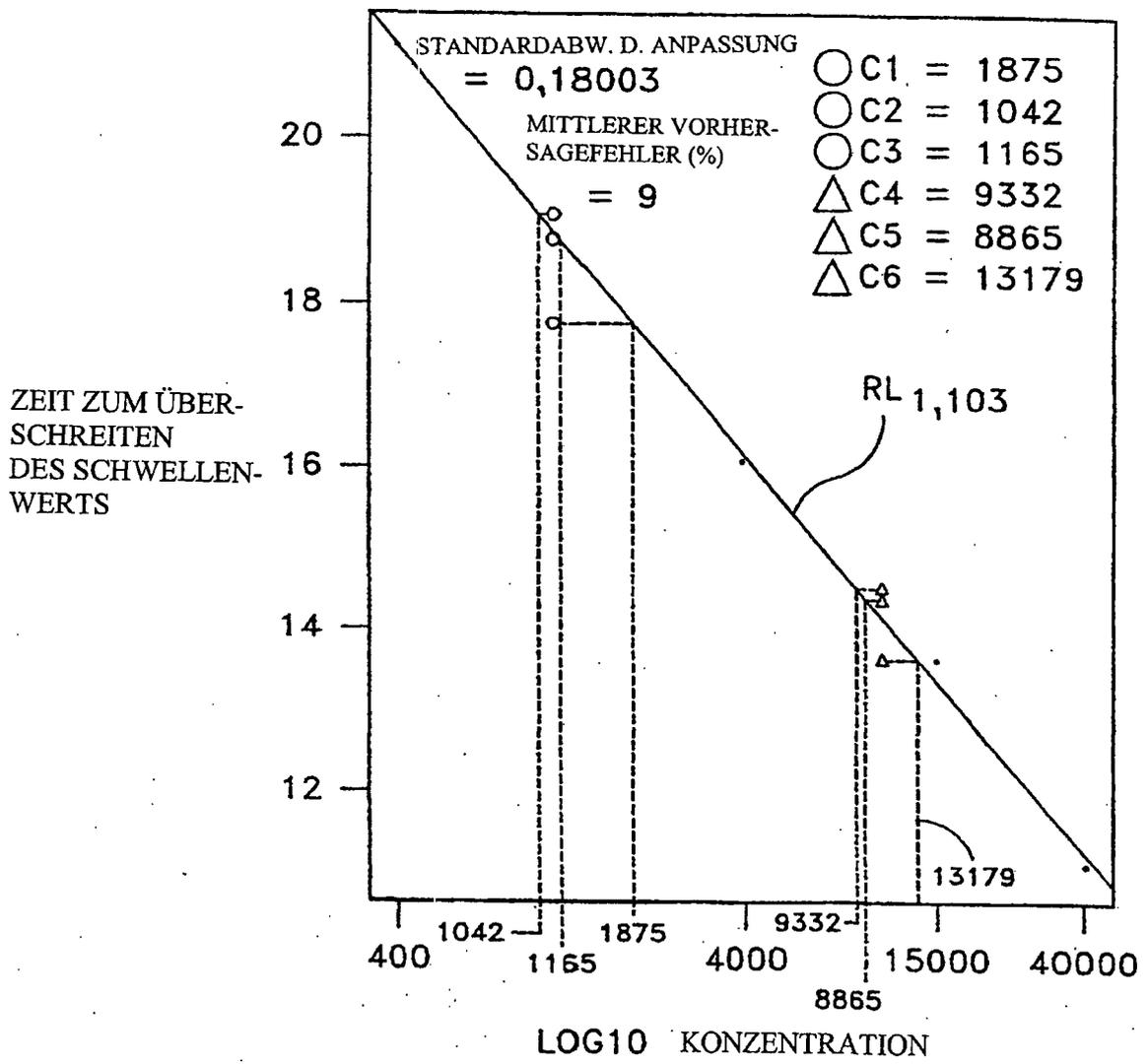
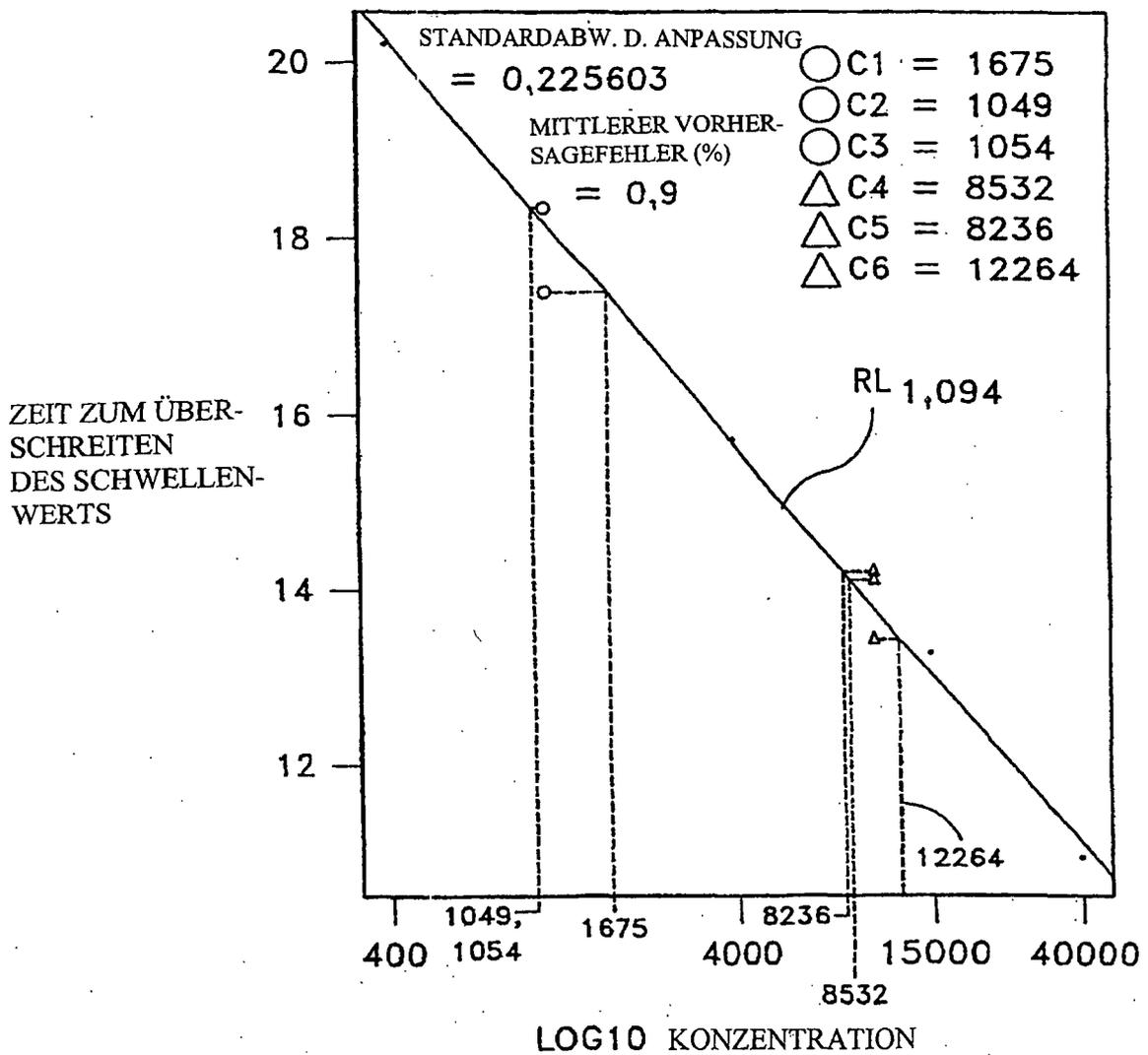


FIG-4C



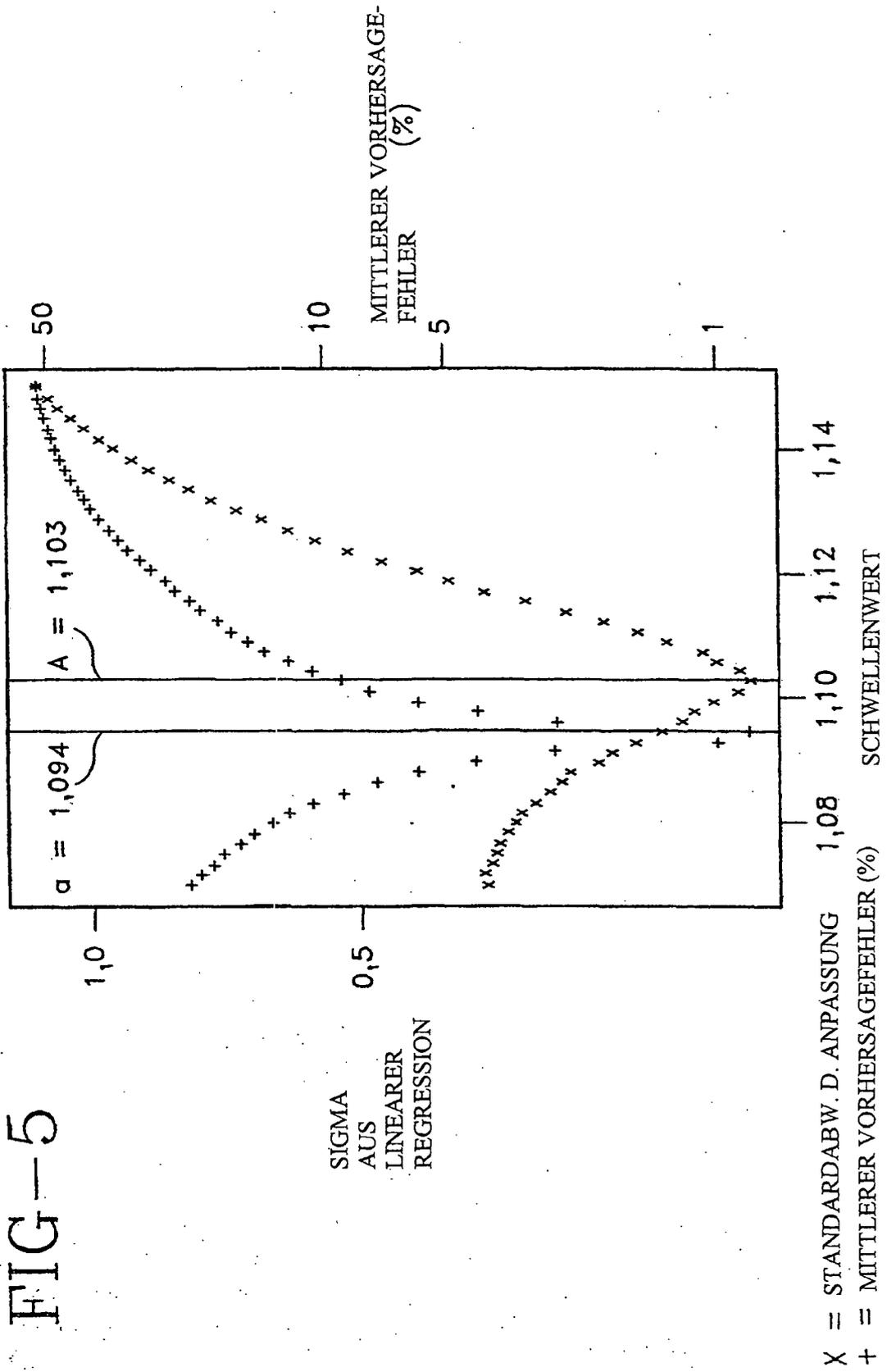


FIG-5

FIG-6

