

# Biomarker Calretinin für die Diagnose von Mesotheliomen

## Von der Forschung in die Praxis

Georg Johnen und die MoMar-Studiengruppe

Biomarker für die Diagnose von Krebs haben den Vorteil, dass man sie in leicht zugänglichen Körperflüssigkeiten wie Blut mit einfachen Tests nachweisen kann. In der Literatur werden zwar zahlreiche Biomarker als vielversprechend beschrieben, selten aber werden die anfänglichen Ergebnisse bestätigt, insbesondere wenn sie für die Früherkennung einer Krebserkrankung eingesetzt werden sollen. Noch seltener werden die Tests bis zur Marktreife entwickelt oder führen zu einer Anwendung in der Praxis. Der am IPA entwickelte Test für Calretinin, einem Biomarker für Mesotheliome, steht demgegenüber nun kurz vor der Marktreife.

Beruflich bedingte Krebserkrankungen – in der Regel als Folge einer lange zurückliegenden Exposition gegenüber krebserzeugenden Gefahrstoffen – haben an den anerkannten Berufskrankheiten weiterhin einen großen Anteil. Sie sind für über die Hälfte der Berufskrankheiten-bedingten Todesfälle verantwortlich. In der überwiegenden Zahl der Fälle spielt Asbest eine Rolle. Asbestbedingte Lungentumoren und Mesotheliome entstehen meist als Folge einer lange – häufig 30-40 Jahre – zurückliegenden Asbestexpositionen. Trotz Asbestverbot Anfang der 90er Jahre kann es aber auch heute noch zu erhöhten beruflichen Asbestexpositionen von Beschäftigten kommen. Der Grund: nicht immer ist bekannt oder offensichtlich, wo und in welchen Produkten Asbest in der Vergangenheit verwendet wurde. Beispielsweise war laut einer Studie des Bundesministeriums für Arbeit und Soziales Asbest in mehr Bauprodukten enthalten, als bislang angenommen (BMAS 2016). Somit können Beschäftigte auch heute noch insbesondere durch Reparatur-, Renovierungs- und Abrissarbeiten erhöhten beruflichen Expositionen gegenüber Asbest ausgesetzt sein. Zur Früherkennung asbestbedingter Erkrankungen – also zur Sekundärprävention – bieten die Unfallversicherungsträger für exponierte Versicherte bereits seit Anfang der 70er Jahre die nachgehende arbeitsmedizinische Vorsorge an. Bei der Gesundheitsvorsorge der gesetzlichen Unfallversicherungsträger (GVS) sind aktuell rund 560.000 Versicherte gemeldet, die beruflich Umgang mit Asbest hatten oder haben. Davon sind 80.000 Personen für Nachuntersuchungen und 240.000 Personen für die nachgehende Vorsorge vorgemerkt.

### Bedarf an verbesserter Sekundärprävention

Im Rahmen der Sekundärprävention besteht ein Bedarf an minimal-invasiven diagnostischen Methoden zur Früherkennung, die die betroffenen Versicherten wenig belasten, damit die Akzeptanz für die nachgehende Vorsorge gesteigert und gleichzeitig die Sensitivität und Spezifität der Untersuchungsverfahren weiter verbessert wird. Mesotheliome und Lungenkrebs werden derzeit häufig erst in späten Erkrankungsstadien diagnostiziert, so dass die Therapieoptionen eingeschränkt und die mittlere Überlebenszeit nach der Diagnose

vergleichsweise gering sind. Eine rechtzeitige Detektion von Tumoren in früheren Entwicklungsstadien, zusammen mit den gleichzeitig sich verbessernden Therapieoptionen, kann die Erfolgsaussichten einer Krebstherapie erhöhen. In einer Vorstudie des IPA wurde der bislang einzige kommerziell erhältliche Biomarker Mesothelin für Mesotheliome evaluiert. Obwohl Mesothelin in den Untersuchungen eine gute Performance für die Diagnose von Mesotheliomen zeigte, zeichnete sich ab, dass er als einzelner Marker nicht ausreichend für eine Früherkennung sein kann. Für den Einsatz in der nachgehenden Vorsorge ist daher eine Kombination mehrerer Biomarker, ein sogenanntes Marker-Panel, notwendig, um eine hinreichende Sensitivität zu erreichen und Mesotheliome mit hoher Spezifität zu detektieren.

Vor diesem Hintergrund wurde im Jahre 2008 die MoMar-Studie des IPA gestartet. Ihr Ziel: Die Entwicklung und Validierung einer größeren Zahl neuer Biomarker für die Früherkennung von Mesotheliomen und Lungentumoren

### Aufbau der MoMar-Kohorte

Im Fokus von MoMar stehen asbestbedingte Krebserkrankungen wie Mesotheliome und Lungentumoren. Forschungsvorhaben zur Entwicklung von Biomarkern für die Früherkennung von Krebserkrankungen sind meist mit langen Laufzeiten verbunden, da derartige Marker nur in sogenannten prospektiven Kohortenstudien validiert werden können. In MoMar erfolgt über Jahre die vorausschauende (prospektive) Sammlung und Lagerung von Proben in einer Biobank. Die Proben werden in regelmäßigen, jährlichen Abständen von freiwilligen Spendern mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko gewonnen. Bei den Spendern handelt es sich um Versicherte mit einer als Berufskrankheit anerkannten Asbestose oder der durch Asbeststaub verursachte Erkrankungen der Pleura, die zu Beginn der Studienteilnahme nicht an einem Krebs erkrankt sind. Stehen die Proben einer Kohorte erst einmal zur Verfügung, können dann im Nachhinein (retrospektiv) damit Analysen erfolgen. Tritt bei einigen der Spender später eine Krebserkrankung auf, können Proben, die vor der Diagnose der Erkrankung genommen wurden, mit Biomar-

## Kurz gefasst

- Die Latenzzeit für asbestbedingte Lungentumoren und Mesotheliome kann 30 - 40 Jahre betragen. Zur Verbesserung der Erfolgsaussichten bei der Therapie sollten diese Tumoren so früh wie möglich diagnostiziert werden.
- Im Rahmen der Sekundärprävention sind sogenannte Biomarker, die in leicht zugänglichen Körperflüssigkeiten wie Urin oder Blut nachweisbar sind, ein wichtiges Werkzeug für die Diagnostik.
- Im Rahmen der Studie „Molekulare Marker“ konnten am IPA nun verschiedene Biomarker identifiziert werden, dabei hat sich insbesondere das Calretinin als praxistauglich erwiesen und wird demnächst kommerziell erhältlich sein.

kern analysiert und mit entsprechende Kontrollproben von nicht-erkrankten Spendern aus der MoMar-Kohorte verglichen werden. MoMar nutzt dazu das bestehende etablierte System der Nachuntersuchungen, die den Versicherten regelmäßig angeboten werden. Die Untersuchung wird dabei lediglich um das Angebot einer freiwilligen Probennahme und ein Interview mittels Fragebogen erweitert. MoMar wird derzeit in Zusammenarbeit und mit Unterstützung der Berufsgenossenschaften Holz und Metall (BGHM), Rohstoffe und chemische Industrie (BG RCI), Energie Textil Elektro Medienerzeugnisse (BG ETEM), Bauwirtschaft (BG BAU), Handel und Warenlogistik (BGHW) und der Verkehrswirtschaft Post-Logistik Telekommunikation (BG Verkehr) durchgeführt. Die Untersuchungen finden in 25 Arztpraxen und Kliniken im Bundesgebiet statt. Die Blutproben werden zunächst vor Ort zwischengelagert und in regelmäßigen Abständen vom MoMar-Feldteam abgeholt, um dann in der zentralen IPA-Biobank eingelagert zu werden.

### Performance von Biomarkern

Unter Performance versteht man die Fähigkeit eines Biomarkers, eine Erkrankung mit einer bestimmten Sensitivität (Empfindlichkeit: Anteil der korrekt erkannten Krankheitsfälle) und Spezifität (Genauigkeit: Anteil der korrekt erkannten Gesunden) zu erkennen. Beide Größen sind durch die Eigenschaften eines Markers festgelegt, können aber innerhalb bestimmten Gesetzmäßigkeiten variiert werden: sie verhalten sich dabei gegenläufig. Erhöht man beispielsweise die Sensitivität, um möglichst viele Erkrankungen zu erfassen, sinkt entsprechend die Spezifität, es werden also mehr Gesunde fälschlich als krank eingestuft. Ein Marker ist umso besser, je höher sowohl seine Sensitivität als auch Spezifität sind, die er von vornherein mitbringt. Weiterhin spielt die Robustheit eines Markers eine wichtige Rolle. Ein guter Marker und sein Assay sollten stabil sein und sich nur wenig von möglichen Störfaktoren beeinflussen lassen. Diese Faktoren, zusammen mit einer einfachen Handhabbarkeit, tragen auch zur Praxistauglichkeit eines Marker-Assays bei.

Das Längsschnitt-Design der MoMar-Studie, also die zunächst prospektive Sammlung serieller Proben über mehrere Jahre, unterscheidet sich fundamental vom Querschnitt-Design normaler Fall-Kontroll-Studien, die üblicherweise durch die Selektion von bereits diagnostizierten Fällen und häufig nicht passenden Kontrollen verzerrt sind. Letztere sind zwar deutlich leichter und schneller zu implementieren, können aber letztendlich keine Aussagen zur Früherkennung machen, da die hierbei rekrutierten Krebsfälle von Patienten stammen, die bereits mit klinischen Symptomen zum Arzt kommen und daher überwiegend späte Stadien der Tumorentwicklung aufweisen (Johnen & Brüning 2009, Marschall 2013, Pesch et al. 2014, Johnen et al. 2016).

Im Rahmen der MoMar-Kohorte wurden bereits über 2.700 Probanden rekrutiert, die meist wiederholt teilgenommen haben, so dass inzwischen nahezu 11.000 Untersuchungen durchgeführt werden konnten. Im Studienverlauf sind bis dato 29 Mesotheliome und 48 Lungentumoren aufgetreten. Die Untersuchungen werden noch bis Ende Dezember 2017 angeboten. Die ursprünglichen Rekrutierungsziele sind damit bereits jetzt nahezu erreicht.

### Entwicklung des Calretinin-Assays

Parallel zum Aufbau der Kohorte werden im Rahmen der MoMar-Studie kontinuierlich neue Biomarker identifiziert und verifiziert. Dies umfasst auch die Entwicklung und Optimierung von feldtauglichen Testverfahren, so genannten Assays, für diese Biomarker. Die besten Biomarker-Assays sollen dann später mit den Proben der MoMar-Kohorte abschließend validiert werden.

Im Zusammenhang mit MoMar wurde am IPA bereits 2008 damit begonnen, einen Assay auf dem Prinzip eines enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) für das Protein Calretinin zu entwickeln. Der Assay wurde in zahlreichen Plasma-Proben von Mesotheliom-Patienten und passenden Kontrollen aus verschiedenen Ländern im Querschnitt-Design verifiziert. Die vielversprechenden Ergebnisse wurden nicht nur in Proben aus Deutschland und Frankreich (Raiko et al. 2010, Johnen et al. 2011), sondern auch aus Australien und Mexiko bestätigt (Johnen et al. 2017, Aguilar-Madrid et al. 2015). Ob sich diese mit Proben von späten Tumorentwicklungsstadien erzielten Ergebnisse auch unter den Bedingungen der Früherkennung bestätigen lassen, konnte nur mit den Proben aus der MoMar-Kohorte beantwortet werden. Zu diesem Zweck wurde die Performance von Calretinin, Mesothelin und anderer Marker mit den bisher in MoMar gewonnenen Proben evaluiert. Eine erste, vorläufige Zwischenanalyse zeigte ermutigende Resultate: Die Früherkennung von Mesotheliomen mit Biomarkern erscheint möglich, wenn auch die Performance erwartungsgemäß etwas geringer ausfällt als mit den Proben später Tumorstadien. Calretinin war dabei selbst schon als Einzel-Assay in den bisherigen Untersuchungen allen anderen Assays überlegen und profitierte zusätzlich von einer Kombination mit Mesothelin. Dies unterstreicht erneut die Notwendigkeit und Sinnhaftigkeit eines Marker-Panels.

### Calretinin-Assay kurz vor der Marktreife

Das IPA kann als Forschungsinstitut die Entwicklung eines Biomarkers nur bis zu einem bestimmten Punkt vorantreiben. Soll ein Marker-

Assay schließlich in die praktische Anwendung gehen, muss dieser auch für eine große Zahl von Anwendern in einem einfachen Format und gleichbleibender Qualität über längere Zeiträume zur Verfügung gestellt werden. Aufgaben wie qualitätsgesicherte Produktion, Optimierung von Reproduzierbarkeit, Haltbarkeit und anderen Assay-Eigenschaften, Zertifizierung, Zulassung, nationale und internationale Distribution usw. erfordern die Expertise von Unternehmen, die auf die Herstellung und den Vertrieb von Diagnostika spezialisiert sind. Daher wurde vom IPA eine Kooperation mit den Partner-Firmen Wesamin (Entwicklung und Produktion) und DLD Diagnostika (Vertrieb und Marketing) initiiert, um den Calretinin-Assay in Form eines praxistauglichen Kits für den Einsatz zu optimieren und einer breiten Anwendergruppe zugänglich zu machen.

Basierend auf den vom IPA gelieferten Proben und Assay-Komponenten (Antikörper etc.) konnte Wesamin die Spezifität und Sensitivität des Calretinin-ELISAs noch einmal deutlich verbessern. Ohne diese Optimierung wäre die gute Performance, die in der ersten Zwischenauswertung mit den prospektiven MoMar-Proben erzielt worden ist (► Info-Kasten), nicht möglich gewesen. Auch die Stabilität und Haltbarkeit der Calretinin-Kits konnte durch die Weiterentwicklung inzwischen evaluiert und optimiert werden. Derzeit werden noch letzte Tests für die Validierung durchgeführt. Anschließend wird die erste Charge des Assays für den Vertrieb produziert. Der neue Calretinin-Assay wurde im April 2017 auf der Jahrestagung der American Association for Cancer Research (AACR) in Washing-

## Die MoMar-Studiengruppe

Dr. Alexander Brik, Dr. Swaantje Casjens, Bettina Dumont, Katarzyna Gawrych, Dr. Jan Gleichenhagen, Dr. Olaf Hagemeyer, Heike Heimann, Evelyn Heinze, Dr. Georg Johnen, Monika Kobek, Claudia Lechtenfeld, Dr. Martin Lehnert, Svetlana Meier, Carmen Meinig, Simone Naumann, PD Dr. Beate Pesch, Simone Putzke, Irina Raiko, Dr. Hans-Peter Rihs, Peter Rozynek, Sandra Schonefeld, Dr. Dirk Taeger, Dr. Daniel Weber, Dr. Thorsten Wiethage, Sandra Zilch-Schöneweis, Prof. Dr. Thomas Brüning

ton D.C., USA, vorgestellt und dann voraussichtlich kurzfristig am Markt verfügbar sein.

Aufgrund der bereits vorliegenden Ergebnisse lässt sich schon jetzt absehen, dass die MoMar Studie mit der Entwicklung des demnächst erhältlichen Markers einen wesentlichen Beitrag für die Sekundärprävention geleistet hat. Die angewandte Biomarker-Forschung hat hier erfreulicherweise zu praxisrelevanten und alltagstauglichen Ergebnissen geführt, die langfristig gesehen auch zu einer Verbesserung der Lebensqualität der Betroffenen führen kann.

Der Autor  
**Dr. Georg Johnen**  
IPA

## Literatur

1. Bundesministerium für Arbeit und Soziales. Factsheet „Asbest in Bauprodukten“. Download über: <http://www.bmas.de/DE/Presse/Meldungen/2016/asbestdialog.html>
2. Johnen G, Brüning T: MoMar – Molekulare Marker zur Krebsfrüherkennung – Feldphase des BGFA-Projekts erfolgreich gestartet. BGFA-Info 2009; 01: 24-25
3. Johnen G, Raiko I, Sander I, Weber DG, Raulf-Heimsoth M, Kollmeier J, Gillissen A, Scherpereel A, Müller KM, Brüning T. Calretinin – ein vielversprechender Biomarker für die Bestimmung von Mesotheliomen in Blutproben von Asbest-Exponierten. IPA-Journal 2011; 02: 22-25
4. Johnen G, Weber D, MoMar-Studiengruppe. Molekulare Marker für die Krebsfrüherkennung – Zwischenstand der MoMar-Studie. IPA-Journal 2016; 02: 20-23
5. Johnen G, Creaney J, Gawrych K, Raiko I, Casjens S, Pesch B, Weber DG, Taeger D, Lehnert M, Kollmeier J, Bauer TT, Musk AW, Robinson BWS, Brüning T. Calretinin – Verifizierung eines minimal-invasiven Biomarkers für die Diagnose von Mesotheliomen. In: DGAUM (Hrsg.): 57. Wissenschaftliche Jahrestagung 2017, Gentner, Stuttgart 2017: 127
6. Johnen G, Gawrych K, Raiko I, Casjens S, Pesch B, Weber DG, Taeger D, Lehnert M, Kollmeier J, Bauer TT, Musk AW, Robinson BWS, Brüning T, Creaney J. Calretinin as a biomarker for mesothelioma – a case-control study. 13th International Symposium on Malignant Mesothelioma, 27.-29.03.2017, Bethesda, MD, USA
7. Marschall V. „Asbest wird uns noch lange begleiten“ – Projekt MoMar untersucht über 2.000 Versicherte mit anerkannter BK 4103. IPA-Journal 2013; 03: 24-26
8. Pesch B, Brüning T, Johnen G, Casjens S, Bonberg N, Taeger D, Müller A, Weber DG, Behrens T. Biomarker research with prospective study designs for the early detection of cancer. Biochim Biophys Acta 2014; 1844: 874-883
9. Raiko I, Sander I, Weber DG, Raulf-Heimsoth M, Gillissen A, Kollmeier J, Scherpereel A, Brüning T, Johnen G. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of human calretinin in plasma and serum of mesothelioma patients. BMC Cancer 2010; 10: 242