

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
20. Mai 2010 (20.05.2010)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2010/054639 A2

(51) Internationale Patentklassifikation:
C12N 15/09 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2009/001594

(22) Internationales Anmeldedatum:
13. November 2009 (13.11.2009)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2008 057 257.8
13. November 2008 (13.11.2008) DE
10 2009 016 075.2 3. April 2009 (03.04.2009) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): EUCRO EUROPEAN CONTRACT RESEARCH GMBH & CO. KG [DE/DE]; Stresemannallee 6, 41460 Neuss (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): TILLMANN, Hanns-Christian [DE/DE]; Im Vogelsang 6A, 79539 Lörrach (DE). GREB, Wolfgang [DE/DE]; Am Fronberg 11, 40489 Düsseldorf (DE).

(74) Anwälte: CHRISTOPHERSEN, Ruth et al.; Christophersen & Partner, Feldstrasse 73, 40479 Düsseldorf (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts (Regel 48 Absatz 2 Buchstabe g)

(54) Title: METHOD FOR COLLECTING ORAL MUCOSA SKIN CELLS AND/OR CELL FRAGMENTS

(54) Bezeichnung : VERFAHREN ZUM SAMMELN VON MUNDSCHEIMHAUTZELLEN UND/ODER -ZELLFRAGMENTEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for collecting oral mucosa cells and/or cell fragments from patients (participants/ persons), wherein the person or patient chews a water insoluble, non-digestible chewing mass, wherein the oral mucosa skin cells and/or DNA and/or RNA and/or the fragments thereof are taken up by the chewing mass during the chewing process and the taken up cells and/or cell fragments can be separated from the chewing mass after the chewing process has been completed. The cells/cell fragments can be used to obtain DNA, cell components, human cells, bacteria and viruses, and for other analytical purposes.

(57) Zusammenfassung: Es wird ein Verfahren zum Sammeln von Mundschleimhautzellen und/oder -zellfragmenten von Patienten (Proband/Mensch) beansprucht, in welchen der Mensch oder Patient eine wasserunlösliche, unverdauliche Kaumasse kaut, wobei die Mundschleimhautzellen und/oder DNA und/oder RNA und/oder deren Fragmente während des Kauvorgangs von der Kaumasse aufgenommen werden und die aufgenommenen Zellen und/oder Zellfragmente nach Abschluss des Kauvorgangs von der Kaumasse abgetrennt werden können. Die Zellen/Zellfragmente können zur Gewinnung von DNA, Zellbestandteilen, Humanzellen, Bakterien und Viren und weitere analytische Zwecke eingesetzt werden.



WO 2010/054639 A2

Verfahren zum Sammeln von Mundschleimhautzellen und/oder –zellfragmenten

5

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Sammeln von Mundschleimhautzellen und/oder –zellfragmenten bzw. DNA oder RNA.

10

Die Gewinnung von DNA oder RNA erfolgt üblicherweise aus Zellmaterial. In vielen Fällen ist es erforderlich, sofern nicht genügend Zellen isoliert werden konnten, die Nukleinsäuren mittels PCR etc. zu vermehren. Mit aus gesammelten Zellen und/oder Zellfragmenten isolierter DNA und RNA können verschiedene Untersuchungen durchgeführt werden. Dazu gehören diagnostische Verfahren zur Risikoanalyse für Erkrankungswahrscheinlichkeiten oder zum Beginn oder zur Optimierung einer Arzneimitteltherapie. Auch können anhand

15 gewonnener DNA Genpolymorphismen für genealogische Untersuchungen oder Vaterschaftstests herangezogen werden. Auch für rein informative Zwecke kann die DNA gewonnen, extrahiert und untersucht werden. Geschäftsmodelle mehrerer Firmen basieren auf der Neugier des Menschen an der Entschlüsselung des eigenen Erbgutes (z.B. 23andme, USA). Auch hier findet das beschriebene Verfahren Anwendung.

20

Untersuchungen der RNA geben Aufschluss über die Transkription der DNA. In der Tumordiagnostik, bei metabolischen Erkrankungen, bei Erkrankungen des kardiovaskulären Systems, bei Infektionskrankheiten hilft die Analyse der RNA Transkriptionsmuster, verschiedene physiologische und pathophysiologische Zustände voneinander abzugrenzen.

25

Wichtige Beispiele sind hier die Untersuchung von RNA Expressionmustern in Tumoren, die eine individualisierte, auf den spezifischen Tumor angepasste Pharmakotherapie ermöglichen. Auch können mittels DNA und RNA Analyse Rückschlüsse auf Lebensgewohnheiten und –umstände sowie gesundheitsfördernde und –schädigende Faktoren, denen eine Person ausgesetzt ist, gezogen werden. Diese Aspekte werden heute

30 unter dem Fachbegriff der Epigenetik zusammengefasst.

Da zwischen den Genomen unterschiedlicher Spezies klar charakterisierbare Unterschiede bestehen lässt sich anhand von Nukleinsäuren deren Spezies Herkunft bestimmen. So kann z.B. humane DNA anhand spezieller Primer (definierte Oligonukleotide) von mikrobieller DNA

unterschieden werden. Des weiteren kann mittels anderer definierter Primer zwischen verschiedenen mikrobiellen Spezies unterschieden werden.

Die Sammlung von Zellen und/oder Zellfragmenten mit kompakten Kaumassen sowie die Extraktion von DNA oder RNA und deren Aufarbeitung und Analytik sind Teil der vorliegenden Erfindung.

Zur Gewinnung von Zellmaterial eignet sich unter anderem auch Speichel, in welchem sich Zellen und Zellmaterial aus der Mundschleimhaut befindet.

Aus dem Stand der Technik sind Kaugummis bekannt, in welchen Speichel zu Diagnosezwecken verwendet wird. In der DE 36 32 133 wird z. B. eine kaubare Masse offenbart, die ein für Diagnosezwecke geeignetes Material enthält, das beim Kontakt mit einem im Speichel des gesunden Menschen normalerweise nicht oder in höherer oder geringerer Konzentration vorhandenen Stoffes mit einer charakteristischen Farb- und/oder Geschmacksänderung reagiert.

In der WO 01/21156 wird ein pharmazeutisches Kaugummi offenbart, welches zur kontinuierlichen Abgabe eines Medikaments eingesetzt wird. Dieses Kaugummi enthält ein Medikament, das beim Kauen des Kaugummis in die Mundhöhle des Patienten freigesetzt wird und durch das kontinuierliche Kauen wird ein Flüssigkeitsdruck aufgebaut, der bewirkt, dass das Arzneimittel über die Mundschleimhaut in das systemische System des Patienten eintritt.

Aus dem Stand der Technik sind Verfahren zum Sammeln von Mundschleimhautzellen bekannt, mit welchem das Zellmaterial mit Hilfe von Wattestäbchen oder Zellabstreifer entnommen werden. Die Hilfsmittel können in vielen Fällen nicht vom Patienten selbst eingesetzt werden. Insbesondere bei kranken und älteren Menschen besteht die Gefahr, dass, wenn diese die Hilfsmittel ohne Unterstützung oder Hilfe von medizinischem Personal verwenden, nicht ausreichend Zellen einschließlich Speichel entnommen werden und insgesamt zuwenig Zellen für die medizinische oder genetischen Analyse und Diagnostik vorliegen.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist demgemäß ein Verfahren zum Sammeln von Mundschleimhautzellen und/oder -zellfragmenten von Patienten (Proband/Mensch), in welchen der Mensch oder Patient eine wasserunlösliche, unverdauliche Kaumasse kaut, wobei die Mundschleimhautzellen und/oder -zellfragmente und/oder DNA und/oder RNA

bzw. deren Fragmente während des Kauvorgangs von der Kaumasse aufgenommen werden und die aufgenommenen Zellen und/oder Zellfragmente nach Abschluss des Kauvorgangs von der Kaumasse abgetrennt werden können.

5 Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist es möglich, auf einfache und unkomplizierte Weise Zellen zu sammeln. Die Zellen/Zellfragmente können zur Gewinnung von DNA, DNA-Fragmenten, RNA, RNA-Fragmenten, Zellbestandteilen, Human-Zellen, Bakterien, Pilze, Protozoen und Viren und weitere analytische Zwecke eingesetzt werden. Ferner kann das erfindungsgemäße Verfahren dazu dienen, eine individuelle Therapie durch Arzneimittel in
10 Bezug auf Dosis, Art und Qualität der verwendeten Wirkstoffe hin zu optimieren. Das Verfahren kann zur Erkennung von Genpolymorphismen benutzt werden, so zum Zwecke der Diagnostik individueller Eigenschaften, sowie von Erkrankungen sowie Genexpressionsmustern, die eine Identifikation der Person als auch ihrer Gefährdung durch Umwelt, Erkrankungen oder auch therapeutische Maßnahmen ermöglichen.

15 Soweit in der vorliegenden Anmeldung der Begriff DNA bzw. RNA verwendet wird, sind nicht nur die vollständige DNA bzw. RNA sondern auch DNA-Fragmente bzw. RNA-Fragmente gemeint.

20 Durch das Kauen von Kaugummi werden die Zellen und Zellfragmente schnell und effizient über ein nicht-invasives Verfahren gesammelt.

Die gewonnenen Zellen und/oder Zellfragmente können in an sich bekannter Weise aus der Kaumasse abgetrennt werden, beispielsweise durch Spülen oder Extraktion der Kaumasse
25 mit Wasser oder einem anderen Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemischen. Als organische Lösungsmittel sind Alkohole (Methanol, Ethanol, iso-Propanol), Aceton, DMSO, DMF etc. die auch im Gemisch mit Wasser eingesetzt werden. Darüber hinaus kann das Lösungsmittel bzw. -gemisch Tenside, Enzyme und andere Substanzen enthalten, die das Abtrennen der des Zellmaterials von der Kaumasse unterstützen.

30 In einer möglichen Ausgestaltung der vorliegenden Erfindung werden die erhaltenen Zellen und/oder Zellfragmente in einem nachfolgenden Verfahrensschritt einer DNA-Extraktion/RNA-Extraktion unterworfen. Die Extraktion kann in an sich bekannter Weise erfolgen, indem die isolierten Zellen zunächst aufgebrochen werden und die DNA und/oder RNA von den
35 Zelltrümmern und anderen Stoffen abgetrennt und gereinigt wird. Das Aufbrechen der Zellen kann mechanisch, durch Erhitzen, durch enzymatisches Auflösen oder durch chemisches Auflösen mittels Tensiden erfolgen. Die Aufreinigung der DNA bzw. der RNA ist ebenfalls

dem Fachmann gut bekannt und kann beispielsweise durch Fällen mit Alkohol, Phenol/Chloroform oder Salz bzw. Salzlösung erfolgen, auch eine Auftrennung durch Chromatographie ist möglich.

- 5 Die erhaltene Lösung kann aufkonzentriert werden, anschließend kann die DNA durch Zentrifugieren abgetrennt werden.

Die DNA Extraktion und -weiterverarbeitung kann im Wesentlichen auch nach einem Protokoll der Firma Qiagen erfolgen, wie es in
10 <http://www1.qiagen.com/literature/protocols/pdf/ma47.pdf> beschrieben wird.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zum Gewinnen von DNA aus Mundschleimhautzellen und/oder -zellfragmenten, in welchem die Person, deren DNA zu extrahieren ist, eine wasserunlösliche, unverdauliche Kaumasse kaut und nach
15 Abschluss des Kauvorgangs die Zellen und/oder Zellfragmente von der Kaumasse abgetrennt werden und die DNA und/oder RNA in an sich bekannter Weise aus den Zellen extrahiert wird.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zum Gewinnen von
20 DNA oder RNA aus Mundschleimhautzellen und/oder -zellfragmenten, in welchem die Person, deren DNA oder RNA zu extrahieren ist, eine wasserunlösliche, unverdauliche Kaumasse kaut, in die spezifische Oligonukleotide (Primer) integriert sind.

Als Kaumasse kann im erfindungsgemäßen Verfahren ein übliches Kaugummi oder
25 Bubblegum verwendet werden. Eine Kaumasse, die beispielsweise eingesetzt werden kann, ist in der internationalen Patentanmeldung WO 01/21156 offenbart.

Die verwendete Kaumasse enthält üblicherweise eine wasserunlösliche, beim Kauen plastisch werdende Kaugummi-Base, einen wasserlöslichen Anteil und ggf.
30 Geschmacksstoffe. Der wasserlösliche Anteil tritt während des Kauens mit den optional vorhandenen Geschmacksstoffen aus. Die unlösliche Kaugummi-Base enthält üblicherweise Elastomere, Harze, Fette und Öle, Weichmacher und anorganische Füllstoffe. Ferner kann die Kaugummi-Base Wachse enthalten.

35 Die unlösliche Kaugummi-Base kann etwa 5 bis etwa 95 Gewichtsprozent, bezogen auf die gesamte Kaumasse, insbesondere von 10 bis etwa 50 Gewichtsprozent und bevorzugt 25 bis 35 Gewichtsprozent betragen.

In einer möglichen Ausführungsform enthält die Kaugummi-Base etwa 20 bis 60 Gewichtsprozent synthetisches Elastomer, von 0 bis etwa 30 Gewichtsprozent natürliches Elastomer und 5 bis 55 Gewichtsprozent elastomeren Weichmacher, 4 bis 35 Gewichtsprozent Füllstoff, 5 bis 35 Gewichtsprozent Weichmacher und ggf. geringe Mengen (bis zu 1 Gewichtsprozent) verschiedene Inhaltsstoffe, wie Farbstoffe, Antioxidantien, antimikrobiell wirkende Inhaltsstoffe usw.

Der wasserunlösliche Anteil der Kaugummi-Base kann neben den bereits genannten Geschmacksstoffen, Farbstoffen und Antioxidantien, auch Weichmacher, Emulgiermittel, wasserlösliche Füllstoffe, wasserlösliche Antioxidantien und andere antimikrobiell wirkende Substanzen, Säuerungsmittel und weitere übliche Inhaltsstoffe sowie die Zellen bzw. Zellfragmente stabilisierende Konservierungsmittel enthalten.

In einer bevorzugten Ausführungsform enthält die erfindungsgemäß verwendete Kaumasse einen Farbstoff bzw. eine farbgebende Substanz, die während des Kauens einen Farbwechsel vollzieht und auf diese Weise das Ende des Kauvorgangs anzeigt, d.h. das ausreichend Zellmaterial und/oder DNA bzw. RNA aufgenommen wurde. Zu den farbgebenden Substanzen können z. B. zählen solche, die in der Lebensmittelherstellung eingesetzt werden oder auch enzymatische Komponenten oder andere Substanzen, die die Proteinbindung anzeigen. Die Anzeige des Farbwechsels sollte nach einem Zeitraum von ca. 30 Sek. bis 3 Minuten erfolgen.

In einer weiteren Ausführungsform enthält die Kaumasse Geschmacksstoffe, die sich während des Kauvorgangs derart verändern, dass das Ende des Kauvorgangs durch eine Änderung im Geschmack der Kaumasse angezeigt wird, wobei eine Änderung des Geschmacks auch eine Freisetzung von Säure o.ä. sein kann, die vom kauenden Menschen/Patienten wahrgenommen wird.

Die Gewinnung von Zellen-/Zellfragmenten und/oder DNA bzw. RNA kann optimiert werden, wenn die Kaumasse Abrasivstoffe enthält. Diese Abrasivstoffe bewirken eine verstärkte Freisetzung von Zellen und Zellmaterial von der Mundschleimhaut und zur Bindung im Kaugummi und können selbst auch als Absorbentien dienen. Hierzu zählen insbesondere schwerlösliche Stoffe, wie Siliciumoxid, (komplexe) Silikate, Kieselgele, Glas, Aluminiumoxide, Aluminiumsilikate, pulverförmige Kunststoffe, Titandioxid, Talkum, schwerlösliche Calciumverbindungen, wie Calcium-phosphat, Hydroxylapatit, Calciumcarbonat, schwerlösliche Phosphate sowie beliebige andere schwerlösliche Salze, die

lebensmittelgeeignet sind. Die Abrasivstoffe können in einer Menge zwischen 0,1 bis 10 Gewichtsprozent, bezogen auf die Gesamtkaumasse, enthalten sind. Es können auch Gemische von Abrasivstoffen eingestzt werden.

- 5 Um die von der Kaumasse aufgenommenen Zellen bei Lagerung und/oder Transport zu stabilisieren und vor Zerstörung durch äußere Einflüsse, wie durch bakterielle Kontamination und ggf. durch Inhaltstoffe der Luft, zu schützen, enthält die erfindungsgemäße Kaumasse vorzugsweise einen oder mehrere antimikrobiell wirkende(n) und/oder antioxidativ wirkende(n) Inhaltsstoff(e). Diese(r) weitere(n) Inhaltsstoff(e) sollte vorzugsweise
10 lebensmittelgeeignet sein, die Zellen selbst nicht zerstören. Ein Beispiel für einen geeigneten antimikrobiell wirkenden Inhaltsstoff ist Zimtöl.

- Als weitere Inhaltsstoffe kann die Kaumasse Komponenten enthalten, die die DNA und/oder RNA stabilisieren, beispielsweise geeignete Puffersysteme für den pH-Wert. Soll spezifisch
15 RNA gewonnen werden, ist die Verwendung einer Kaumasse bevorzugt, die als eine den pH-Wert stabilisierende Komponente Natriumcitrat enthält. So wird die RNA in einem System mit geeignetem pH stabilisiert.

- Die Kaumasse sollte über einen solchen Zeitraum gekaut werden, dass eine ausreichende
20 Anzahl von Mundschleimhautzellen und/oder –zellfragmenten aufgenommen wird. Ein Zeitraum von 30 Sekunden bis 3 Minuten hat sich als geeignet erwiesen. Um eine ausreichende Menge an Zellen aufzunehmen hat sich eine Kaumasse von 1 bis 4 Gramm, vorzugsweise 1,5 – 3 Gramm, als geeignet erwiesen.

- 25 Die mit den Mundschleimhautzellen und/oder –zellfragmenten beauftragte Kaumasse kann nach Abschluss des Kauvorgangs gewisse Zeit gelagert werden. Üblicherweise wird das Kaugummi vom Patienten / Menschen verpackt und an das Labor, welches die DNA-Analyse durchführt, übermittelt.

- 30 In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Kaumasse nach Abschluss des Kauvorgangs tiefgefroren. Dadurch kann der mögliche enzymatischen Abbau von DNA und/oder RNA während der Lagerung bzw. des Transports verhindert werden. Das Tieffrieren der Proben ist insbesondere dann vorteilhaft, wenn RNA isoliert werden soll.

- 35 In einer möglichen Ausführungsform kann das nach einer gewissen Zeit des Kauens vom Probanden gewonnene Kaugummi in einem üblichen Puffer extra lysiert werden, so dass die

DNA und/oder RNA nach üblichen Methoden isoliert, vermehrt (amplifiziert), und schließlich hinsichtlich bestimmter Abschnitte sequenziert werden kann.

Die entsprechenden Sequenzen, auf die es ankommt z.B. SNPs, werden vorab auf Basis wissenschaftlicher Erkenntnisse festgelegt, passend zu dem zu erwartenden Nachweis von Therapiemöglichkeiten, metabolischer Umwandlungsenzyme und deren Gensequenzen.

Zum Beispiel kann die selektive Erkennung bestimmter Gensequenzen im Vordergrund stehen, denn sie enthält den Hinweis auf die im Menschen insbesondere in Patienten typische Ausprägung dieser Merkmale. Das Verfahren zur Isolierung des genetischen Materials, seine Aufreinigung und seine Analyse (individuelle Genomanalyse) zur Untersuchung von Genpolymorphismen ist Gegenstand der Erfindung.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zum Durchführen einer genetischen Analyse, in welcher zunächst Mundschleimhautzellen und/oder –zellfragmente gemäß dem oben beschriebenen Verfahren mittels einer Kaumasse gesammelt werden, die Zellen und/oder Zellfragmente von der Kaumasse abgetrennt und die DNA in an sich bekannter Weise extrahiert wird, in einem nachfolgenden Schritt die DNA analytisch untersucht und die aus der Analyse erhaltenen Ergebnisse ausgewertet werden.

Zur Isolierung von DNA und Lyse von Extrakten sind die üblichen Methoden zur Freisetzung brauchbar, wie Ultraschall, Mörser und Pistill, schütteln sowie Auftaumethoden geeignet. Ferner sind auch kommerzielle Systeme, wie sie von bestimmten Firmen angeboten werden, z.B. Qiagen und HoffmannLa Roche einsetzbar zum Isolieren, Binden und Waschen des Analysematerials. Gegebenenfalls kann auch ein enzymatischer Verdauungsschritt verwendet werden. Zur Analyse von DNA-Sequenzen können Standardmethoden herangezogen werden, die entweder mit Hilfe von entsprechenden Automaten oder auch Biochip-Methoden verfügbar sind. Geeignete Methoden sind dem Fachmann bekannt.

Die aus der DNA-Analyse gewonnenen Ergebnisse finden in den unterschiedlichsten Bereichen der Medizin Anwendung, beispielsweise bei der Bestimmung von krankheitsprädisponierenden genetischen Faktoren, bei der Arzneimitteltherapie, hier insbesondere bei der Optimierung der Auswahl an geeigneten Medikamenten und der Anpassung der geeigneten Dosis, in der Pränataldiagnostik, Transplantationsmedizin und in der medizinischen Forschung, beispielsweise bei der Durchführung von klinischen Studien, in der Forensik, bei genealogischen Untersuchungen und Vaterschaftstests sowie bei nicht

konkret zweckgebundenen Analysen und Untersuchungen des Genoms und/oder Teilen des Genoms, wie bei Lifestyle-Anwendungen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung einer Kaumasse, enthaltend Kaugummi-Base und ggf. weitere wasserlösliche Inhaltsstoffe zum Sammeln von Mundschleimhautzellen und/oder Zellfragmenten.

In einer bevorzugten Ausführungsform enthält die Kaumasse spezifische Primer (Oligonukleotide), mit Hilfe derer selektiv DNA und/oder RNA identifiziert und gewonnen werden kann. Es folgt eine Amplifikation der DNA und/oder RNA mittels bekannter Methoden (z.B. PCR). In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung lässt sich so humane DNA bzw. RNA von nicht-humaner, also z.B. mikrobieller, DNA/RNA unterscheiden und selektiv mit der Kaumasse gewinnen. Dazu können Primer verwendet werden, wie sie in Labuhn et al. (The International Journal of Biological Markers, 2006) aufgeführt sind.

DNA und/oder RNA pathogener Bakterien kann z.B. unter Verwendung von Primern erfolgen, die bekanntermaßen bei der Amplifikation bakterieller DNA eingesetzt werden (z.B. der Sense-Primer CCA GCA GCC GCG GTA ATA CG, der auch im sogenannten Looxster® Verfahren der Firma SIRS-Lab GmbH verwendet wird).

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft ein Arzneimittel-Kit bestehend aus einem Arzneimittel und einer Kaumasse, die zum Sammeln von Mundschleimhautzellen und/oder -zellfragmenten dient.

Das Arzneimittel-Kit ermöglicht es, bei einer bereits abgeschlossenen Diagnose das zu verabreichende Medikament individuell zu dosieren. Die abgetrennten Mundschleimhautzellen und/oder -zellfragmente werden wie oben beschrieben abgetrennt und einer Genanalyse unterworfen, wobei eine individuelle Genexpressionsanalyse zur Therapieoptimierung besonders sinnvoll ist. Hier können insbesondere Untersuchungen zu bestimmten so genannten Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) wichtig sein. So können bestimmte Ausprägungsmuster z.B. von Cytochrom P450 Oxidasen Aufschluss darüber geben, in welchem Maße eine Substanz metabolisiert wird. Im Fall von Tamoxifen kann so anhand von Allelkombinationen, die durch SNP-Analyse gewonnen wird, ermittelt werden, in welchem Umfang Tamoxifen zum aktiven Metaboliten Endoxifen umgebaut wird, und somit, ob eine Arzneimitteltherapie mit Tamoxifen sinnvoll ist, bzw. welcher Dosisbereich sinnvoll ist.

In der beigefügten Figur ist ein Fließdiagramm, in welchem dargestellt wird, auf welche Weise die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren gewonnenen Zellen und Zellfragmente der medizinischen Diagnostik und Therapie zugeführt werden können.

- 5 Üblicherweise existiert für den Patienten oder Menschen, der das erfindungsgemäße Verfahren anwenden soll, bereits eine Diagnose, vielfach ist auch bereits bekannt, mit welchem Medikament die Erkrankung behandelt werden kann. Im vorliegenden Fall wurde dem Patienten Tamoxifen, ein Cytostatikum und Antiestrogen, verordnet. Zu bestimmen ist noch die Dosis des Wirkstoffs, diese hängt von der spezifischen Konstitution des Patienten
- 10 ab. In einem ersten Schritt kauft der Patient den Wirkstoff gemeinsam mit einem Indikatorsystem, welches die erfindungsgemäß verwendete Kaumasse enthält. Der Patient kaut das Kaugummi, um Mundschleimhautzellen und/oder –zellfragmente zu gewinnen. Das Kauen erfolgt nach einer vorgegebenen Zeit, nach Abschluss des Kautvorgangs wird die Kaumasse versiegelt, üblicherweise in einem Kunststoffbehälter. Die versiegelte und mit dem
- 15 Namen versehene Masse wird anschließend an das analysierende Labor geschickt. In dem Labor werden die Zellen und/oder Zellfragmente von der Kaumasse abgetrennt und der Analyse hinsichtlich der spezifischen Eigenschaften der Zellen in Bezug auf den Wirkstoff Tamoxifen. Das Ergebnis dieser Analyse wird vom Labor an den behandelnden Arzt weitergeleitet, der aufgrund des Analyseergebnisses eine individuelle Dosierungsempfehlung
- 20 an den Patienten gibt.

In den nachfolgenden Beispielen sind beispielhafte Rezepturen für geeignete Kaumassen wiedergeben:

Beispiele

5 REZEPTUR 1

Inhaltsstoffe	Dosierung
	Gew %
Gum Base	37.3
Sorbitol Pulver	40.8
Maltit Syrup	6.0
Xylitol Pulver	6.8
Aroma	2.0
Menthol sprühgetrocknet	1.7
Titaniumdioxid	0.5
Acesulfam K	0.1
Aspartam	0.1
Hydroxylapatit	1.5
Aluminiumoxid	0.5
Natriumcitrat	0.3
Siliziumdioxid	2.2
Zimt-Öl	0.2
Total	100.0
Talkum	3.0

REZEPTUR 2

Inhaltsstoffe	Dosierung
	Gew %
Maltitolpulver	11.5
Gum Base	38.7
Sorbitol Pulver	30.1
Maltit Syrup	4.3
Xylitol Pulver	5.5
Aroma	2.0
Menthol sprühgetrocknet	1.7
Acesulfam K	0.2
Aspartam	0.1
Gummi Arabicum	1.5
Lezithin	1.3
Natriumcitrat	0.2
Polysorbat	0.5
Hydroxylapatit	1.2
Aluminiumsilikat	1.0
Zimt-Öl	0.1
Tymian-Öl	0.1
Total	100.0
Talkum	3.0

REZEPTUR 3

Inhaltsstoffe	Dosierung
	Gew %
Maltitolpulver	14.6
Gum Base	38.7
Sorbitol Pulver	26.3
Maltit Syrup	4.3
Xylitol Pulver	5.5
Aroma	2.0
Menthol sprühgetrocknet	1.7
Titaniumdioxide	0.4
Acesulfam K	0.2
Aspartam	0.1
Lezithin	0.1
Polysorbat	0.5
Siliziumdioxid	4.7
Zimt-Öl	0.9
Total	100.0
Talkum	3.0

REZEPTUR 4

Inhaltsstoffe	Dosierung
	Gew %
Gum Base	37.3
Sorbitol Pulver	42.5
Maltit Syrup	5.4
Xylitol Pulver	5.3
Aroma	2.0
Menthol sprühgetrocknet	1.7
Titaniumdioxid	0.1
Acesulfam K	0.1
Aspartam	0.1
Gummi Arabicum	1.0
Lezithin	0.9
Hydroxylapatit	0.5
Siliziumdioxid	2.5
Zimt-Öl	0.3
Tymian-Öl	0.3
Total	100.0
Talkum	3.0

5

REZEPTUR 5

Inhaltsstoffe	Dosierung
	Gew %
Maltitolpulver	16.7
Gum Base	38.7
Sorbitol Pulver	30.9
Maltit Syrup	4.3
Xylitol Pulver	3.8
Aroma	2.0
Menthol sprühgetrocknet	1.7
Titaniumdioxid	0.1
Acesulfam	0.2
Aspartam	0.1
Polysorbat	1.5
Total	100.0
Talkum	3.0

REZEPTUR 6

Inhaltsstoffe	Dosierung
	Gew %
Maltitolpulver	12.0
Gum Base	38.7
Sorbitol Pulver	30.9
Maltit Syrup	4.3
Xylitol Pulver	2.5
Aroma	0.8
Menthol sprühgetrocknet	1.7
Titaniumdioxid	1.0
Acesulfam K	0.2
Aspartam	0.1
Gummi Arabicum	1.0
Lezithin	2.0
Polysorbat	0.0
Siliziumdioxid	4.6
Zimt-Öl	0.1
Tymian-Öl	0.1
Total	100.0
Talkum	3.0

REZEPTUR 7

Inhaltsstoffe	Dosierung
	Gew %
Maltitolpulver	16.0
Gum Base	38.7
Sorbitol Pulver	28.0
Maltit Syrup	4.0
Xylitol Pulver	5.5
Aroma	2.0
Menthol sprühgetrocknet	1.5
Titaniumdioxid	0.0
Acesulfam K	0.2
Aspartam	0.1
Hydroxylapatit	0.8
Siliziumdioxid	2.5
Zimt-Öl	0.5
Tymian-Öl	0.2
Total	100.0
Talkum	3.0

Das eingesetzte Talkum dient dazu, die Kaumassen abzapudern, um das Verkleben der Masse während der Lagerung zu vermeiden.

Beispiele für geeignete Primer:

Für bakterielle DNA: 5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3'

Für DNA von *S. aureus*: 5'-AGATGCACGT ACTGCTGAAA TGAG-3' (offenbart in European Patent Application EP1082465)

Für DNA von *P. aeruginosa*: 5'-CTTCGATGCC CTGAGCGGTA TTC-3' (offenbart in European Patent Application EP1082465)

Für DNA von *E. coli*: 5'-GTTCTGTGCA TATTGATGCC CGCG-3' (offenbart in European Patent Application EP1082465)

Für DNA von *Candida albicans*: 5'-CGCCTCTTGATGGTGATGAT-3' (offenbart in US Patent Number 5,462,026)

Für DNA von Aspergillus spez.: 5'-CGGCCCTTAAATAGCCCGGTC-3' (aus Melchers WJ, et al. J Clin Microbiol 1994)

Für humane DNA: 5'-CTTGCTCTTGGACAGGAACCA-3' (humaner ER α ; aus Labuhn M, et al. Int J Biol Markers, 2006)

5 5'-TGTCGAGCTCACAGCGTTTC-3' (humaner PgR; aus Labuhn M, et al. Int J Biol Markers, 2006)

Patentansprüche

1. Verfahren zum Sammeln von Mundschleimhautzellen und/oder -zellfragmenten von Patienten (Proband/Mensch), in welchem der Mensch oder Patient eine wasserunlösliche, unverdauliche Kaumasse kaut, wobei die Mundschleimhautzellen und/oder DNA und/oder RNA und/oder deren Fragmente während des Kauvorgangs von der Kaumasse aufgenommen werden und die Zellen und/oder Zellfragmente nach Abschluss des Kauvorgangs von der Kaumasse abgetrennt werden können.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die abgetrennten Zellen und/oder Zellfragmente einer DNA und/oder RNA-Extraktion unterworfen werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Kaumasse ausgewählt ist aus Kaugummi oder Bubble-Gum.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Kaumasse ein die Zellen/Zellfragmente stabilisierendes Konservierungsmittel enthält.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Kaumasse einen pH-Puffer, insbesondere Na-Citrat, enthält.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Kaumasse über einen Zeitraum von 30 Sekunden bis 3 Minuten gekaut wird.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Kaumasse einen Farbstoff enthält, welcher nach einer Kauzeit von 0,5 bis 3 Minuten einen Farbwechsel durchläuft.
8. Verfahren zum Gewinnen von DNA und/oder RNA aus Mundschleimhautzellen und/oder -zellfragmenten, in welchem die Person, deren DNA und/oder RNA zu extrahieren ist, eine wasserunlösliche, unverdauliche Kaumasse kaut und nach Abschluss des Kauvorgangs die Zellen und/oder Zellfragmente und/oder DNA und/oder RNA in an sich bekannter Weise isoliert werden.
9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass in die Kaumassen spezifische Oligonukleotide (Primer) integriert sind.

10. Verfahren zum Durchführen einer genetischen Analyse, in welcher zunächst Mundschleimhautzellen und/oder –zellfragmente gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 gesammelt werden, die Zellen von der Kaumasse abgetrennt, der DNA- und/oder RNA-Extraktion unterworfen werden und eine DNA- und/oder RNA-Analyse durchgeführt wird.
- 5
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass eine individuelle Genexpressions-Analyse durchgeführt wird.
- 10
12. Verwendung einer Kaumasse enthaltend Kaugummi-Base und ggf. weitere Inhaltsstoffe zum Sammeln von Mundschleimhautzellen und/oder DNA und/oder RNA und/oder deren Fragmente.
- 15
13. Arzneimittel-Kit, welches ein Arzneimittel und eine Kaumasse, die zum Sammeln von Mundschleimhautzellen und/oder DNA und/oder RNA und/oder deren Fragmente dient, enthält.