



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 601 25 065 T2 2007.06.28**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 352 089 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **601 25 065.6**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US01/26452**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **01 968 105.5**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2002/018649**

(86) PCT-Anmeldetag: **24.08.2001**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **07.03.2002**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **15.10.2003**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **06.12.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **28.06.2007**

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

**C12P 19/34 (2006.01)**

**C07H 21/04 (2006.01)**

(30) Unionspriorität:

**228057 P 25.08.2000 US**

(73) Patentinhaber:

**Lovelace Respiratory Research Institute,  
Albuquerque, N. Mex., US**

(74) Vertreter:

**derzeit kein Vertreter bestellt**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR**

(72) Erfinder:

**BELINSKY, A., Steven, Albuquerque, NM 87112,  
US; PALMISANO, A., William, Edgewood, NM  
87015, US**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR KREBSDETEKTION MITTELS VERSCHACHELTER ("NESTED") METHYLIERUNGSSPEZIFISCHER PCR**

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

### Hintergrund der Erfindung

#### Gebiet der Erfindung:

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft Krebsdetektion, besonders ein Verfahren zum Nachweisen des Vorliegens von genspezifischer Promotormethylierung in Tumorzellen mittels methylierungsspezifischer Polymerase-Kettenreaktion und spezieller ein Verfahren zum Amplifizieren des Gens, das bei einem bestimmten Krebs verändert sein kann, mittels verschachtelter („nested“), zweistufiger Polymerase-Kettenreaktion, womit die Detektion und Überwachung von Krebs durch Nachweisen von Geninaktivierung in biologischen Flüssigkeiten wie zum Beispiel Sputum und Blut ermöglicht wird. Die Erfindung kann auch auf dem Gebiet der Pharmakogenetik Anwendung finden.

#### Bisheriger Stand der Technik:

**[0002]** Krebs ist in den Vereinigten Staaten eine der führenden Todesursachen. Die hohe Sterblichkeit, die aus dieser Krankheit resultiert, hat ihre Ursache darin, dass man in vielen Fällen nicht in der Lage ist, den Krebs in einem Stadium, in dem er chirurgisch entfernt werden kann und noch nicht in andere Regionen des Körpers metastasiert hat, zu erkennen. Die derzeitigen Strahlen- und Chemotherapien führen oft zu einer Remission der Krankheit, aber tatsächliche Heilungen (Langzeitüberleben) sind bei Krebs im fortgeschrittenen Stadium selten. Die 5-Jahres-Überlebensrate für Malignome, die ohne Hinweis auf eine Fernmanifestation der Erkrankung chirurgisch entfernt werden, beträgt jedoch 60% bis 80%. Die Entwicklung von Biomarkern, die zur frühen Detektion, zum Beobachten der Therapie und zum Vorhersagen des Ausgangs der Erkrankung verwendbar sind, könnte beim Umgang mit Krebs und beim Verbessern der Langzeit-Überlebensrate eine große Hilfe sein.

**[0003]** Untersuchungen zur Chemoprävention an Individuen, die aktuell frei von Krebs sind oder es früher waren, waren auf die Wirkung definierter Interventionen auf zytologische und genetische Veränderungen von Bronchialepithel, das mittels Biopsie gewonnen wurde, konzentriert. Dieser Ansatz beruht auf der Tatsache, dass nahezu der gesamte untere Respirationstrakt Karzinogenen, die mit Zigarettenrauch inhaliert werden, ausgesetzt ist. Die sich daraus ergebende „Feldkanzerisierung“ führt zur Erzeugung multipler Stellen, an denen unabhängig voneinander die Krankheit ausgelöst wird, überall in den Lungen von Personen mit einer langen Raucher-Vorgeschichte. Überall im Bronchialbaum wurden zytologische und genetische Veränderungen nachgewiesen. Viele der genetischen Veränderungen, die im Bronchialepithel nachgewiesen wurden, können ei-

nen begrenzten Nutzwert zum Beurteilen des Risikos für Lungenkrebs und der Reaktion auf interventionelle Therapie haben. Zum Beispiel haben Untersuchungen auf den Verlust von Heterozygotität (LOH, „loss of heterozygosity“) in zytologisch normalem Gewebe eine begrenzte Sensitivität und recht häufig werden Personen in Bezug auf den Mikrosatelliten-Marker, der zum Beurteilen von LOH an einem speziellen chromosomalen Lokus verwendet wird, nicht aufschlussreich sein. Weiterhin treten einige LOH-Veränderungen bei früheren Rauchern weniger häufig als bei gegenwärtigen Rauchern auf, was nahelegt, dass sie mehr mit der Exposition verbunden sind. Zusätzlich wird die Durchführung von Präventionsuntersuchungen, die auf großen Probandenzahlen beruhen, die Verwendung biologischer Flüssigkeiten wie zum Beispiel Sputum, die auf nicht invasive Art gewonnen werden können, zum Überwachen der Reaktion auf Arzneimittel erforderlich machen. Weder Untersuchungsverfahren, die auf Polymerase-Kettenreaktion beruhen, noch solche, die auf Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) beruhen, haben die Sensitivität, um LOH im Sputum zu erfassen. Derzeit liegen keine umfangreichen Daten über Methylierung im Bronchialepithel entweder bei Personen mit vorherrschendem Lungenkrebs oder bei Rauchern, die frei von Krebs sind, vor. Weiterhin wurde die Wirkung des Einstellens des Rauchens auf diese Marker nicht ausgewertet.

**[0004]** Die Entwicklung von Krebs ist mit der Inaktivierung von vielen verschiedenen Arten von Genen in einer Zelle verbunden. Es ist diese Inaktivierung, die im Wesentlichen dafür verantwortlich ist, dass eine normale Zelle zu einer Tumorzelle wird. Eine Art der Geninaktivierung, die bei Krebs häufig vorkommt, wird Methylierung von CpG-Inseln von Promotoren von Genen genannt. Dieser Prozess ist mit einer Veränderung in dem Teil des Gens, dem Promotor, der für die Aufrechterhaltung seiner Aktivität verantwortlich ist, verbunden. Die Methylierung von CpG-Inseln ist für die Inaktivierung von vielen verschiedenen zellulären Genen verantwortlich.

**[0005]** Weil gegenwärtige und auch frühere Zigarettenraucher vermehrte Bronchialsekretionen, die abgeschilferte Zellen aus dem Bronchialbaum enthalten, haben, war die Untersuchung des Sputums dieser Individuen ein Forschungsgebiet für die Entwicklung von Markern. Der verstorbene Dr. Geno Saccomanno zeigte, dass prä maligne zytologische Veränderungen einige Jahre vor einer klinischen Diagnose von Lungenkrebs bei Hochrisikopersonen nachgewiesen werden können. Unglücklicherweise waren diese Studien schwer zu reproduzieren, höchstwahrscheinlich wegen der Kenntnisse, die zum Erkennen der subtilen Veränderungen in den Kernen der Zellen, die oft weniger als 5% des Objektträgers mit dem Sputum umfassen, erforderlich sind. Nachfolgende Studien ließen darauf schließen, dass molekulare

Untersuchungsverfahren verwendet werden könnten, um die Vorhersagekraft von Sputumproben zu verbessern. In Sputumproben, die vor der Tumorsektion gewonnen worden waren, wurden Mutationen im K-ras-Gen nachgewiesen; in Primärtumoren und entsprechenden Sputumproben wurden identische Veränderungen bei den Mikrosatelliten nachgewiesen. Jedoch fehlt es den bekannten Verfahren zum Nachweisen von beiden Veränderungen an Sensitivität und die gesamte Verbreitung dieser Veränderungen beim nicht kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC) beträgt weniger als 25%.

**[0006]** Kürzlich entwickelten Dr. James Herman und Dr. Stephen Baylin ein Verfahren, genannt methylierungsspezifische Polymerase-Kettenreaktion (MSP), um das Vorliegen genspezifischer Promotormethylierung in Tumorzellen nachzuweisen. Dieses Verfahren ist in den U.S. Patenten Nr. 5.786.146 an Baylin et al. und 6.017.704 an Herman et al. beschrieben. Mit der Methode der MSP ist es möglich, eine Kopie eines bestimmten, methylierten Gens vor einem Hintergrund von 1.000 unmethylierten Genkopien auszumachen. Dieser Ansatz ist zum Detektieren bestimmter methylierter Gene in Primärtumoren nützlich, hat aber einen extrem eingeschränkten Nutzwert beim Nachweisen von Geninaktivierung in biologischen Flüssigkeiten wie zum Beispiel Sputum, Plasma, Urin und Stuhl. Das Untersuchen biologischer Flüssigkeiten stellt den am wenigsten invasiven und wirtschaftlichsten Ansatz für ein Screening-Verfahren auf Basis der Bevölkerung dar. Weil diese Flüssigkeiten DNA oder Zellen, bei denen es sich hauptsächlich um normale Zellen handelt, enthalten, ist eine gesteigerte Sensitivität des Verfahrens der MSP unverzichtbar, um das Vorliegen von Tumorzellen nachzuweisen.

**[0007]** Angesichts des voranstehenden Hintergrunds wurde die vorliegende Erfindung entwickelt. US 5.843.649 (1. Dezember 1998) offenbart ein Verfahren zum Identifizieren klonaler Zellproben unter Verwendung von Bereichen zur Heteroduplex-Bildung. Esteller M et al. (1999), *Canc. Res.*, vol. 59, pp. 67–70 offenbaren den Nachweis aberranter Hypermethylierung von Promotoren von Tumor-Suppressorgenen in Serum-DNA von Patienten mit nicht kleinzelligem Lungenkarzinom. Sanchez-Cespedes M et al. (2000), vol. 60, pp. 892–895 offenbaren eine Hypermethylierung von Genpromotoren in Tumoren und Serum von Patienten mit Krebs an Kopf und Hals. Dammann R et al. (Juli 2000), vol. 25, pp. 315–319 offenbaren eine epigenetische Inaktivierung eines Proteins der „RAS association domain family“ aus dem Lungentumor-Suppressorlokus 3p21.3. Masami S et al. (1998), *Human Genetics*, vol. 103, Nr. 1, pp. 96–101 offenbaren, dass das Gen für H-Cadherin (CDH13) bei Lungenkrebs beim Men-

schen inaktiviert ist.

Virmani AK et al. (16. August 2000), *J. Natl. Canc. Instit.*, vol. 92, pp. 1303–7 offenbaren eine Promotormethylierung und Stilllegung des Gens für den Retinolsäure-Rezeptor  $\beta$  bei Lungenkarzinomen. Hisashi T et al. (1998), *Canc. Res.*, vol. 58, Nr. 15, pp. 3429–3434 offenbaren, dass bei Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus eine Methylierung der 5' CpG-Insel des FHIT-Gens eng mit einer Inaktivierung auf der Ebene der Transkription verbunden ist.

Zusammenfassung der Erfindung (Offenbarung der Erfindung)

**[0008]** Allgemein beschrieben besteht die Erfindung in einem Verfahren einer verschachtelten („nested“), zweistufigen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Überwachen und/oder frühen Nachweisen von Krebs. Der Erfindung wird durch den anhängenden Anspruchssatz definiert. Das Verfahren vergrößert erst die Zahl der Kopien eines bestimmten Gens durch Verwendung der PCR, um das Gen, das bei einem bestimmten Krebs verändert sein kann, zu amplifizieren. Diese Amplifikation schließt den Teil des Gens, in dem sich die Promotormethylierung befindet, ein. An diesem Punkt wird eine Teilprobe des Amplifikationsprodukts des bestimmten Gens, das durch die erste PCR geschaffen wurde, in einer zweiten PCR verwendet. Die zweite PCR ist methylierungsspezifisch und kann die methylierungsspezifische Verfahrenstechnik aus U.S. Patent Nr. 6.017.704 verwenden, um das Vorliegen oder Fehlen einer Inaktivierung für dieses bestimmte Gen nachzuweisen. Durch Einsatz dieses erfinderischen, verschachtelten, zweistufigen MSP-Verfahrens wird die Empfindlichkeit zum Nachweisen von Methylierung um das 50-Fache gesteigert, um einen praktischen Nutzwert zu bieten. Das erfinderische Verfahren wurde erfolgreich zum Nachweisen von Krebs mittels Überwachung des Sputums angewendet.

**[0009]** Zwei der Gene, die bewertet wurden, sind das Gen für p16 und das Gen für die O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT). Beide werden durch Methylierung von CpG-Inseln ihrer Promotoren inaktiviert. Eine „CpG-Insel“ ist ein DNA-Strang, dessen Länge von etwa 200 bis etwa 1000 Basenpaare reichen kann, mit einem durchschnittlichen Prozentsatz von mehr als 50% von G + C und einem Verhältnis von beobachteten/erwarteten CpG von mehr als 0,6. Aus biologischen Flüssigkeiten wie zum Beispiel Sputum oder Plasma isolierte DNA-Moleküle werden einer Bisulfidmodifikation ausgesetzt und es wird eine PCR durchgeführt, um ein Fragment von 280 Basenpaaren und ein Fragment von 289 Basenpaaren des Gens für p16 beziehungsweise des Gens für MGMT einschließlich eines Teils ihrer CpG-reichen Promotorregion zu amplifizieren. „CpG-reich“ bedeutet, dass der Abstand von Abfolgen von Cytosin-Guanosin enger als normalerweise erwartet ist. Dieser erste

Schritt des Verfahrens ist von zentraler Bedeutung für die gesteigerte Empfindlichkeit für die erfinderische Prozedur. Spezielle PCR-Primer (kurze Sequenzen von DNA-Basen, die zu einem bestimmten Gen wie p16 komplementär sind) werden konstruiert, um die Genfragmente mittels PCR zu amplifizieren. Nach dieser Amplifikation wird eine Teilprobe der PCR-Produkte, die erzeugt werden und Fragmente von Genen für p16 oder MGMT enthalten, einer zweiten PCR unterzogen. Primer, die für Bereiche von methylierter DNA (nur methylierte Genfragmente werden erkannt – dies ist der Schritt der MSP) spezifisch sind, werden eingesetzt, um festzustellen, ob der Promotor des Gens (p16 oder MGMT) methyliert ist. Wenn ein Promotor eines Gens methyliert ist, wird angenommen, dass es zur Inaktivierung kommt.

Kurze Beschreibung der Abbildungen:

**[0010]** Die beiliegenden Abbildungen, die in die Beschreibung einbezogen sind und einen Teil davon bilden, veranschaulichen mehrere Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung und dienen zusammen mit der Beschreibung dazu, die Prinzipien der Erfindung zu erläutern. Die Abbildungen sind nur zum Zweck der Veranschaulichung einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung vorgesehen und sind nicht als eine Einschränkung der Erfindung auszulegen. In den Figuren:

**[0011]** **Fig. 1** ist eine Tabelle, welche die Methylierung von Genen für p16 und MGMT in Tumor/Sputum-Paaren zum Zeitpunkt der Diagnose darlegt. In der Tabelle ist Tob die Abkürzung für Tabak, SCC ist die Abkürzung für Plattenepithelkarzinom („squamous cell carcinoma“), M ist die Abkürzung für methyliert, U ist die Abkürzung für unmethyliert und Mod. Dyspl. ist die Abkürzung für mäßige Dysplasie.

**[0012]** **Fig. 2** ist eine Tabelle, welche die Methylierung der Gene für p16 und MGMT im Sputum vor der klinischen Diagnose eines Plattenepithelkarzinoms darlegt. In der Tabelle ist Tob die Abkürzung für Tabak, SCC ist die Abkürzung für Plattenepithelkarzinom („squamous cell carcinoma“), M ist die Abkürzung für methyliert, U ist die Abkürzung für unmethyliert, CIS ist die Abkürzung für Carcinoma in situ, Dyspl. ist die Abkürzung für Dysplasie und verdächtig bedeutet verdächtig auf Malignität.

**[0013]** **Fig. 3** ist eine Graphik, die zeigt, dass die Methylierung von p16 und MGMT im Sputum Biomarker für ein Plattenepithelkarzinom darstellt, und die Ergebnisse der PCR der zweiten Stufe, die methylierungsspezifische Primer für die Gene für p16 und MGMT verwendet, darstellt. Sputum (Proben Monate vor dem Krebs gewonnen) und primäres Plattenepithelkarzinom (SCC) (Zeitpunkt null) werden für fünf Fälle gezeigt. Das Vorliegen von PCR-Produkten von 145 bp und 83 bp zeigt an, dass das Sputum oder der

Tumor positiv für Methylierung von p16 beziehungsweise MGMT war. Die Zelllinien CaLu6 und SkuLul stellen positive Kontrollen für die Methylierung von p16 und MGMT dar und normales Lungengewebe diente als negative Kontrolle. Die Sputumzytologie wechselte von Fall zu Fall und wird für jede Probe angegeben.

**[0014]** **Fig. 4** ist ein Diagramm, das die Prävalenz der Methylierung von p16 und MGMT in Sputum von Personen, die frei von Krebs sind, zeigt. Die Häufigkeit der Methylierung von p16 und MGMT im Sputum bei Personen, die frei von Krebs sind, wird als Prozentsatz angegeben. Über den Balken ist die Gesamtzahl positiver Proben je Stichprobenpopulation angegeben.

**[0015]** **Fig. 5** ist eine Tabelle, welche die Gene, die methylierungsspezifischen Primer für die Polymerase-Kettenreaktion und die Anlagerungstemperaturen (°C), die eingesetzt wurden, um gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung die Reaktion der ersten Stufe ablaufen zu lassen, darlegt.

**[0016]** **Fig. 6** ist eine Tabelle, welche die Gene, die methylierungsspezifischen Primer für die Polymerase-Kettenreaktion und die Anlagerungstemperaturen (°C), die eingesetzt wurden, um gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung die Reaktion der zweiten Stufe ablaufen zu lassen, darlegt.

**[0017]** **Fig. 7** ist eine graphische Darstellung einer CaLu6-Zelllinie, die ein methyliertes Gen für p16 enthält, und veranschaulicht die drastisch gesteigerte Empfindlichkeit des Verfahrens der methylierungsspezifischen Polymerase-Kettenreaktion der Erfindung zum Nachweisen von Methylierung des Gens für p16. In den Bahnen 1–5 sind die Ergebnisse der PCR der zweiten Stufe mit methylierungsspezifischen Primern dargestellt. Das PCR-Produkt, das Methylierung anzeigt, wird in DNA, die bis 50.000fach mit normaler DNA verdünnt ist, leicht erkannt (Bahnen 1–5).

**[0018]** **Fig. 8** ist eine Tabelle, die ausgewählte demographische Variablen nach Untersuchungsgruppe von Fällen und Kontrollen, die an einer beispielhaften, die Erfindung anschaulich machenden Untersuchung beteiligt waren, zusammenfasst.

**[0019]** **Fig. 9** stellt Methylierung des Gens für p16 in bronchialen Epithelzellen und entsprechendem Sputum dar. Es werden charakteristische Szenarien zum Nachweis von Methylierung in Bronchialepithelzellen und Sputum von fünf verschiedenen Kontrollen, die an einer beispielhaften, die Erfindung anschaulich machenden Untersuchung beteiligt waren, gezeigt.

**[0020]** **Fig. 10** ist ein Diagramm, das die Zahl der positiven (nach Häufigkeit der Methylierung) Stellen

im Bronchialepithel je Person, die an einer beispielhaften, die Erfindung anschaulich machenden Untersuchung beteiligt war, zeigt.

**[0021]** [Fig. 11](#) ist ein Diagramm, das die relative Häufigkeit der Methylierung für das Gen für p16, das Gen für DAP-Kinase, das Gen für MGMT und für das Gen für RASSF1A in beispielhaften, die Erfindung anschaulich machenden Untersuchungen zeigt.

**[0022]** [Fig. 12](#) ist ein Diagramm, das Sputumproben nach der Häufigkeit der Methylierung und der Zahl der Personen in beispielhaften, die Erfindung anschaulich machenden Untersuchungen vergleicht.

Beschreibung der bevorzugten Ausführungsformen

(Beste Arten für das Ausführen der Erfindung)

**[0023]** Lungenkrebs ist die führende Ursache für krebisbedingten Tod in den Vereinigten Staaten und es wird hochgerechnet, dass er während des 21. Jahrhunderts in der Welt epidemische Ausmaße erreichen wird. Die aus dieser Krankheit resultierende Mortalität könnte in großem Ausmaß durch die Entwicklung molekularer Marker, die Individuen im frühesten Stadium von Lungenkrebs, wenn eine kurative Resektion möglich ist, identifizieren, vermindert werden. In Frage kommende Biomarker sollten eine hohe Sensitivität und Spezifität haben, und im Lauf der Krankheit ausreichend früh auftreten, damit eine medizinische Intervention die Prognose verbessert. Schließlich müssen die Marker in biologischer Flüssigkeit, die nichtinvasiv gewonnen werden kann, vorliegen und so ihre Gewinnung für eine an der Bevölkerung ausgerichtete Durchuntersuchung möglich machen.

**[0024]** Die vorliegende Erfindung stellt ein auf molekularer Ebene beruhendes Markerverfahren zum frühen Nachweis von Krebs beim Menschen, speziell von Lungenkrebs, bereit. Das erfinderische Verfahren umfasst den Nachweis von Genpromotorregionen, die in Tumoren von Menschen in aberranter Weise hypermethyliert sind. Diese Veränderung ist mit einer epigenetisch vermittelten Stilllegung von Genen, die für den Verlust der Funktion von Tumorsuppressorgenen bei Krebs eine Alternative zu Mutationen in codierenden Region darstellt, verbunden. Die Anmelder haben festgestellt, dass aberrante Promotormethylierung des Tumorsuppressorgens P16 INK4a (p16), das eine Schlüsselrolle bei der Regulation des Zellzyklus spielt, ein frühes und sehr häufiges Ereignis beim Plattenepithelkarzinom (SCC) der Lunge darstellt. Ein anderes Gen, das beim nicht kleinzelligen Lungenkarzinom beim Menschen häufig durch aberrante Promotormethylierung inaktiviert wird, ist O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT). MGMT ist ein Reparaturenzym für DNA, das Zellen vor den karzinogenen Wirkungen alkylie-

render Agenzien schützt, indem es Addukte von der O6-Position von Guanin entfernt. Somit sind die Gene für p16 und MGMT aussichtsreiche Kandidaten für Biomarker für den frühen Nachweis von Lungenkrebs.

**[0025]** Es unterstützt die erfinderische Methodik für die Überwachung und die frühe Krebsdiagnose, dass die aberrante Methylierung der Promotorregion von p16 in DNA aus abgeschilferten Zellen im Sputum von Patienten mit dieser Krankheit nachgewiesen werden kann. Erfindungsgemäß wurde aberrante Methylierung des Promotors des Gens für p16 im Sputum von drei von sieben Patienten mit Lungenkrebs und von fünf von 26 Individuen, die frei von Krebs waren, aber ein hohes Risiko trugen, nachgewiesen. Die vorliegende Erfindung umfasst eine Modifikation der anfänglich verwendeten methylierungsspezifischen Polymerase-Kettenreaktion (PCR), um eine noch höhere Wirksamkeit der Detektion zu erreichen. Die Erfindung hat einen Nutzwert für Überwachungszwecke ungeachtet des physiologischen Zustands der Zelle (zum Beispiel Prä malignität) und auch ungeachtet der genauen Lage des methylierten Gens. Somit wird das erfinderische Verfahren so eingesetzt, dass es sich nicht nur auf den Promotor von p16 erstreckt, sondern auch, um den Methylierungszustand einer ähnlichen Region von MGMT oder anderen speziellen und besonderen Genen, die durch Erkrankungen wie zum Beispiel Krebs verändert werden können, zu untersuchen. Aberrante Methylierung von einer dieser beiden Promotorregionen wurde im Sputum von 100% der Patienten mit nachgewiesenem SCC nicht nur zum Zeitpunkt der Diagnose, sondern auch in allen Sputumproben, die von den Patienten fünf bis 35 Monate vor dem klinischen Nachweis des Tumors gewonnen wurden, nachgewiesen. Weiterhin wurden diese Marker im Sputum in einer Untergruppe von Individuen, die frei von Krebs waren, aber ein sehr hohes Risiko für die Entwicklung von Lungentumoren trugen, nachgewiesen. Der Nachweis aberranter Methylierung von Promotorregionen spielt beim erfinderischen Ansatz zum Verwenden von auf DNA beruhenden Markern zum frühen Nachweis von Lungenkrebs und anderen verbreiteten Krebsarten beim Menschen eine zentrale Rolle.

**[0026]** Die Anmelder haben verschiedene Biomarker mit einem hohen Leistungsvermögen für den frühen Nachweis eines verbreiteten, nicht vererbten Krebses identifiziert. Unter Verwendung von zwei Markern, die in nicht kleinzelligen Lungentumoren häufig sind, wurde eine perfekte Registrierung zum Nachweis einer Abnormalität der Methylierung von DNA im Sputum bis zu drei Jahre vor der klinischen Diagnose eines SCC in einer Patientengruppe erreicht. Mit diesen beiden Biomarkern wurden 100% der SCC auch durch Untersuchung des Sputums, das zum Zeitpunkt der klinischen Diagnose gewonnen wurde, entdeckt. Diese Schlussfolgerung wird

von dem Befund der Anmelder einer Methylierung von p16 und MGMT bei Individuen, die frei von Krebs sind und unter hohem Risiko stehen, bei Prävalenzen, die sich einem lebenslangen Risiko für Lungenkrebs annähern, unterstützt. Somit stellt aberrante Genmethylierung einen nützlichen molekularen Marker als Ansatz zu einer auf der Bevölkerung basierenden Durchuntersuchung zum Nachweisen von Lungenkrebs und zum Überwachen der Wirksamkeit chemoprotektiver Wirkstoffe dar. Weiterhin waren bei diesen Individuen die Sputumproben bei beiden Patienten in dieser Kohorte, die bis jetzt SCC entwickelten, positiv.

**[0027]** Der erfinderische Ansatz der Biomarker verstärkt auch die Empfindlichkeit und Genauigkeit anderer diagnostischer Methoden für Lungenkrebs, die derzeit große Aufmerksamkeit erfahren. Zum Beispiel kann das Bildgebungsverfahren der Spiral-Computertomographie (Spiral-CT) sehr kleine periphere Lungenkarzinome nachweisen, wo routinemäßige Röntgenuntersuchungen des Brustkorbs negativ sind. Jedoch sind hinsichtlich des tatsächlichen Vorliegens eines Lungenkarzinoms viele falsch positive Ergebnisse die Regel und effektive Nachweisraten von Krebs unter Verwendung des Spiral-CT betragen derzeit 0,3% bis 0,48%. Diese bildgebende diagnostische Methode kann verbessert werden, indem sie erfindungsgemäß mit der Bestimmung der Biomarker für Hypermethylierung im Sputum kombiniert wird.

**[0028]** Patienten mit einer Erkrankung im Stadium I oder II haben eine 5-Jahres-Heilungsrate von 60% bis 80%, wohingegen Patienten im Stadium III eine mittlere Überlebenszeit von 13 Monaten haben. Lungenkrebsraten könnten durch die Entwicklung einer kostengünstigen Methode zum Durchuntersuchen gemäß der Erfindung verringert werden. Schlüssel zu jedem Ansatz zum Durchuntersuchen ist die Identifizierung von Markern für Lungenkrebs, der durch empfindliche und spezifische diagnostische Untersuchungen nachgewiesen werden kann. Es ist klar, dass eine Mutation der Gene für K-ras und p53 und Instabilität von Mikrosatelliten Veränderungen, die für die Karzinogenese in den Lungen von Bedeutung sind, darstellen. Jedoch weisen derzeitige Verfahren zum Untersuchen der Konkordanz des Nachweisens dieser Veränderungen in der bronchoalveolären Spülflüssigkeit von Patienten mit einem Lungenkrebs im frühen Stadium eine beschränkte Empfindlichkeit auf.

**[0029]** Das erfinderische Verfahren stellt gegenüber allen früheren Bemühungen eine Verbesserung dar, indem es eine verschachtelte, zweistufige PCR-Methode, die in hohem Maße empfindlich (ein methyliertes Allel unter > 50.000 unmethylierten Allelen) ist, einführt. Aufgrund inhärenter Schwierigkeiten (zum Beispiel Abbau von DNA) beim Untersuchen auf Me-

thylierung von DNA, die aus fixierten Geweben gewonnen wurde, haben frühere Versuche und Untersuchungen die tatsächliche Häufigkeit von Methylierung wahrscheinlich unterschätzt. Bei der Entwicklung der Erfindung haben die Anmelder eine starke Korrelation zwischen dem Verlust der Expression sowohl von p16 als auch von MGMT und Methylierung beobachtet.

**[0030]** Die vorliegende Erfindung trägt auch den Nachweis von mindestens einem Methylierungsmarker sowohl im Sputum als auch im entsprechenden Tumor eines jeden Patienten zum Zeitpunkt der Tumordiagnose oder innerhalb von 3 Jahren vor der Tumordiagnose bei. Dies kontrastiert mit der früheren Untersuchung der Anmelder, in der bei Verwendung von lediglich der einstufigen PCR-Methode eine Methylierung von p16 im Sputum von 43% der Fälle mit Lungenkrebs nachgewiesen wurde (Belinski, S. A. et al., „Aberrant methylation of p16 is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis.“ Proc. Natl. Acad. Sciences (USA), 95: 11891–11896 (1998). Es gab einige Fälle, bei denen nicht übereinstimmende Befunde für einen der beiden Marker vorlagen. In jedem Fall gewährleistete der andere Marker, dass eine positive Veränderung im Sputum mit dem Vorliegen von Krebs oder mit der Entwicklung von Krebs innerhalb von drei Jahren oder weniger korrelierte.

**[0031]** Es gibt mögliche Erklärungen für die Fälle, bei denen ein positiver Marker im Sputum, aber nicht im entsprechenden Tumor gefunden wurde. Erstens kann das Vorliegen einer Hypermethylierung eines Promotors für ein bestimmtes Gen innerhalb eines Tumors heterogen sein, und dann würde die Proben-gewinnung darüber entscheiden, ob sie nachgewiesen wird oder nicht. Zweitens kann der Krebs innerhalb von einem ausgedehnten Prozess von Veränderungen des Bronchialepithels oder von sogenannter „Feldkanzerisierung“, in der Zellen ein hohes Risiko für maligne Transformation haben, entstehen. Die Anmelder haben Methylierung von p16 in nicht malignen Bronchialepithelzellen aus verschiedenen Lungenlappen desselben Patienten mit einem umschriebenen Lungenkarzinom nachgewiesen und solche Zellpopulationen unter hohem Risiko konnten abgeschilferte Zellen, die einen Marker für Hypermethylierung tragen, zum Sputum beisteuern. Unter Bezugnahme auf [Fig. 2](#) und besonders auf die Fälle 10 und 11 daraus kann der Befund, dass Methylierung von MGMT in zwei Sputumproben, die 3 Jahre vor der klinischen Diagnose gewonnen worden waren, nicht vorlag, mit dem Zeitpunkt der Inaktivierung dieses Gens in diesen Tumoren verbunden sein. In ähnlicher Weise wurde unter Bezugnahme auf [Fig. 1](#) (Fall 6) Methylierung von MGMT in der Sputumprobe, die 15 Monate vor dem Krebs gewonnen worden war, nicht nachgewiesen, lag aber bei 9 Monaten vor.

**[0032]** Bei Krebs ist die Inaktivierung von Genen durch Methylierung ein wesentlicher Mechanismus. Eine mit Hypermethylierung verbundene Inaktivierung von p16 ist ein frühes und häufiges Ereignis bei nicht kleinzelligen Lungenkarzinomen (NSCLC) (SCC: 60% bis 80%; Adenokarzinom: 30% bis 45%) und anderen Krebsarten. In experimentellen Systemen scheint ein solcher Verlust beim Zulassen, dass Zellen die frühen Schritte zellulärer Immortalisation durchlaufen, als „Pfortner“ zu fungieren. Die Erfindung kann daher Anwendung auf dem Gebiet der Chemoprävention, wo Marker benötigt werden, um Personen mit hohem Risiko zu identifizieren und um die Wirksamkeit vorbeugender Wirkstoffe zu beurteilen, finden.

Beispiel eins:

**[0033]** Es wurden Sputumproben und dazu gehörige SCC von 21 Personen, die vorher in einer Lungenkrebs-Überwachungsstudie, die vom St. Mary's Hospital, Grand Junction, Colorado durchgeführt wurde, registriert worden waren, gewonnen. Die SCC wurden mittels Biopsie oder chirurgische Resektion gewonnen. Sputum wurde mittels standardisierter Verfahren an den Johns Hopkins Medical Institutions gewonnen. Sputum wurde von 32 Patienten, die auf ein mögliches Lungenkarzinom aufgrund einer Überweisung ihres Hausarztes untersucht wurden, und von 91 früheren Bergleuten aus Uranminen aus Grants, New Mexico, die frei von Krebs waren und an einer Krebs-Überwachungsstudie teilnahmen, gewonnen. Die Studie wurde von den betreffenden Ethik-Kommissionen („Institutional Review Boards“) gebilligt; alle Teilnehmer gaben eine schriftliche Einverständniserklärung ab.

**[0034]** Sputum wurde als nicht geeignet für eine Evaluation erachtet, wenn keine alveolären Lungenmakrophagen vorlagen oder wenn eine deutliche entzündliche Komponente, welche die Konzentration von pulmonalen Epithelzellen verdünnte, vorlag.

**[0035]** SCC-Tumore wurden als gefrorene oder in Formalin fixierte Proben gewonnen. Gefrorene Tumore wurden nicht mikrodiseziert. Sequentielle Schnitte (5 µm) wurden aus den Tumoren oder Biopsien präpariert, deparaffinisiert, und mit Toluidinblau gefärbt, um die Dissektion zu erleichtern. Eine an einer Tuberkulinspritze angebrachte 25-Gauge-Nadel wurde verwendet, um die Läsionen unter einem Dissektionsmikroskop zu entfernen. Weil einige SCC erheblich mit normalem Gewebe verunreinigt oder sehr klein (die Situation der Biopsie) sind, war es unerlässlich, normal erscheinende Zellen einzuschließen, um sicherzustellen, dass nach der Bisulfitmodifikation und der Reinigung der DNA-Vorlage über eine Säule ausreichend Probe verblieb, um den MSP-Test wie unten beschrieben durchzuführen. Daher wurde Mikrodisektion eingesetzt, um die Proben, die unter-

sucht wurden, anzureichern, weil es Ziel des Vorgangs war, festzustellen, ob eine Methylierung von p16 vorlag.

**[0036]** DNA wurde durch Verdau mit Pronase in Natriumdodecylsulfat (1%), gefolgt von einer standardmäßigen Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung aus gefrorenen Tumoren, mikrodisezierten Tumoren und Sputum isoliert.

**[0037]** Der Methylierungsstatus der Gene für p16 und MGMT wurde dann mit dem erfinderischen, modifizierten MSP-Verfahren bestimmt. Der Ansatz der verschachtelten, zweistufigen PCR wurde eingesetzt, was die Empfindlichkeit (ein methyliertes Allel unter > 50.000 nicht methylierten Allelen) des Nachweisens methylierter Allele mehr als um das 50-Fache gegenüber bekannten MSP-Verfahren verbesserte. Die DNA-Moleküle wurden einer Bisulfitmodifikation unterzogen und es wurde eine PCR durchgeführt, um ein Fragment von 280 Basenpaaren und ein Fragment von 289 Basenpaaren der Gene für p16 beziehungsweise MGMT einschließlich eines Teils ihrer CpG-reichen Promotorregion zu amplifizieren. Die Primer erkennen die mit Bisulfit modifizierte Vorlage, unterscheiden aber nicht zwischen methylierten und unmethylierten Allelen.

**[0038]** Die PCR-Produkte der ersten Stufe wurden 50fach verdünnt und 5 µl des Produkts wurden einer PCR der zweiten Stufe, in der Primer, die spezifisch für eine methylierte oder unmethylierte Vorlage waren, eingesetzt wurden, unterzogen. Die in der Amplifikation der Gene für p16 und MGMT der „Stufe 1“ eingesetzten Primersequenzen lauteten wie folgt:  
p16 vorwärts: 5'-GAAGAAAGAGGAGGGGTTGG-3',  
p16 rückwärts: 5'-CTACAAACCCTCTACCCACC-3',  
MGMT vorwärts: 5'-GGATATGTTGGGATAGTT-3' und  
MGMT rückwärts: 5'-CCAAAACCCCAAACCC-3'.

**[0039]** In allen PCR wurde Taq™ Gold Polymerase (Perkin Elmer) in einem Volumen von 50 µl verwendet. Das Protokoll der PCR-Amplifikation für Stufe 1 lautete wie folgt: 95 Grad C 10 Minuten lang, dann bei 95 Grad C 30 Sekunden lang denaturieren, bei 60 Grad C (für p16) oder 52 Grad C für MGMT 30 Sekunden lang anlagern, Extension bei 72 Grad C 30 Sekunden lang über 40 Zyklen, gefolgt von einer Schlussexension von 10 Minuten.

**[0040]** Primer, die dazu geeignet sind, selektiv unmethylierte oder methylierte Allele der Gene für p16 und MGMT in einer zweiten PCR oder einer PCR „der Stufe 2“ zu amplifizieren, wurden früher im Fachgebiet beschrieben. (Esteller, M, et al., „Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia.“ Cancer Res., 59: 793–797 (1999); Herman, J. G., et al.,

„MSP: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands.“ Proc. Natl. Acad. Sciences (USA), 93: 9821–9826 (1996.) Die Anlagerungstemperaturen für die zweite PCR wurden auf 70 Grad C (für p16) und auf 62 Grad C (für MGMT) erhöht und alle Zeiten in den Zyklen wurden auf 15 Sekunden bei einer Gesamtzahl von 40 Zyklen reduziert. Normales menschliches Gewebe, das bei Autopsien von Personen, die nie geraucht hatten, gewonnen wurde, und Zelllinien, die für Methylierung von p16 (Calu6) und MGMT (SkuLul) positiv waren, dienten als negative und positive Kontrollen. Alle Untersuchungen wurden mindestens doppelt durchgeführt. (Die Empfindlichkeit für das Nachweisen methylierter Allele wurde bestimmt, indem DNA, die entweder aus Calu6- oder aus SkuLul-Zellen isoliert worden war, mit DNA, die aus Lungengewebe einer Person, die nie geraucht hatte, isoliert worden war, gemischt wurde, um Verdünnungen von bis zu 1 in 100.000 zu erhalten. Die gemischte DNA-Probe wurde dann einer Bisulfitmodifikation und einer nachfolgenden Untersuchung durch das zweistufige MSP-Verfahren unterzogen.)

**[0041]** Sputumproben, die positive Methylierungsprodukte ergaben, wurden auch mit einem zweiten Verfahren unter Verwendung eines Verdauens des resultierenden PCR-Produkts mit Restriktionsenzymen untersucht. PCR der zweiten Stufe wurden für jede Probe doppelt durchgeführt. Dann wurde eine Probe eines jeden Probenpaars mit dem Restriktionsenzym FNU 4HI, das (G/CGGCG) an zwei Stellen innerhalb der amplifizierten Region des methylierten Promotors des Gens für p16 schneidet, inkubiert. (Das heißt, dass das Restriktionsenzym nach der PCR der zweiten Stufe eingesetzt wird.) Das Restriktionsenzym schneidet nur eine Vorlage, die an den beiden CpG-Stellen methyliert ist, weil die unmethylierten Cytosine aufgrund der Behandlung mit Bisulfit in Uracile verwandelt würden. Da FNU 4HI an zwei verschiedenen Stellen innerhalb des Promotors schneidet, haben die Anmelder bestätigt, dass vier CpG methyliert waren, was den Methylierungsstatus der Probe verifizierte. Somit ist man in der Lage, die Zahl der verschiedenen methylierten Stellen im Gen bis zu einem gewissen Ausmaß zu quantifizieren, indem man ein ausgewähltes Restriktionsenzym verwendet.

**[0042]** Eine identische Methode wurden für das Gen für MGMT verwendet, indem die Restriktionsenzyme Taq 1 und BstU1 verwendet wurden, um drei verschiedene CpG-Stellen zu untersuchen. Alle Sputumproben, die als positiv für Methylierung gewertet wurden, wurden durch beide Verfahren bestätigt.

**[0043]** Es wurden dann statistische Vergleiche mittels des Fisher's Exact Tests vorgenommen. Zum Zeitpunkt der Diagnose wird aberrante Methylierung von p16 und/oder MGMT im Sputum von allen untersuchten Patienten mit Lungenkrebs nachgewiesen.

Sputumproben und dazu gehörige SCC wurden von 21 Personen, die vorher in einer Lungenkrebs-Überwachungsstudie, die vom St. Mary's Hospital, Grand Junction, Colorado durchgeführt wurde, registriert worden waren, gewonnen. Alle Personen hatten eine Raucher-Vorgeschichte und etwa 50% waren aufgrund von Uranabbau auf dem Colorado-Plateau Radon ausgesetzt. (Bei ausreichend hohen Konzentrationen verursachen Radon (<sup>222</sup>Ra) und die damit verbundenen,  $\alpha$ -Partikel emittierenden Zerfallsprodukte Polonium-214 und -218 ein Übermaß von Lungenkrebs bei Rauchern, die Uran abgebaut haben.) Von 10 der oben erwähnten 21 Individuen wurde zum Zeitpunkt der Diagnose des SCC Sputum gewonnen; wie man in [Fig. 1](#) sieht, ergaben nur 4 Proben aufgrund zytologischer Kriterien die Diagnose Krebs. In deutlichem Kontrast zu den zytologischen Befunden waren einer oder beide der Genpromotoren, die untersucht wurden, in allen diesen Sputumproben abnorm methyliert. Weitere Bezugnahme auf [Fig. 1](#) zeigt, dass abnorme Methylierung des Gens für p16 im Sputum von allen acht Patienten, deren Tumore für diesen Marker auch positiv waren, vorlag, nicht aber im Sputum der beiden Individuen, deren Tumore negativ für diese Veränderung waren. Bei vier der sechs Patienten mit abnormer Methylierung von MGMT in ihren Tumoren wurde diese Veränderung auch in ihrem Sputum nachgewiesen, einschließlich der beiden Patienten, bei deren Tumoren die Veränderung von p16 fehlte. Wie durch die Fälle 4 und 5 in [Fig. 1](#) gezeigt lag im Sputum der beiden Individuen, deren Sputum negativ für MGMT war, eine Methylierung von p16 vor. Aberrante Methylierung von MGMT wurde im Sputum oder Tumor von 3 Fällen nicht nachgewiesen. Bei Fall 8 von [Fig. 1](#) wurde eine Methylierung von MGMT im Sputum, aber nicht im Tumor nachgewiesen.

**[0044]** Die vorangehende Offenbarung zeigt, dass der Nachweis einer Methylierung der Promotoren von p16 und MGMT dem klinischen Krebs vorausgeht. Es wird auf [Fig. 2](#) Bezug genommen. Bei den anderen 11 der ursprünglich 21 Individuen mit SCC wurden weit vor der Diagnose eines SCC Sputumproben entnommen, zu Zeitpunkten, die von 5 bis zu 35 Monaten reichen. Bei nur einem Patienten ([Fig. 2](#), Fall 3) wurde aufgrund zytologischer Kriterien angenommen, dass die Sputumprobe eindeutige Zeichen von Krebs hat.

**[0045]** Eine abnorme Methylierung der Promotorregion von p16 wurde jedoch in DNA aus dem Sputum von allen 11 Personen nachgewiesen, wobei die längste Zeit bis zur Diagnose des Tumors 35 Monate betrug. Bei weiterer Bezugnahme auf [Fig. 2](#) lag immer eine Methylierung von p16 vor, wenn mehrfache Sputumproben entweder als wiederholte Proben (Fall 2) oder als zeitlich versetzte Proben (zum Beispiel Fall 6) verfügbar waren. Es wurde auch eine 90%ige Übereinstimmung zwischen der Methylierung

nung von p16 in den primären SCC und den dazu gehörigen Sputumproben beobachtet, wie von den [Fig. 2](#) und [Fig. 3](#) gezeigt wird. [Fig. 3](#) zeigt die Ergebnisse der PCR der Stufe 2, die methylierungsspezifische Primer für die Gene für p16 und MGMT verwendet. Sputum (Proben Monate vor dem Krebs abgenommen) und primäre SCC (Zeitpunkt null) werden für 5 Fälle gezeigt. Das Vorliegen von PCR-Produkten von 145 bp und 83 bp zeigt an, dass das Sputum oder der Tumor positiv für Methylierung von p16 beziehungsweise MGMT war. Die Zelllinien CaLu6 und SkuLu1 sind die positiven Kontrollen für die Methylierung von p16 beziehungsweise von MGMT und normale Lunge diente als negative Kontrolle. Die Sputumzytologie variierte von Fall zu Fall und wird in [Fig. 3](#) für jede Probe angegeben. Sputum von sieben von 11 Fällen ([Fig. 1](#) und [Fig. 3](#)) zeigte auch eine Methylierung des Gens für MGMT, wie in [Fig. 1](#) und [Fig. 3](#) gezeigt. Es wurde eine 78%ige Übereinstimmung zwischen der Methylierung von MGMT im primären SCC und der dazu gehörigen Sputumprobe verzeichnet. Bei den beiden nicht übereinstimmenden Proben wurde eine Methylierung von MGMT im Tumor nachgewiesen, nicht aber in der einzigen Sputumprobe, die 34 oder 35 Monate vor dem Krebs gewonnen worden war ([Fig. 2](#)).

**[0046]** Die Darstellung dieses Beispiels 1 zog auch die Methylierung von p16 und MGMT bei Personen, die frei von Krebs sind, aber unter hohem Risiko stehen, in Betracht. Die hervorragende Übereinstimmung zwischen dem Nachweis der Methylierung von p16 und/oder MGMT in Sputumproben vor oder zum Zeitpunkt der Diagnose eines SCC rechtfertigte es, näher zu bestimmen, ob diese beiden Marker in allen Sputumproben von Personen, die frei von Krebs sind, aber unter einem hohen Risiko, Lungenkrebs zu entwickeln, stehen, vorliegen. Diese Information ist für die endgültige Entwicklung von Abschätzungen für das Risiko für Lungenkrebs wertvoll. Es wurden Sputumproben von 123 Personen, die frei von Krebs waren, gewonnen. Die Personen wurden nach der Gefährdung, der sie ausgesetzt waren, in drei Gruppen aufgeteilt: 1) Tabak, 2) Tabak und Radon und 3) Radon allein. Etwa 50% dieser Personen wurden als starke Raucher mit einer Vorgeschichte von mehr als 30 „pack-years“ (30 Jahre lang eine Schachtel pro Tag) betrachtet. Die Einwirkung von Radon reichte von 3 bis 577 „Working-Level-Monaten“ (Einheit der Exposition durch Radon); 75% der Personen hatten mehr als 100 „Working-Level-Monate“. Diese früheren Uran-Bergleute arbeiteten in Grants, New Mexico, wo die Expositionen weit geringer als in Colorado sind.

**[0047]** [Fig. 4](#) zeigt die Prävalenzen für Methylierung von p16 und MGMT im Sputum von Personen, die frei von Krebs sind. Die Häufigkeit der Methylierung von p16 und MGMT im Sputum von Personen, die frei von Krebs sind, wird als Prozentsatz ausge-

drückt. Über den Balken von [Fig. 4](#) wird die Gesamtzahl der positiven Proben pro Umfang der gesamten Stichprobe angegeben. Wie man in [Fig. 4](#) sieht, war die Häufigkeit des Nachweisens aberranter Methylierung der Gene für p16 oder MGMT über alle Gruppen ähnlich und trat in 12–19% beziehungsweise in 16–36% auf. Der Raucherstatus war für eine Untergruppe (n = 35) der Uran-Bergleute verfügbar und die Methylierungsmarker lagen im Sputum sowohl von gegenwärtigen als auch von früheren Rauchern vor, was zu dem weiter bestehenden Risiko für Lungenkrebs bei früheren Rauchern passt. Eine Bisulfit-Sequenzierung der Sputumproben (n = 5 für jedes Gen), die positiv für p16 oder MGMT waren, ergaben unter den PCR-Primern eine Methylierung an allen CpG-Stellen (nicht gezeigt).

**[0048]** Weiterhin zeigte die Untersuchung von DNA, die aus Lungen von Autopsiefällen, aus Bronchialepithelzellen, die mittels Bronchoskopie gewonnen worden waren, und aus Lymphozyten (ein Bestandteil des Sputums) von Personen, die nie geraucht hatten, isoliert worden war, dass diese alle negativ für die Methylierungsmarker waren (nicht gezeigt).

**[0049]** Methylierung von sowohl p16 als auch von MGMT wurde bei nur vier von 123 Personen, die frei von Krebs waren, nachgewiesen (3%), im Gegensatz zu 10 von 21 (48%) der Patienten mit SCC. Die viel niedrigere Inzidenz ( $p < 0,001$ ) des Nachweisens beider Sputummarker bei Personen, die frei von Krebs waren, als bei den 21 untersuchten Individuen, die einen nachgewiesenen Lungenkrebs hatten, bekräftigt zwei Feststellungen. Erstens geben Veränderungen im Sinne einer Hypermethylierung in DNA aus dem Sputum nicht nur ein Einwirken von Risikofaktoren für Lungenkrebs wieder, sondern ermitteln entweder den Zustand eines sehr hohen Risikos oder das tatsächliche Vorliegen von Krebs. Zweitens entspricht die durchschnittliche Inzidenz von ~25% für den Nachweis von einem der beiden Sputummarker bei Individuen, die frei von Krebs sind, etwa dem bekannten Risiko für die Entwicklung von Lungenkrebs für die untersuchten Populationen. Dies deutet darauf hin, dass die Marker für Hypermethylierung möglicherweise jene Patienten mit hohem Risiko, die am wahrscheinlichsten die Krankheit tatsächlich bekommen werden, identifizieren können.

**[0050]** Bis jetzt wurde über drei Fälle von Lungenkrebs im Follow-Up dieser von Krebs freien Population, das nun von zwei bis zu sechs Jahren nach der Gewinnung des Sputums reicht, berichtet: zwei bei früheren Uran-Bergleuten, die rauchten und einer bei einem Raucher. Es kam zu acht Todesfällen, die nicht durch Lungenkrebs bedingt waren. Zwei Lungenmalignome wurden als SCC diagnostiziert, ein und drei Jahre nach der Gewinnung des Sputums. Das Gen für MGMT war im Sputum von beiden dieser Personen methyliert. Der andere Tumor war ein Adenokar-

zinom. Die Inzidenz der Hypermethylierung von p16 und MGMT ist bei diesem Tumortyp niedriger als im Vergleich zu SCC und keiner der beiden Marker lag in der Sputumprobe, die zwei Jahre vor der Diagnose gewonnen worden war, vor.

Beispiel zwei:

**[0051]** Fälle (n = 52) und Kontrollen (n = 89) wurden aus Veteranen, die das New Mexico Veterans Health Care System (NMVHCS) für ihre Grundversorgung nutzen, rekrutiert. Gegenwärtige oder frühere Zigarettenraucher (> 100 Zigaretten während ihrer Lebenszeit geraucht) kamen für die Untersuchung in Frage. Weiterhin konnten die Personen keine frühere Diagnose eines Krebses der Luftwege haben, sich keiner Chemotherapie oder Radiotherapie des Brustkorbs im vergangenen Jahr unterzogen haben oder nicht unfähig sein, die Verfahren, die zum Gewinnen von Gewebeproben erforderlich sind, wie unten weiter beschrieben, zu tolerieren.

**[0052]** Die Fälle wurden aus Patienten rekrutiert, die an die Multispecialty Chest Clinic am NMVHCS, wo > 90% der Lungenkrebsfälle des NMVHCS bezüglich der Diagnose und Therapieempfehlungen beurteilt werden, überwiesen wurden. Die Patienten werden wegen Anzeichen oder Symptomen, die auf Lungenkrebs verdächtig sind, in diese Klinik eingewiesen. Alle Patienten, die zur diagnostischen Beurteilung in Bezug auf Lungenkrebs eingewiesen worden waren, wurden für die Teilnahme an der Studie rekrutiert. Nur die Patienten mit histologisch bestätigtem Lungenkrebs, die ihr Einverständnis gaben, wurden als Fälle in die Studienpopulation aufgenommen. Alle Stadien und histologischen Typen wurden eingeschlossen. Kontrollen wurden aus der Population von Individuen, die frei von Lungenkrebs waren und ihre Grundversorgung am NMVHCS erhielten, registriert. Man ging zufällig an die Patienten während eines Besuchs in der Klinik im Rahmen der Grundversorgung heran und sie wurden gebeten, an der Studie teilzunehmen. Alle Personen wurden gebeten, sich freiwillig einer Bronchoskopie zu unterziehen; die Teilnahme war jedoch nicht von Einverständnis in diese Prozedur abhängig. Zusätzlich wurden Patienten, die sich aus Gründen, die sich von der Diagnose eines Lungenkrebses unterschieden, (zum Beispiel interstitielle Lungenerkrankung) einer Bronchoskopie unterzogen, als Kontrollen eingeschlossen.

**[0053]** Die Verteilung der Tumorhistologie unter den 52 Fällen war 44% SCC, 31% Adenokarzinom, 2% großzelliges Karzinom, 8% kleinzelliges Karzinom und 15% NSCLC (Untertyp nicht angegeben). Ausgewählte demographische Variablen nach dem Fall-Kontroll-Status sind in der Tabelle von [Fig. 8](#) zusammengefasst. Die einzigen signifikanten Unterschiede, die zwischen den Gruppen beobachtet wurden, zeigten sich für die Raucher-Vorgeschichte, wo

die Dauer und die „pack-years“ bei den Fällen mehr waren, während die Jahre seit der Beendigung für frühere Raucher in der Kontrollgruppe mehr waren.

**[0054]** An alle Teilnehmer, die für diese Studie registriert waren, wurde mit der Bitte, sich einer Bronchoskopie zu unterziehen, herangetreten. Ein großer Teil (> 85%) der Fälle unterzog sich einer Bronchoskopie, weil sie routinemäßig bei Lungenkrebspatienten als diagnostisches Verfahren oder als Verfahren zur Stadieneinteilung durchgeführt wird, und 45% der Kontrollen gaben ihr Einverständnis, sich dieser Prozedur zu unterziehen. Während der Bronchoskopie wurden wie früher beschrieben Bronchialepithelzellen (BECs) gewonnen. BECs wurden unter Verwendung einer Standardbürste für zytologische Zwecke von bis zu vier verschiedenen Stellen an anatomisch normal erscheinenden Bifurkationen in den Lungen gewonnen, üblicherweise innerhalb von jedem Ober- und Unterlappen. An diesen Stellen wurden Proben genommen weil (1) sie in hohem Ausmaß Ablagerungsstätten für Partikel darstellen, (2) sie häufig mit histologischen Veränderungen bei Rauchern verbunden sind und (3) sie häufige Stellen von Tumoren darstellen. Stellen, die zum Bürsten ausgewählt wurden, wurden erst mit Satzlösung abgewaschen, und nicht adhärenente Zellen zu entfernen. Stellen wurden nicht gebürstet, wenn ein Tumor innerhalb von 3 cm von der Stelle visuell ausgemacht wurde. Nach dem Bürsten wurde die Bürste in serumfreies Medium gelegt und bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert. An jeder Stelle wurden bis zu drei Vorgänge des Bürstens durchgeführt. Zusätzlich wurden BECs von Personen, die nie geraucht hatten, von zwei verschiedenen Quellen beschafft: Zellen, die aus Autopsien von Personen, die nie geraucht hatten, bei Clonetics, Inc. (San Diego, Kalifornien, USA) stammten und Zellen von den drei Personen, die nie geraucht hatten und durch das NMVHCS rekrutiert worden waren.

**[0055]** Tumorgewebe war entweder mittels Resektion oder Biopsie von 18 Personen, bei denen ein Lungenkrebs diagnostiziert worden war, verfügbar. Tumorgewebe wurde in Formalin fixiert und zur folgenden Untersuchung auf Methylierung des Gens für p16 in Paraffin eingebettet.

**[0056]** Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff zur DNA-Isolierung schockgefroren. Zellen von einer Bürste von jeder bronchialen Sammelstelle wurden zur zytologischen Untersuchung präpariert, indem die Zellen auf einen Objektträger für die Mikroskopie ausgestrichen wurden. Die Zellen wurden dann mit 96%igem Ethanol fixiert und gemäß dem Verfahren von Papanicolaou gefärbt, um die morphologische Beurteilung durch einen Zytopathologen zu ermöglichen.

**[0057]** Bei der Registrierung wurden die Patienten

gebeten, eine nicht induzierte Sputumprobe abzugeben. Wenn dies erfolglos war, unterzogen sich die Patienten einer Sputuminduktion. Zur Sputuminduktion wurde eine Abwandlung der Ultraschall-Vernebelungstechnik, die von Saccomanno beschrieben wurde, verwendet. Die Versuchspersonen verwendeten Wasser oder Salzlösung, um die Zunge, die Oberflächen der Wangen, die Zähne und das Zahnfleisch sanft zu bürsten, um oberflächliche Epithelzellen und Bakterien zu entfernen, gefolgt von Gurgeln und Spülen mit Leitungswasser. Die Patienten inhalierten dann 20–30 Minuten lang eine vernebelte, 3%ige Salzlösung aus einem Ultraschallvernebler. Sputum wurde in einem sterilen Probengefäß gesammelt und ein gleiches Volumen von Saccomanno-Lösung wurde sofort zugegeben. Sputumproben wurden für die Untersuchung auf Methylierung durch ausführliches Mischen mittels Vortex weiterverarbeitet, einmal mit Saccomanno-Lösung gewaschen und bei Raumtemperatur aufbewahrt, bis sie untersucht wurden. Zusätzlich wurden mindestens zwei Objektträger mit Sputumproben präpariert und für eine morphologische Untersuchung durch einen geprüften Zytopathologen einer Färbung nach Papanicolaou unterzogen.

**[0058]** DNA wurde aus BECs, Tumoren und Sputum mittels Verdau mit Pronase in 1%igem Natriumdodecylsulfat isoliert, gefolgt von einer standardmäßigen Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung.

**[0059]** Der Methylierungsstatus der Gene für p16, MGMT, DAP-Kinase und RASSF1A wurde mittels des erfinderischen Verfahrens der MSP ermittelt. Es wurde ein verschachteltes, zweistufiges PCR-Verfahren, das die Empfindlichkeit des Nachweisens methylierter Allele um > 50fach über das ursprüngliche „einstufige“ Verfahren verbesserte (ein methyliertes Allel unter > 50.000 unmethylierten Allelen), durchgeführt. DNA-Moleküle wurden einer Bisulfitmodifikation unterzogen und es wurde eine PCR durchgeführt, um Fragmente von 280 Basenpaaren, 289 Basenpaaren, 209 Basenpaaren und 260 Basenpaaren der Gene für p16, MGMT, DAP-Kinase beziehungsweise RASSF1A einschließlich eines Teils ihrer CpG-reichen Promotorregion zu amplifizieren. Die Primer erkennen die mit Bisulfit modifizierte Vorlage, unterscheiden aber nicht zwischen methylierten und unmethylierten Allelen. Die PCR-Produkte der ersten Stufe wurden 50fach verdünnt und 5 µl wurden einer PCR der zweiten Stufe, in der Primer, die spezifisch für eine methylierte oder unmethylierte Vorlage waren, eingesetzt wurden, unterzogen. Die Primersequenzen und Bedingungen, die in der Amplifikation der Stufe 1 und 2 der Promotoren von p16 und MGMT eingesetzt angewendet wurden, wurden beschrieben. Die in der Amplifikation der Gene für DAP-Kinase und RASSF1A der Stufe 1 eingesetzten Primersequenzen lauten wie folgt:

DAP-Kinase vorwärts: 5'-GGTTGTTTCGGAGTGT-

GAGGAG-3',

DAP-Kinase rückwärts: 5'-GCTATCGA-AAACCGAC-CATAAAC-3',

RASSF1A vorwärts: 5'-GGAGGGAAGG-AAGGGTAAGG-3',

RASSF1A rückwärts: 5'-CAACTCAATAAACT-CAAACCTCCC-3'.

**[0060]** In allen PCR wurde Taq<sup>TM</sup> Gold Polymerase (Perkin Elmer) in einem Volumen von 50 µl verwendet. Das Protokoll der PCR-Amplifikation für Stufe 1 lautete wie folgt: 95°C 10 Minuten lang, dann bei 95°C 30 Sekunden lang denaturieren, bei 58°C (für DAP-Kinase) oder 60°C (für RASSF1A) 30 Sekunden lang anlagern, Extension bei 72°C 30 Sekunden lang über 40 Zyklen, gefolgt von einer Schlussexension von 5 Minuten. Primer, die dazu verwendet wurden, unmethylierte oder methylierte Allele des Gens für DAP-Kinase selektiv zu amplifizieren, lauten wie folgt:

Vorwärts unmethyliert: 5'-GGAGGATAGTTGGATT-GAGTTAATGTT-3',

rückwärts unmethyliert: 5'-CAAATCCCT-CCCAA-CACCAA-3',

vorwärts methyliert: 5'-ATAGTCGG-ATC-GAGTTAACGTC-3' und

rückwärts methyliert: 5'-AAAATAACCG-AAA-CGACGACG-3'.

**[0061]** Primer, die dazu verwendet wurden, unmethylierte oder methylierte Allele des Gens für RASSF1A selektiv zu amplifizieren, lauten wie folgt: Vorwärts unmethyliert: 5'-GGTTTTGTGA-GAGTGTGTTTAG-3', rückwärts unmethyliert: 5'-ACACTAACAAACA-CAA-ACCAAAC-3', vorwärts methyliert: 5'-GGGGGTTTTGCGAGAG-CGC-3' und rückwärts methyliert: 5'-CCCGATTAAACCG-TACTTCG-3'.

**[0062]** Die Anlagerungstemperaturen wurden auf 70°C und 62°C (für DAP-Kinase) und auf 68°C und 62°C (für RASSF1A) erhöht, um die methylierten beziehungsweise unmethylierten Sequenzen zu amplifizieren, und alle Zeiten in den Zyklen wurden auf 15 Sekunden bei einer Gesamtzahl von 40 Zyklen reduziert.

**[0063]** Es wird sofort verstanden werden, dass andere Primer neben den näher beschriebenen eingesetzt werden können, ohne vom Umfang der Erfindung abzuweichen. Die Primersequenzen können abgeändert werden, das heißt, sowohl die inneren Primer als auch die äußeren Primer können in jede Richtung um eine Anzahl von Basen verschoben werden, noch innerhalb des verschachtelten Verfahrens der Erfindung. Die Änderung der Lokalisation von einem oder mehreren Primern ist im Verständnis eines Durchschnittsfachmanns ein vorgesehener As-

pekt der Erfindung.

**[0064]** Die Größen der Produkte für jeden Genpromotor waren wie folgt: 153 Basenpaare und 106 Basenpaare für methylierte und unmethylierte DAP-Kinase und 204 Basenpaare und 170 Basenpaare für methyliertes und unmethyliertes RASSF1A. Normales menschliches Gewebe, das bei der Autopsie von Personen, die nie geraucht hatten, gewonnen wurde, und Zelllinien, die positiv für Methylierung von p16 (Calu6), MGMT (SkLU1), DAP-Kinase (H2009) und RASSF1A (A549) waren, dienten als negative und positive Kontrollen. Diese Zelllinien wurden von der ATCC (Mansius, Virginia USA) gekauft und unter Verwendung der empfohlenen Protokolle kultiviert.

**[0065]** Proben, die positive Methylierungsprodukte ergaben, wurden auch mittels methylierungssensitiven Verdaus des resultierenden PCR-Produkts durch Restriktionsenzyme untersucht. PCR der zweiten Stufe wurden für jede Probe doppelt durchgeführt. Dann wurde für p16 eine Probe eines jeden Probenpaars mit dem Restriktionsenzym FNU 4HI, das (G/CGGCG) an zwei Stellen innerhalb der amplifizierten Region des methylierten Promotors des Gens für p16 schneidet, inkubiert. Somit wird dieses Restriktionsenzym nur eine Vorlage, die an den beiden CpG-Stellen methyliert ist, schneiden, weil die unmethylierten Cytosine aufgrund der Behandlung mit Bisulfid in Uracile verwandelt würden. Da FNU 4HI an zwei verschiedenen Stellen innerhalb des Teils des Promotors von p16, der untersucht wird, schneidet, haben die Anmelder bestätigt, dass vier CpG methyliert waren, was den Methylierungsstatus der Probe verifiziert. Ein identisches Verfahren wurde für die Gene für DAP-Kinase und RASSF1A benutzt, wobei die Restriktionsenzyme BstUI verwendet wurden, um drei verschiedene CpG-Stellen im Gen für MGMT zu untersuchen. Alle Proben, die als positiv für Methylierung gewertet wurden, wurden durch Restriktionsanalyse bestätigt.

**[0066]** Die Daten wurden unter Verwendung von Prozentsätzen für diskrete Variable und von Medianwerten mit Bereichen für kontinuierliche Variable zusammengefasst. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden unter Verwendung des Fishers's exact Tests für diskrete Variable und des Wilcoxon Rangsummentests für kontinuierliche Variable gewichtet. Die Ergebnisse von Markerpaaren wurden unter Verwendung von Fishers's exact Test untersucht, um die Verbindung zwischen den Markern zu gewichten, und mit MacNemars Test, um Unterschiede in den Proportionen, die positiv für die Marker sind, zu gewichten. Logistische Regressionsmodelle mit Fall-Kontroll-Status als Resultat wurden verwendet, um simultan auf multiple Vorhersagevariablen zu prüfen. Alle Analysen wurden in der SAS-Software (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina USA) durchgeführt.

**[0067]** Zytologische Veränderungen wurden in BECs, die von bis zu vier Stellen bei 51 Fällen (Zytologie in einem Fall nicht verfügbar) und 41 Kontrollen gewonnen worden waren, charakterisiert. Gesamtzahlen von 166 und 150 Stellen wurden bei den Fällen beziehungsweise Kontrollen beurteilt. Metaplasie (reaktiv) und leichte Dysplasie (Atypie) waren die vorherrschenden zytologischen Abweichungen, die beobachtet wurden, und ihre Verteilung unterschied sich nicht unter den Gruppen. Ein Fall hatte eine schwere Dysplasie an einer Stelle im Bronchialepithel. Bei etwa 54% sowohl der Fälle als auch der Kontrollen wurden an mindestens einer Stelle zytologische Veränderungen beobachtet. Die Zahl der Fälle mit mindestens zwei oder drei Stellen, die im Hinblick auf die Zytologie positiv waren, überstieg jene, die bei den Kontrollen beobachtet wurde: 33% versus 20% ( $p = 0,24$ ) beziehungsweise 25% versus 3% ( $p = 0,007$ ). Diese zytologischen Veränderungen wurden in  $< 10\%$  der Zellen, die aus der diagnostischen Bürstung gewonnen worden waren, beobachtet. Es gab keine offenkundige Verbindung zwischen dem Vorliegen einer Zytologie und Tumorphistologie oder Raucherstatus (gegenwärtig versus früher); jedoch rauchten Fälle mit zytologischen Veränderungen in ihrem Bronchialepithel mehr als solche ohne zytologische Veränderungen (Medianwert der „pack-years“: 78 versus 59;  $p = 0,10$ ).

**[0068]** [Fig. 9](#) stellt die Methylierung des Gens für p16 in BECs und im entsprechenden Sputum dar. Typische Szenarien zum Nachweis von Methylierung in BECs und Sputum von fünf verschiedenen Kontrollen werden dargestellt. Die Probennummer entspricht einem Individuum und der Fraktion (zum Beispiel 1.1., 1.2) von BECs, die von verschiedenen Lungenlappen aus diesem Individuum gewonnen wurden. Zum Beispiel war bei der ersten Kontrolle nur die zweite Bronchialepithelstelle positiv für Methylierung von p16. CaLu6 und H2009 sind Zelllinien, von denen bekannt ist, dass sie ein methyliertes beziehungsweise unmethyliertes Gen für p16 enthalten. [Fig. 10](#) veranschaulicht aberrante Hypermethylierung von Promotoren in nicht malignen BECs aus Lungenkrebsfällen und Kontrollen. Die Summendaten werden als Häufigkeit von Methylierung (Prozent von positiven Personen) an einer bis drei Bronchialepithelstellen für die Gene für p16 und DAP-Kinase dargestellt.

**[0069]** Von 94% der gewonnenen Stellen wurden erfolgreich BEC-Kulturen angelegt, was ermöglichte, dass bei 160 und 137 Stellen von Fällen beziehungsweise von Kontrollen der Methylierungsstatus der Gene für p16, MGMT, DAP-Kinase und RASSF1A untersucht wurde. Aberrante Promotormethylierung des Gens für p16 wurde an mindestens einer Stelle von 44% sowohl der Fälle als auch der Kontrollen beobachtet und bei 14% und 15% der Fälle beziehungsweise der Kontrollen waren zwei Stellen positiv, wie aus den [Fig. 9](#) und [Fig. 10](#) zu ersehen ist.

Weiter hatten zwei Fälle und eine Kontrolle drei positive Stellen, aber keine Person hatte eine Methylierung von p16 an allen vier BEC-Stellen ([Fig. 2](#)). Die Prävalenz für Methylierung des Gens für DAP-Kinase im Bronchialepithel war signifikant geringer als es für p16 beobachtet wurde; ungeachtet des Fall-Kontroll-Status ( $p = 0,001$ ). Nur fünf Fälle (10%) und vier Kontrollen (10%) hatten eine BEC-Stelle, die positiv für Methylierung des Gens für DAP-Kinase war; wie in [Fig. 10](#) gezeigt, wurde Methylierung niemals an mehr als einer Stelle in einer Person beobachtet. An keiner Stelle wurde eine Methylierung des Gens für RASSF1A nachgewiesen. Interessanterweise wurde Methylierung sowohl von p16 als auch DAP-Kinase bei zwei Fällen und einer Kontrolle beobachtet. Nur in der Kontrollperson wurde die Methylierung an derselben Stelle gefunden. Methylierung von p16, DAP-Kinase oder RASSF1A wurde an keiner der 17 Stellen von sieben Personen, die nie geraucht hatten, nachgewiesen (nicht gezeigt), ein Ergebnis, das mit früheren Untersuchungen, die über nahezu keine genetischen Veränderungen im Bronchialepithel aus dieser Population berichtet haben, übereinstimmt.

**[0070]** In deutlichem Kontrast zu den Ergebnissen für diese drei Gene in BECs wurde eine Methylierung des Gens für MGMT bei > 75% der BEC-Stellen aus Fällen und Kontrollen beobachtet. Zusätzlich wurde eine Methylierung von MGMT an 14 von 17 Stellen von den Personen, die nie geraucht hatten, beobachtet (nicht gezeigt). Dieses Ergebnis wurde auch an normalen menschlichen Fibroblasten, die weitreichende Methylierung der MGMT-CpG-Insel zeigten, als sie konfluent wurden, beobachtet. Dieser Prozess wurde teilweise rückgängig gemacht, als die Fibroblasten in logarithmisches Wachstum zurückversetzt wurden. Somit ist es im Rahmen der Zellkultur offenkundig, dass eine von Konfluenz ausgelöste Wachstumshemmung vorübergehende Veränderungen in der epigenetischen Stabilität im Promotor von MGMT verursachen muss, was zu aberranter Methylierung führt. Die Tatsache, dass die BECs der Anmelder bis zu einer 80%igen Konfluenz angezogen wurden, verbunden mit der Verwendung des erfinderischen, zweistufigen MSP-Verfahrens ermöglichte den Nachweise dieser Methylierung in vitro.

**[0071]** MGMT kann dennoch als Biomarker im Sputum verwendet werden, weil die hohe Prävalenz für die Veränderungen, die in vitro beobachtet wurden, in einem Zusammenhang, der sich von dem des Epithels der Luftwege völlig unterscheidet, auftritt. Weiterhin wird diese Unterscheidung weder in primären NSCLC noch in abgeschilferten Zellen im Sputum, wo die Prävalenz für Methylierung von MGMT 25% beziehungsweise 50% beträgt, wiederholt.

**[0072]** Bei den Fällen gab es keine Verbindung zwischen der Tumorphistologie und der Methylierung der Gene für p16 oder DAP-Kinase im Bronchialepithel.

Dieses Ergebnis steht mit der Tatsache, dass diese Gene sowohl im SCC als auch in Adenokarzinom methyliert sind, im Einklang. Der Raucherstatus hatte keine Verbindung mit dem Nachweis von Methylierung entweder von dem Gen für p16 oder von dem Gen für DAP-Kinase im Bronchialepithel. Somit wurde Promotormethylierung in BECs von gegenwärtigen Rauchern so häufig wie bei früheren Rauchern gesehen. Zusätzlich war keine der klassifizierten Variablen des Rauchens (Dauer, pack years, Zeit seit dem Aufhören) mit dem Nachweis von Methylierung im Bronchialepithel verbunden.

**[0073]** Es wurde ein Zusammenhang zwischen dem Status von p16 in BECs und in Lungentumoren beobachtet. Von 18 der Fälle, bei denen ein Lungenkrebs diagnostiziert worden war, war Tumorgewebe verfügbar. Um festzustellen, wo die Methylierung von p16 in den BECs in diesen Fällen eine Methylierung an diesem Lokus in Tumoren vorhersagt, wurde DNA aus mikrodisszierten Tumoren zur MSP-Untersuchung von p16 isoliert. Eine Methylierung des Gens für p16 wurde in vier von acht SCC nachgewiesen, in vier von acht Adenokarzinomen und in einem von zwei NSCLC (nicht gezeigt). Siebzehn der 18 Tumore zeigten eine absolute Übereinstimmung ( $p < 0,001$ ), wobei sie entweder sowohl im Tumor als auch an mindestens einer BEC-Stelle methyliert waren (neun Paare) oder im Tumor und in BECs unmethyliert waren (acht Paare). In dem einen diskordanten Tumor-BEC-Paar war das Bronchialepithel methyliert und der Tumor war unmethyliert.

**[0074]** Die Untersuchungen von Beispiel eins oben zur Methylierung von p16 und MGMT an einer begrenzten Zahl von Rauchern, die frei von Krebs waren, deuten darauf hin, dass die Prävalenz für diese Veränderungen einem lebenslangen Risiko für Lungenkrebs nahe kommt. Somit wurde während der Rekrutierung von Personen für diese Fall-Kontroll-Studie das Protokoll ergänzt, um die Gewinnung von Sputum von Kontrollen einzuschließen, um zusätzliche Informationen über die Prävalenz der Gene für p16, MGMT, DAP-Kinase und RASSF1A in dieser Population von Veteranen zu sammeln. Man erhielt von 66 Kontrollen Sputum, 18 unterzogen sich einer Bronchoskopie.

**[0075]** [Fig. 11](#) zeigt aberrante Hypermethylierung von Promotoren im Sputum von Kontrollen, die frei von Krebs waren. Die Summendaten werden als Häufigkeit von Methylierung der Gene für p16, MGMT, DAP-Kinase und RASSF1A im Sputum, das von 66 Kontrollen, die frei von Krebs waren, gewonnen worden war, angegeben. Die Gesamtzahl der positiven Proben pro Umfang der gesamten Stichprobe ist oberhalb der Balken in der Figur beschrieben. Es wird auch Bezug auf [Fig. 12](#), welche die Beziehung zwischen der Methylierung von p16 in BECs und im Sputum zeigt, genommen. Die Gesamthäufigkeit für

Methylierung von p16 in BECs und dazu gehörigen Sputumproben von 18 Kontrollen, die frei von Krebs waren, wird auf der linken horizontalen Achse der Figur dargestellt. Die Beziehung zwischen Methylierung in den BECs und im Sputum wird durch vier mögliche Situationen gezeigt: (1) positives Sputum, positive BEC; (2) negatives Sputum, negative BEC; (3) negatives Sputum, positive BEC und (4) positives Sputum, negative BEC. Die Zahl der Personen, die in jede Kategorie fallen, ist über dem Balken angegeben.

**[0076]** Abnormale Sputumzytologie wurde bei 25% der Kontrollen beobachtet. Metaplasie war die häufigste Veränderung und lag in 19% der Sputumproben vor, während leichte Dysplasie in 6% der Sputumproben beobachtet wurde. Methylierung des Gens für p16 wurde im Sputum von 23 von 66 Kontrollen (35%, [Fig. 11](#)) nachgewiesen. Es wurde auch Methylierung von DAP-Kinase im Sputum von 16 Kontrollen beobachtet und acht dieser Personen waren positiv für Methylierung von p16, wie aus [Fig. 11](#) zu ersehen ist. Methylierung von MGMT wurde bei neun Kontrollen beobachtet, wobei vier dieser Personen auch entweder für p16 (eine Person) oder für DAP-Kinase (drei Personen) positiv waren. Zusätzlich hatten drei Personen, die positiv für Methylierung von MGMT waren, auch eine Methylierung sowohl von p16 als auch von DAP-Kinase in ihrem Sputum (nicht gezeigt). Methylierung von RASSF1A wurde nur in zwei Sputumproben nachgewiesen, jedoch enthielt eine Person, die positiv für dieses Gen war, Methylierung von p16, DAP-Kinase und MGMT in ihrem Sputum. Das Sputum der anderen Person war positiv für Methylierung von DAP-Kinase und MGMT. Somit waren drei (5%) und eine (2%) der Kontrollpersonen in ihrem Sputum positiv für drei beziehungsweise vier der Methylierungsmarker. Wie aus Beispiel eins oben ersichtlich ist, war die Sputumzytologie nicht mit einem positiven Befund für aberrante Promotormethylierung verbunden. Der Raucherstatus hatte keine Verbindung mit dem Nachweis einer Genpromotormethylierung im Sputum. Zusätzlich war keine der Variablen des Rauchens (Dauer, pack years, Zeit seit dem Aufhören) damit verbunden, ob Methylierung im Sputum nachgewiesen wurde.

**[0077]** Die Konkordanz zwischen dem Befund einer Methylierung von p16 im Sputum und im Bronchialepithel von den 18 Kontrollen wurde untersucht. Es wird auf [Fig. 12](#) Bezug genommen. In dieser Untergruppe wurde eine Methylierung von p16 in BECs und im Sputum von 10 beziehungsweise sieben Kontrollen beobachtet. Von den sieben Personen, deren Sputum für diesen Marker positiv war, zeigten fünf die Änderung bei der Methylierung in ihrem Bronchialepithel. Weitere Bezugnahme auf [Fig. 12](#) zeigt, dass es fünf Kontrollen gab, deren Bronchialepithel positiv und deren Sputum negativ für Methylierung von p16 war.

**[0078]** Die Ergebnisse der Untersuchung deuten darauf hin, dass aberrante Hypermethylierung von Promotoren des Gens für p16 und in geringerem Ausmaß für DAP-Kinase im Bronchialepithel von Fällen mit Lungenkrebs und von Kontrollen, die frei von Krebs sind und geraucht haben, häufig auftritt. Diese Änderungen der Methylierung bleiben nach der Beendigung des Rauchens bestehen. Die Veränderungen werden in abgeschilferten Zellen nachgewiesen, was ihre Verwendung als Marker beim Beurteilen der Verminderung des Lungenkrebsrisikos als Reaktion auf chemopräventive Wirkstoffe gegen Krebs fördert. Prävalenz und Gewebsvielfalt für die fünf genetischen und epigenetischen Marker, die in diesem Beispiel untersucht wurden, unterschieden Fälle nicht von Kontrollen. Diese Entscheidung wurde durch die Untersuchung anderer genetischer Marker durch die Untersucher bestätigt und ist wahrscheinlich auf die überwältigende Schädigung am Bronchialepithel über Jahre der Einwirkung von Karzinogenen aus dem Tabak zurückzuführen. Weiterhin kann das Fehlen jeglicher Verbindung zwischen diesen Markern und Raucherstatus oder Dauer des Rauchens auf die Tatsache zurückzuführen sein, dass 92% der Fälle und 73% der Kontrollen eine Rauchervorgeschichte von > 30 pack-years hatten.

**[0079]** Die Tatsache, dass Promotormethylierung mit ähnlichen Prävalenzen bei Fällen und Kontrollen unabhängig vom Raucherstatus (gegenwärtig oder früher) beobachtet wurde, stellte den Vorschlag, dass diese Änderungen der Methylierung ein erhöhtes Risiko für Lungenkrebs vermitteln, nicht in Frage. Etwa die Hälfte der Lungenmalignome werden bei früheren Rauchern diagnostiziert. Während das Aufgeben des Rauchens mit einem Rückgang des Lungenkrebsrisikos verbunden ist, ist das kumulative Risiko für Lungenkrebs im Alter von 75 Jahren für eine Person, die im Alter von 50 Jahren mit dem Rauchen aufhört, noch 5-mal höher als für eine Person, die nie geraucht hat. Weiterhin bekräftigt die enge Verbindung, die zwischen der Methylierung von p16 im Bronchialepithel und im entsprechenden Primärtumor beobachtet wurde, die Auffassung, dass eine Inaktivierung von Genen wie zum Beispiel p16, obwohl sie nicht von sich aus transformieren, höchstwahrscheinlich die Ansammlung zusätzlicher genetischer und epigenetischer Änderungen, die letztendlich zu malignem Krebs führen, zulässt. Die Ergebnisse aus Beispiel 1, in dem Methylierung sowohl von p16 als auch von MGMT im Sputum von 43% der Personen mit bestätigtem SCC, aber nur in 3% bis 6% der Kontrollen, die frei von Krebs waren, beobachtet wurde, unterstützen diese Auffassung. Daher ist die Zeit zum Ansammeln der zusätzlichen genetischen und epigenetischen Veränderungen, welche die Tumorprogression begünstigen, wahrscheinlich eine entscheidende Determinante für das Lungenkrebsrisiko.

**[0080]** Eine Inaktivierung des Gens für p16 durch

Hypermethylierung des Promotors wurde im Bronchialepithel häufiger gesehen als für DAP-Kinase, während eine Methylierung von RASSF1A niemals nachgewiesen wurde. Diese Unterscheidung kann die Zeitsteuerung und Rolle dieser Gene bei der Entwicklung von Lungenkrebs widerspiegeln. Die Anmelder haben festgestellt, dass Methylierung von p16 in den frühesten zytologischen Stadien eines SCC und Adenokarzinoms nachgewiesen wird. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Inaktivierung von p16 einen frühen Schritt zur Immortalisation der Zelle darstellt, indem sie es den Zellen ermöglicht, dem Immortalitätskontrollpunkt „MO“ zu entgehen. Die Bedeutung von p16 bei der Entwicklung von NSCLC ist aus der Tatsache, dass es in 60% bis 70% der SCC und in bis zu 48% der Adenokarzinome durch Promotormethylierung inaktiviert wird, ersichtlich.

**[0081]** Die Tatsache, dass Promotormethylierung im Bronchialepithel nicht beobachtet wurde und dass nur zwei Sputumproben für Methylierung von RASSF1A positiv waren, deutet darauf hin, dass eine Inaktivierung dieses Gens ein späteres Ereignis bei der malignen Transformation ist. Diese Schlussfolgerung wird durch die Feststellung, dass beide Kontrollpersonen mit einer Methylierung von RASSF1A in ihrem Sputum auch eine Methylierung von mindestens zwei anderen Genen (p16, MGMT und/oder DAP-Kinase) aufwiesen. Diese Feststellungen deuten auf die mögliche Verwendbarkeit multipler Marker für die endgültige Entwicklung von Risikoprofilen.

**[0082]** Die Gene für p16 und DAP-Kinase werden durch Hypermethylierung der Promotoren in nicht malignem Bronchialepithel von gegenwärtigen und früheren Rauchern inaktiviert, was auch in abgeschilferten Zellen im Sputum nachgewiesen wird. Sputumproben enthalten Zellen aus den großen Bronchien und in geringerem Ausmaß Zellen aus kleineren Luftwegen, welche die kleinen Bronchien, Bronchioli und Alveoli. Eine positive Sputumprobe spiegelte Methylierung im Bronchialepithel in 70% der Zeit wieder.

**[0083]** Die vorangehende Offenbarung lässt erkennen, dass Bronchialepithelzellen, die Gene für p16 oder DAP-Kinase, die durch Hypermethylierung der Promotoren inaktiviert wurden, tragen, nach dem Aufgeben des Rauchens weiter bestehen. Mit den Auswirkungen, die eine Stilllegung dieser und anderer kritischer regulatorischer Gene auf das absolute Lungenkrebsrisiko hat, wird man sich durch die Untersuchung von abgeschilferten Zellen in einer biologischen Flüssigkeit wie zum Beispiel Sputum, das eine Zusammensetzung des genetischen Schadens überall in den Luftwegen darstellt, besser auseinandersetzen können. Somit signalisiert das Vorliegen von Promotormethylierung im Sputum von Rauchern, die frei von Krebs sind, ein höheres Lungenkrebsrisiko.

**[0084]** Die vorausgehenden Beispiele können mit ähnlichem Erfolg wiederholt werden, indem die allgemein oder speziell beschriebenen Reaktionspartner und/oder Einsatzbedingungen der Erfindung mit denen, die in den vorausgehenden Beispielen verwendet wurden, ersetzt werden.

**[0085]** Die [Fig. 5](#) und [Fig. 6](#) fassen in tabellarischer Form die PCR-Primer und Anlagerungstemperaturen in Grad Celsius zum Durchführen der PCR-Verfahren der Erfindung der ersten beziehungsweise zweiten Stufe für verschiedene, einzeln aufgeführte Gene einschließlich H-Cadherin, Retinolsäurerezeptor beta und Fragile Histidin Trias zusammen. Es ist daher ersichtlich, dass das erfinderische Verfahren Anwendbarkeit auf andere Gentyphen neben p16, MGMT, DAP-Kinase und RASSF1A findet.

**[0086]** [Fig. 7](#) veranschaulicht die verbesserte Empfindlichkeit für den Nachweis einer Methylierung von p16 gemäß der Erfindung. Die Zelllinie CaLu6 enthält ein methyliertes Gen für p16. DNA, die aus dieser Zelllinie isoliert worden war, wurde fortlaufend mit DNA, die aus normaler menschlicher Lunge isoliert worden war, verdünnt. Die DNA wurde dann mit Bisulfid modifiziert und Primer, welche die Promotorregion von CaLu6 flankierten, wurden für die PCR der ersten Stufe verwendet. In den Bahnen 1–5 der Figur werden die Ergebnisse der PCR der zweiten Stufe mit methylierungsspezifischen Primern dargestellt. Das PCR-Produkt, das die Methylierung anzeigt, ist in DNA, die bis zu 50.000fach mit normaler DNA verdünnt wurde, leicht zu sehen (Bahnen 1–5).

**[0087]** Die Erfindung bietet einen in hohem Maße empfindlichen, robusten und reproduzierbaren Test. Gleichermaßen von Bedeutung ist, dass die Erfindung zur Diagnose von Krebs und zum Überwachen aller Krebsformen beiträgt. Das verschachtelte Verfahren verringert das Problem, auf das man bei der Amplifikation von DNA-Targets (bestimmte Genfragmente), die von suboptimaler Qualität (zum Teil abgebaut) sind, trifft. Die Qualität von DNA, die aus Sputum und/oder Plasma gewonnen wird, ist oft teilweise abgebaut, was bedeutet, dass die Größe der DNA geringer ist als das, was in gesundem Gewebe gefunden wird. Die Auswirkung davon auf PCR ist eine Verringerung der tatsächlichen Menge des bestimmten DNA-Targets, die amplifiziert werden kann, und letztendlich der Empfindlichkeit zum Nachweisen des veränderten Gens. Weil die Erfindung zuerst die Zahl der Kopien des Gens, das beurteilt wird, vermehrt, kann die Menge des Materials, das in die zweite PCR eingesetzt wird, basierend auf der Quantität des Produkts, das durch die erste PCR erzeugt wurde, angepasst werden. Weil die Anlagerungstemperaturen (die Temperatur, bei der sich spezifische Primer an die komplementäre Ziel-DNA anlagern) in der zweiten PCR erhöht werden, verringert dies zusätzlich die Möglichkeit, ein falsch positives Ergebnis zu bekom-

men, ein entscheidendes Problem bei der Entwicklung eines genauen diagnostischen Tests.

**[0088]** Während diese Offenbarung Beispiele, bei denen ein einziges Gen (zum Beispiel p16) Gegenstand der Untersuchung für eine bestimmte Polymerase-Kettenreaktion war, bereitstellte, sollte weiterhin vermerkt werden, dass das erfinderische Verfahren auch mit einer Mehrzahl von zwei oder mehr Genen, die im Lauf einer einzigen Prozedur auf Methylierung untersucht werden, praktiziert werden kann. Zum Beispiel kann, abhängig von Beschränkungen, die erhebliche Unterschiede bei den Molekulargewichten erfordern, ein einziges verschachteltes PCR-Verfahren gemäß der Erfindung durchgeführt werden, um simultan nach mehr als einem Marker wie zum Beispiel Methylierung von sowohl p16 als auch MGMT zu suchen. Es können zum Beispiel Risikoprofile erstellt werden, indem man Kombinationen von Markern, die mit der Erfindung untersucht werden, betrachtet. Dementsprechend kann das erfinderische Verfahren gleichzeitiges Untersuchen multipler Marker in biologischen Flüssigkeiten in einer einzigen Reaktion mit sich bringen, um das Risiko zu ermitteln und Überwachung, Vorbeugung und Prognose zu erbringen. Weiter können verschiedene Marker Gegenstand getrennter Verfahren sind, um zusätzlichen Wert zum Nachweis und zur Überwachung und eine gesteigerte Wirksamkeit und Zuverlässigkeit der Gesamterfindung zu bieten.

**[0089]** Das Verfahren der Erfindung kann durch die Verwendung eines Laborkits angewendet werden. Kits zum Anwenden der Erfindung können angepasst werden, um die Materialien, die benötigt werden, um eine Untersuchung, die für einen bestimmten Typ einer Körperflüssigkeit spezifisch ist, durchzuführen, bereitzustellen, und/oder so angepasst werden, dass sie spezielle Promotorgene, die für den Fachmann von Interesse sind, betreffen.

**[0090]** Die Entwicklung von Biomarkern für Methylierung unter Verwendung der Erfindung erlaubt den Nachweis von vielen Typen früher Malignome, die Lunge, Leber, Kopf und Hals, Leukämie, kolorektal, Prostata und Blase einschließen, aber nicht darauf beschränkt sein würden. Wenn der sich ergebende Tumor einmal identifiziert ist und eine entsprechende Intervention vorgenommen ist, können die Biomarker auch dazu verwendet werden, ein erneutes Auftreten der Krankheit und die Reaktion auf adjuvante Therapie wie zum Beispiel Chemotherapeutika zu überwachen. Eine zusätzliche Einsatzmöglichkeit der Methode betrifft speziell Lungenkrebs, wo der Tumor oft nicht für eine Gewinnung von Gewebeproben in großem Umfang zugänglich ist. Durch die Verwendung von biologischen Flüssigkeiten wie zum Beispiel Serum, Plasma oder Sputum ist es möglich, die Gene, die durch Hypermethylierung von Promotoren inaktiviert wurden, nicht invasiv zu ermitteln. Diese Infor-

mation kann dazu verwendet werden, die Therapie anzupassen.

**[0091]** Schließlich können viele Malignome Jahre brauchen, um sich zu entwickeln, und dafür anfällige Personen durchleben eine Periode der Prä malignität, in der Zellen oder DNA, die Biomarker für Methylierung tragen, abgesondert werden können. Die Erfindung ist zum Identifizieren von Individuen, die anschließend in Präventiv-Interventionsstudien, die Nahrungszusatzstoffe, die dazu ausgelegt sind, diesen prä malignen Zustand zu hemmen oder rückgängig zu machen, verwenden, aufgenommen werden könnten, nützlich. Die Biomarker für Methylierung können auch dazu verwendet werden, die Wirksamkeit der Interventionen zu überwachen, indem festgestellt wird, ob der vorher nachgewiesene Biomarker für Methylierung während des Laufs der Intervention persistiert oder verschwindet. Die Wirksamkeit von jeder der im Fachgebiet bekannten Interventionen, die Immunmodulation, Gentherapie, Antisense-Therapie, alkylierende Behandlungen und ähnliche beinhalten, aber nicht darauf beschränkt sind, kann überwacht werden.

**[0092]** Obwohl die Erfindung ausführlich mit besonderer Bezugnahme auf diese bevorzugten Ausführungsformen beschrieben wurde, können andere Ausführungsformen dieselben Ergebnisse erzielen. Variationen und Modifikationen der vorliegenden Erfindung werden für Fachleute offensichtlich sein.

### Patentansprüche

1. Verfahren zur Krebsüberwachung in Zellen, welches das Detektieren des Vorliegens von genspezifischer Promotormethylierung von DNA der Zellen umfasst, was die folgenden Schritte umfasst:

- a) die DNA einer Bisulfitmodifikation aussetzen,
- b) die Zahl der Kopien von mindestens einem spezifischen Gen vergrößern, indem eine Polymerase-Kettenreaktion mit einem ersten Primersatz verwendet wird, um einen Teil des Gens, wo sich die Promotormethylierung befindet, zu amplifizieren, womit ein Amplifikationsprodukt geschaffen wird und
- c) eine Teilprobe des von der ersten Polymerase-Kettenreaktion erzeugten Amplifikationsprodukts in einer zweiten, methylierungsspezifischen Polymerase-Kettenreaktion bei einer Anlagerungstemperatur, welche die Schmelztemperatur eines zweiten Primersatzes übersteigt, verwenden, um das Vorliegen einer Inaktivierung des mindestens einen spezifischen Gens zu detektieren.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Anlagerungstemperatur 4–6°C über der Schmelztemperatur des zweiten Primersatzes liegt.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei der Schritt des Vergrößerns der Zahl der Kopien mindes-

tens eines spezifischen Gens das Vergrößern der Zahl der Kopien von mehr als einem spezifischen Gen umfasst.

4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei der Schritt des Vergrößerns der Zahl der Kopien von mehr als einem Gen das Vergrößern der Zahl der Kopien von mindestens zwei Genen, die ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus p16, MGMT, RASSF1A Gen, H-Cadherin, Retinolsäurerezeptor beta Gen und Fragile Histidin Trias Gen, umfasst.

5. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei der Schritt des Vergrößerns der Zahl der Kopien eines spezifischen Gens das Amplifizieren eines einzelnen Gens umfasst.

6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei der Schritt des Vergrößerns der Zahl der Kopien eines einzelnen Gens das Amplifizieren des p16 Gens umfasst.

7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei der Schritt des Amplifizierens des p16 Gens das Amplifizieren eines Fragments von 280 Basenpaaren mit einem Primersatz umfasst, der:  
 vorwärts 5' GAGGAAGAAAGAGGAGGGTGTG 3'  
 rückwärts 5' ACAACCCTCTACCCACCTAAATC 3'  
 umfasst.

8. Verfahren nach Anspruch 5, wobei der Schritt des Vergrößerns der Zahl der Kopien eines einzelnen Gens das Amplifizieren des MGMT Gens umfasst.

9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei der Schritt des Amplifizierens des MGMT Gens das Amplifizieren eines Fragments von 289 Basenpaaren mit einem Primersatz umfasst, der:  
 vorwärts 5' GTTYGGATATGTTGGGATAGTT 3'  
 rückwärts 5' AACACTTAAACRCACCTAAACTC 3'  
 umfasst.

10. Verfahren nach Anspruch 5, wobei der Schritt des Vergrößerns der Zahl der Kopien eines einzelnen Gens das Amplifizieren des DAP-Kinase Gens umfasst.

11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei der Schritt des Amplifizierens des DAP-Kinase Gens das Amplifizieren eines Fragments von 209 Basenpaaren mit einem Primersatz umfasst, der:  
 vorwärts 5' GGTTGTTYGGAGTGTGAGGAGG 3'  
 rückwärts 5' ACGCTATCGAAAACCGACCATAAAC 3'  
 umfasst.

12. Verfahren nach Anspruch 5, wobei der Schritt des Vergrößerns der Zahl der Kopien eines einzelnen Gens das Amplifizieren des RASSF1A Gens umfasst.

13. Verfahren nach Anspruch 12, wobei der Schritt des Amplifizierens des RASSF1A Gens das Amplifizieren eines Fragments von 260 Basenpaaren mit einem Primersatz umfasst, der:  
 vorwärts 5' GGAGGGAAGGAAGGGTAAGG 3'  
 rückwärts 5' CAACTCAATAAACTCAAACCTCCC 3'  
 umfasst.

14. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, in dem die Zellen menschliche Zellen sind und das mindestens eine spezifische Gen das Gen, das vom Krebs verändert wird, ist.

15. Verfahren nach Anspruch 14, wobei die menschlichen Zellen aus einer biologischen Flüssigkeits- oder Gewebeprobe, die gewonnen wurde, stammen.

16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei die biologische Probe aus Gewebe, Plasma, Ejakulat, Liquor cerebrospinalis, Serum, Milchgangflüssigkeit, Urin, Stuhl und Sputum ausgewählt ist.

17. Verfahren nach den Ansprüchen 14–16, wobei der Schritt des Vergrößerns der Zahl der Kopien des Gens das Amplifizieren des p16 Gens umfasst.

18. Verfahren nach Anspruch 17, wobei der Schritt des Amplifizierens des p16 Gens das Amplifizieren eines Fragments von 280 Basenpaaren mit einem Primersatz wie in Anspruch 7 angegeben umfasst.

19. Verfahren nach den Ansprüchen 14–16, wobei der Schritt des Vergrößerns der Zahl der Kopien des Gens das Amplifizieren des MGMT Gens umfasst.

20. Verfahren nach Anspruch 19, wobei der Schritt des Vergrößerns der Zahl der Kopien eines spezifischen Gens das Amplifizieren eines Fragments von 289 Basenpaaren mit einem Primersatz wie in Anspruch 9 angegeben umfasst.

21. Verfahren nach den Ansprüchen 14–16, wobei der Schritt des Vergrößerns der Zahl der Kopien eines spezifischen Gens das Amplifizieren des DAP-Kinase Gens umfasst.

22. Verfahren nach Anspruch 21, wobei der Schritt des Vergrößerns der Zahl der Kopien eines spezifischen Gens das Amplifizieren eines Fragments von 209 Basenpaaren mit einem Primersatz wie in Anspruch 11 angegeben umfasst.

23. Verfahren nach den Ansprüchen 14–16, wobei der Schritt des Vergrößerns der Zahl der Kopien eines spezifischen Gens das Amplifizieren des RASSF1A Gens umfasst.

24. Verfahren nach Anspruch 23, wobei der Schritt des Vergrößerns der Zahl der Kopien eines spezifischen Gens das Amplifizieren eines Fragments von 260 Basenpaaren mit einem Primersatz wie in Anspruch 13 angegeben umfasst.

25. Verfahren gemäß den Ansprüchen 15–16, in dem das Verfahren weiter den folgenden Schritt umfasst:

die DNA in der biologischen Flüssigkeits- oder Gewebeprobe mit einem ersten Primersatz in Kontakt bringen, um die Zahl der Kopien eines Teils des Gens, wo sich die CpG-Inseln des Promotors befinden, unter Verwendung einer Polymerase-Kettenreaktion zu erhöhen, um ein Amplifikationsprodukt zu schaffen.

26. Verfahren nach Anspruch 25, wobei der Schritt des Vergrößerns der Zahl der Kopien des Gens das Amplifizieren des p16 Gens umfasst.

27. Verfahren nach Anspruch 26, wobei der Schritt des Amplifizierens des p16 Gens das Amplifizieren eines Fragments von 280 Basenpaaren mit einem Primersatz wie in Anspruch 7 angegeben umfasst.

28. Verfahren nach Anspruch 25, wobei der Schritt des Vergrößerns der Zahl der Kopien des Gens das Amplifizieren des MGMT Gens umfasst.

29. Verfahren nach Anspruch 28, wobei der Schritt des Vergrößerns der Zahl der Kopien eines spezifischen Gens das Amplifizieren eines Fragments von 289 Basenpaaren mit einem Primersatz wie in Anspruch 9 angegeben umfasst.

30. Verfahren nach Anspruch 25, wobei der Schritt des Vergrößerns der Zahl der Kopien des Gens das Amplifizieren des H-Cadherin Gens umfasst.

31. Verfahren nach Anspruch 25, wobei der Schritt des Vergrößerns der Zahl der Kopien des Gens das Amplifizieren des Retinolsäurerezeptor beta Gens umfasst.

32. Verfahren nach Anspruch 25, wobei der Schritt des Vergrößerns der Zahl der Kopien des Gens das Amplifizieren des Fragilen Histidin Trias Gens umfasst.

33. Verfahren gemäß den Ansprüchen 14–16 zum Detektieren und Überwachen eines bestimmten Krebses, in welchem die DNA in der biologischen Probe vorliegt und in welchem der Schritt b) das Vergrößern der Zahl der Kopien eines Teils des Gens, wo sich die CpG-Inseln des Promotors befinden, unter Verwendung einer Polymerase-Kettenreaktion umfasst, womit ein Amplifikationsprodukt geschaffen

wird, welches Fragmente eines Gens, das ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus dem p16 Gen, dem MGMT Gen, dem DAP-Kinase Gen und dem RASSF1A Gen, enthält, um das Vorliegen einer Inaktivierung des Gens, das von dem bestimmten Krebs verändert wird, zu detektieren.

34. Verfahren nach Anspruch 33, wobei die gewonnene biologische Probe Sputum umfasst.

Es folgen 12 Blatt Zeichnungen

## Anhängende Zeichnungen

**Methylierung der Gene für p16 und MGMT in Tumor/Sputum-Paaren zum Zeitpunkt der Diagnose**

Fall	Einwirkung von	Probe	Zytologie	Methylierung	
				p16	MGMT
1	Tob/ Radon	SCC	NA	M	U
		Sputum	Geringe Atypie	M	U
2	Tob/ Radon	SCC	NA	U	M
		Sputum	SCC	U	M
3	Tob/ Radon	SCC	NA	U	M
		Sputum	SCC	U	M
4	Tob	SCC	NA	M	M
		Sputum	SCC	M	U
5	Tob	SCC	NA	M	M
		Sputum	SCC	M	U
6	Tob/ Radon	SCC	NA	M	U
		Sputum	Mod. Dyspl.	M	U
7	Tob	SCC	NA	M	M
		Sputum	Deutliche Dyspl.	M	M
8	Tob	SCC	NA	M	U
		Sputum	Mod. Dyspl.	M	M
9	Tob	SCC	NA	M	U
		Sputum	Mod. Dyspl.	M	U
10	Tob/ Radon	SCC	NA	M	M
		Sputum	Deutliche Dyspl.	M	M

Methylierungsstatus der Gene für p16 und MGMT in Tumoren und Sputum, gewonnen zum Zeitpunkt der Diagnose. Abkürzungen: Tob: Tabak; SCC: Plattenepithelkarzinom; NA: nicht anwendbar; M: methyliert; U: unmethyliert; Mod. Dyspl.: mäßige Dysplasie

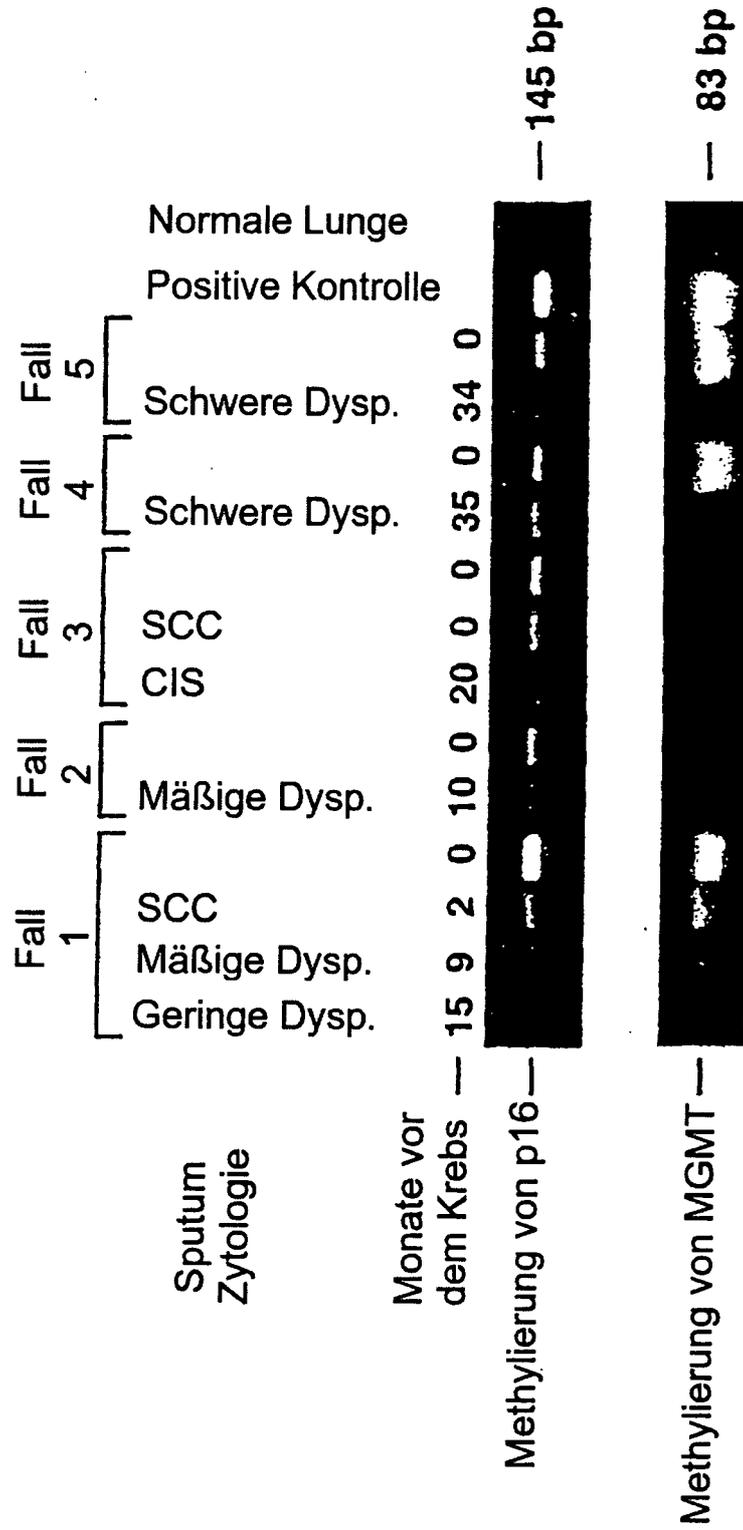
FIGUR 1

**Methylierung der Gene für p16 und MGMT im Sputum geht der klinischen  
Diagnose des SCC voraus**

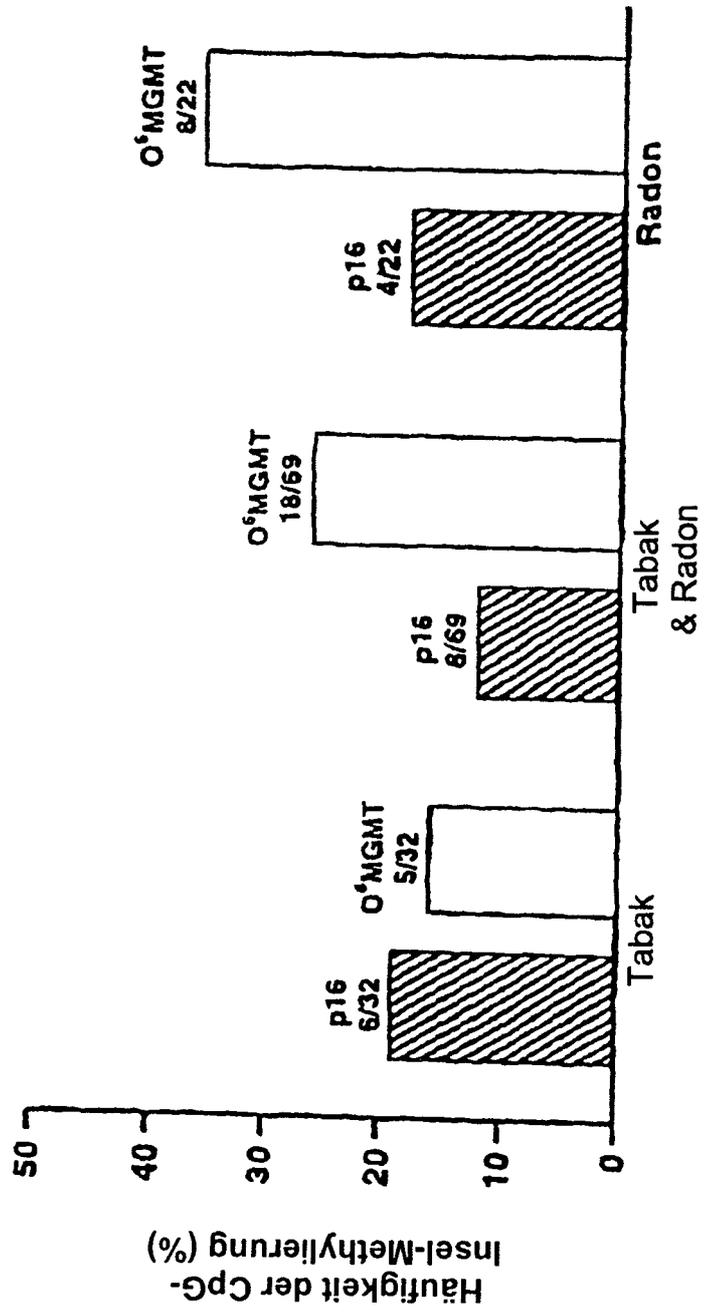
Fall	Einwirkung von	Probe	Monate vor dem Krebs	Zytologie	Methylierung	
					p16	MGMT
1	Tob/ Radon	SCC	0	NA	U	M
		Sputum	5	Mod. Dyspl.	M	M
2	Tob/ Radon	SCC	0	NA	M	M
		Sputum	5	Verdächtig	M	M
		Sputum	5	Verdächtig	M	M
		Sputum	5	Deutliche Dyspl.	M	M
3	Tob/	SCC	0	NA	M	M
		Sputum	6	SCC	M	M
4	Tob/ Radon	SCC	0	NA	M	U
		Sputum	10	Mod. Dyspl.	M	U
5	Tob/ Radon	SCC	0	NA	M	M
		Sputum	8	Verdächtig	M	M
		Sputum	13	Verdächtig	M	M
6	Tob/ Radon	SCC	0	NA	M	M
		Sputum	2	SCC	M	M
		Sputum	9	Mod. Dyspl.	M	M
		Sputum	15	Geringe Atypie	M	U
7	Tob/ Radon	SCC	0	NA	M	M
		Sputum	5	Mod. Dyspl.	M	M
		Sputum	15	Mod. Dyspl.	M	M
8	Tob/ Radon	SCC	0	NA	M	M
		Sputum	8	Verdächtig	M	M
		Sputum	20	Verdächtig	M	M
9	Tob/ Radon	SCC	0	NA	M	U
		Sputum	0	SCC	M	U
		Sputum	20	CIS	M	U
10	Tob	SCC	0	NA	M	M
		Sputum	34	Schwere Dyspl.	M	U
11	Tob	SCC	0	NA	M	M
		Sputum	35	Schwere Dyspl.	M	U

Methylierungsstatus der Gene für p16 und MGMT in Tumoren und Sputum, gewonnen von 11 verschiedenen Fällen. Abkürzungen: Tob: Tabak; SCC: Plattenepithelkarzinom; NA: nicht anwendbar; M: methyliert; U: unmethyliert; CIS: Carcinoma in situ; Dyspl.: Dysplasie; Verdächtig: verdächtig auf Malignität.

FIGUR 2



FIGUR 3



FIGUR 4

<u>Gen</u>	<u>Primer (5' – 3')</u>	<u>Anlagerungs-</u> <u>zeit</u>
P16-Cyclinabhängige Kinase Inhibitor 4a	GAGGAAGAAAGAGGAGGGGTTG	60
	ACAAACCCTCTACCCACCTAAATC	60
O6-Methylguanin-DNA Methyltransferase	GTTYGGATATGTTGGGATAGTT	60
	AACACTTAAACRCACCTAAAACCTC	60
Death-associated Proteinkinase	GGTTGTTYGGAGTGTGAGGAGG	60
	ACGCTATCGAAAACCGACCATAAAC	60
RAS-associated Familie 1 Gen	GGAGGGAAGGAAGGGTAAGG	60
	CAACTCAATAAACTCAAACCTCCC	60
H-Cadherin	TTTTTAYGGAAAATATGTTTAGTGTAGT	60
	TAAACTCRAAATAACCTCCCTACC	60
Retinolsäurerezeptor beta	TTTATGYGAGTTGTTTGAGGATTGG	60
	AATCCAAATAATCATTTACCATTTTCC	60
Fragile Histidin Trias	GGTTATTTAGTGGGTATATTTTTAGG	60
	RAATCCCCACCCTAAAACCCTC	60

Y = C + T, R = A + G

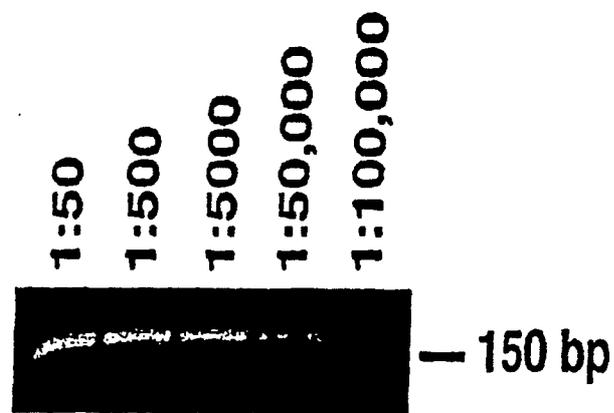
FIGUR 5

**PCR der Stufe 2**

<b><u>Gen</u></b>	<b><u>Primer (5' – 3')</u></b>	<b><u>Anlagerungs- zeit</u></b>
P16-Cyclinabhängige Kinase Inhibitor 4a	GAGGGTGGGGCGGATCGC	70
	GACCCCGAACCGCGACCG	70
O6-Methylguanin-DNA Methyltransferase	ACGTTTTGCGTTTCGACGTTC	68
	ACCCCCACCCGACGACG	68
Death-associated Proteinkinase	ATAGTCGGATCGAGTTAACGTC	70
	AAAAC TAACCGAAACGACGACG	70
RAS-associated Familie 1 Gen	GGGGTTTTGCGAGAGCGC	68
	CCCGATTAAACCCGTA CTTCG	68
H-Cadherin	GAATGAAAACGTCGTCGGGC	68
	ATCTATCTTCGCCGCCGCG	68
Retinolsäurerezeptor beta	GTCGAGAACGCGAGCGATTC	68
	CGACCAATCCAACCGAAACG	68
Fragile Histidin Trias	GGCGGCGTTTCGGTTTCGC	68
	GCCCCGTAAACGACGCCG	68

FIGUR 6

**Verdünnung von CaLu-6  
mit normaler DNA**



FIGUR 7

**Zusammenfassung von ausgewählten demographischen Variablen nach Untersuchungsgruppe**

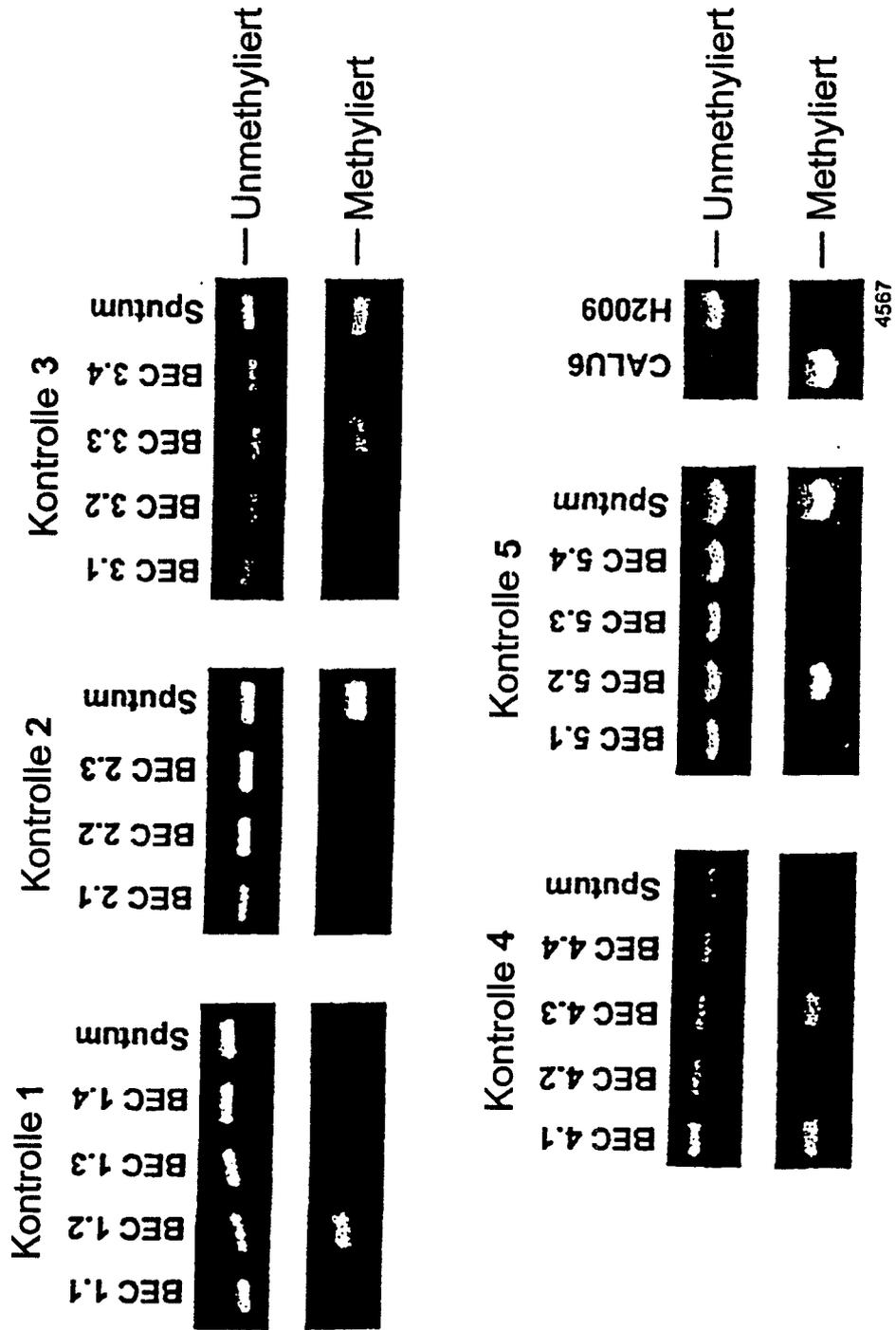
Variable	Fälle (n = 52)	Kontrollen (n = 89)
Alter (Jahre)	68 (44, 79) <sup>a</sup>	67 (45, 81) <sup>a</sup>
Geschlecht (% männlich)	96	99
Ethnizität (%)		
Weiß („Kaukasisch“)	67	69
Lateinamerikanisch	21	27
Afroamerikanisch	9	1
Amerikanische Ureinwohner	2	2
Raucherstatus (% gegenwärtig)	28	32
Dauer des Rauchens (Jahre)	50 (18, 66) <sup>a</sup>	36 (3, 64) <sup>a,b</sup>
Rauchen, Pack Years	66 (18, 177) <sup>a</sup>	48 (1, 183) <sup>a,b</sup>
Rauchen, Zeit seit Beendigung (Jahre)	3 (1, 34) <sup>a</sup>	20 (1, 42) <sup>a,b</sup>

Statistische Vergleiche werden zwischen Fällen und Kontrollen angestellt.

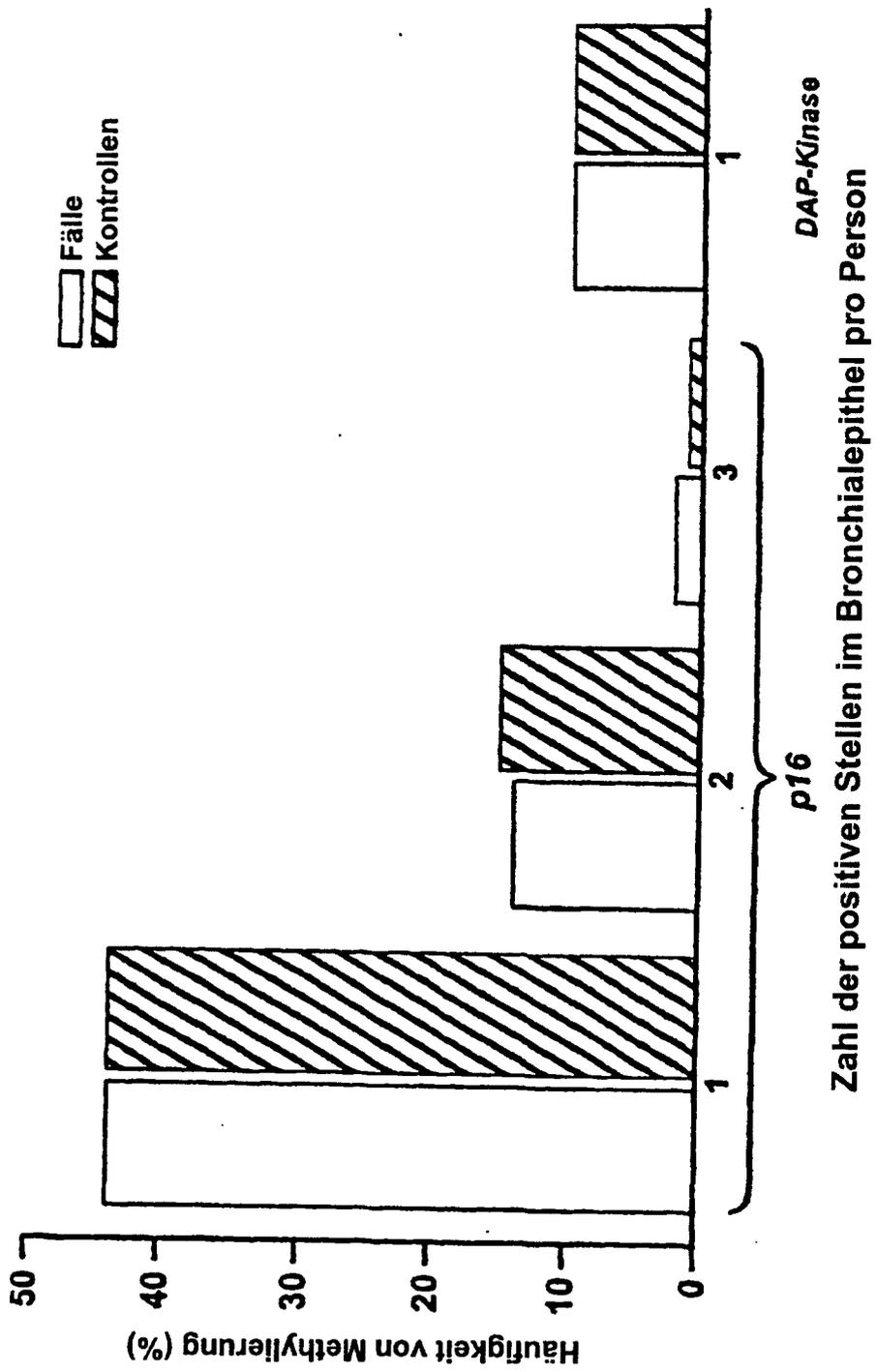
<sup>a</sup> Median (Minimum, Maximum)

<sup>b</sup>  $p < 0,005$

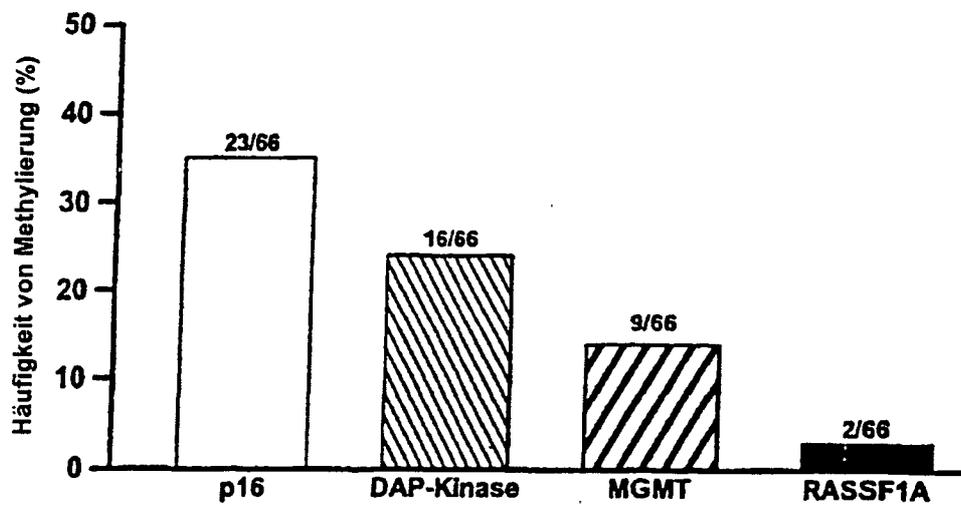
FIGUR 8



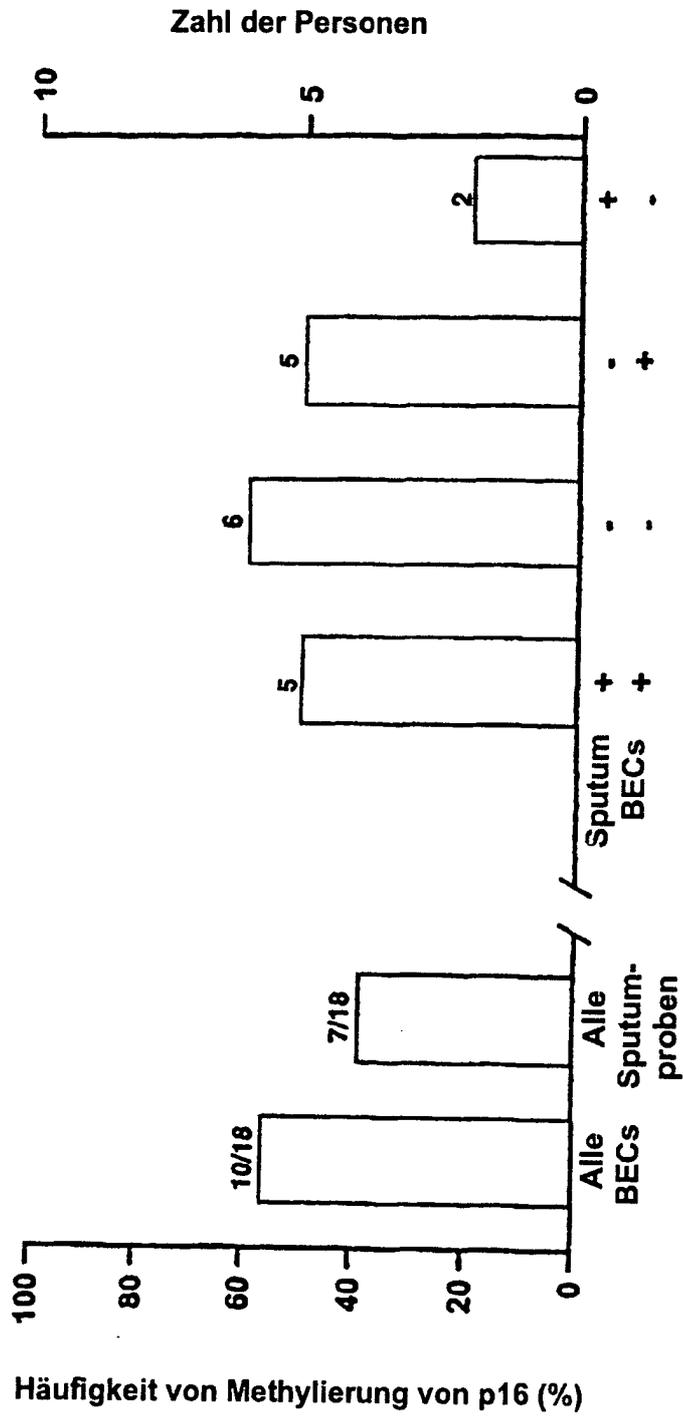
FIGUR 9



FIGUR 10



FIGUR 11



FIGUR 12