Dr. med Christof Weinstock

Störung der blutgruppenserologischen Untersuchungen durch therapeutische monoklonale Antikörper

Zusammenfassung

Krankheiten und Medikamente verursachten bislang in Einzelfällen Störungen der blutgruppenserologischen Untersuchungen. Zwei der neuen therapeutischen monoklonalen Antikörper sind gegen Antigene gerichtet, die sich auch auf Erythrozyten befinden, und erschweren die Untersuchungen nun bei jedem der damit behandelten Patienten. Daratumumab (Anti-CD38) ist zur Therapie des Multiplen Myeloms zugelassen und wird breit angewendet, für Hu5F9-G4 (Anti-CD47) werden Studien in den USA und in Großbritannien durchgeführt. Daratumumab macht den Antikörpersuchtest und Verträglichkeitsproben im indirekten Antiglobulin-Test reaktiv und kann dadurch anti-erythrozytäre Antikörper verdecken. Der Artikel beschreibt die Möglichkeiten, trotz dieser Störung die serologische Verträglichkeit von Erythrozytenkonzentraten zu gewährleisten.

Summary

Illness and medication may interfere with blood group serology. Two of the new therapeutic monoclonal antibodies are directed against antigens which are also expressed by red blood cells and interfere with the diagnostic procedures in the immunohaematology laboratory. Daratumumab (anti-CD38) has approval for therapy of multiple myeloma, Hu5F9-G4 (anti-CD47) currently is tested in the United States and in Great Britain. Daratumumab interferes with the indirect antiglobulin test and may hide allo-reactive red cell antibodies. This article reviews the various methods to mitigate this interference.

ERKRANKUNGEN UND ARZNEIMITTEL KÖNNEN BLUTGRUPPENSEROLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN STÖREN

Der Auftrag des blutgruppenserologischen Labors ist die Bestimmung von Blutgruppenmerkmalen auf den Erythrozyten und die Entdeckung von Antikörpern gegen fremde Blutgruppenmerkmale im Plasma einer Blutprobe. Ziel aller Anstrengungen ist die Bereitstellung serologisch verträglicher Blutprodukte. Im Falle von Erythrozytenkonzentraten wird die serologische Verträglichkeit durch eine nicht-reaktive („negative“) Verträglichkeitsprobe, auch Kreuzprobe genannt, vorhergesagt.

Erkrankungen können Veränderungen mit sich bringen, die diese Untersuchungen stören. Leukämien lassen Blutgruppenmerkmale verschwinden, Erkrankungen, die mit erhöhten Konzentrationen von Plasmaproteinen einhergehen (z. B. Fibrinogen, α2-Makroglobulin oder IgM), fördern in vitro die Formation von sogenannten Geldrollen und täuschen dabei Agglutinationen vor und Autoimmunhämolysen werden von Antikörpern verursacht, die Suchteste und Kreuzproben reaktiv („positiv“) ausfallen lassen.

Zu diesen erkrankungsbedingten Störungen gesellten sich Störungen durch Medikamente. Dextran und Hydroxyethylstärke mit hohem Molekulargewicht befördern ebenfalls die Geldrollenbildung. In früheren Jahren brachten manche Chargen von Anti-Thymozyten-Globulin (ATG) anti-erythrozytäre Antikörper mit, die bei den Patienten den direkten Coombs-Test und den Antikörpersuchtest positiv ausfallen ließen[1]. Antibiotika, insbesondere Penicilline und Cephalosporine, bilden mit Antikörpern des Patienten Immunkomplexe und lagern sich auf den Patientenerythrozyten ab. Viele dieser Patienten bekommen so einen positiven direkten Coombs-Test (Antiglobulin-Test) und lassen das Labor im ersten Moment an eine immunhämolytische Reaktion und neu aufgetretene anti-erythrozytäre Antikörper denken. Andere Medikamente sind in der Lage, das Immunsystem zur Bildung von Wärmeautoantikörpern anzuregen, die dann ebenfalls an die Patientenerythrozyten binden und, wenn im Überschuss produziert, frei im Plasma vorliegen und den Antikörpersuchtest sowie Verträglichkeitsproben positiv ausfallen lassen. Bei einem Teil dieser Patienten verursachen die Wärmeautoantikörper eine medikamentenabhängige Immunhämolyse.

STÖRUNGEN DURCH NEUE ARZNEIMITTEL: DARATUMUMAB

Die eben beschriebenen Interferenzen wurden vereinzelt beobachtet, nur ein Teil der Patienten, die die auslösenden Medikamente erhielten, fiel tatsächlich durch Störungen der blutgruppenserologischen Diagnostik auf. Die Situation änderte sich, als im Jahr 2015 der humane monoklonale Antikörper Daratumumab (Darzalex®) in den immunhämatologischen Laboren aufschlug. Jeder mit Daratumumab behandelte Patient reagierte im Antikörpersuchtest und in den Verträglichkeitsproben positiv. Zunächst standen die Labore von Studienzentren vor dieser Herausforderung, 2016 nach der Zulassung zur Drittlinienbehandlung des Multiplen Myeloms waren dann auch großflächig die Labore anderer Kliniken und Praxen betroffen. 2018 wurde Daratumumab zur Erstlinientherapie zugelassen. Das heißt, nun dürfen auch Patienten mit neu diagnostiziertem Multiplen Myelom, die nicht für eine autologe Stammzelltransplantation in Frage kommen, von Beginn an mit Daratumumab behandelt werden (in Kombination mit Bortezomib, Melphalan und Prednison). Mit der Verbreiterung der Einsatzmöglichkeit des Daratumumab wird die zu erwartende Zahl an Patienten mit Störungen der Blutgruppenserologie noch einmal ansteigen. Und Daratumumab wird nicht alleine bleiben, derzeit werden mit Isatuximab (SAR-650984) und MOR202 zwei weitere monoklonale Antikörper von anderen Herstellern in klinischen Studien auf ihre therapeutische Wirksamkeit und Sicherheit untersucht. Berichten der Labore der Studienzentren zufolge verhalten sie sich bei blutgruppenserologischen Untersuchungen ähnlich wie Daratumumab[2], so dass die im Folgenden berichteten Erfahrungen mit Daratumumab auch auf diese Antikörper übertragbar sein dürften.

Alle drei Antikörper sind gegen CD38 gerichtet, ein 45-kDa-Glykoprotein, das von nahezu allen Zellen des Körpers zumindest in bestimmten Entwicklungsstadien exprimiert wird[3]. In der Zellmembran existieren zwei Varianten des CD38-Proteins: Die Typ-II-Variante zeigt mit der katalytischen Domäne in den extrazellulären Raum und ist das Antigen, an das Daratumumab bindet. Bei der Typ-III-Variante ist die katalytische Domäne intrazellulär orientiert[4]. CD38 katalysiert sowohl die Synthese als auch die Hydrolyse von zyklischem Adenosindiphosphat-Ribosyl (cADPR). Des Weiteren katalysiert CD38 die Umwandlung von Nicotinamidadenosindinukleotidphosphat (NADP) in Nicotinsäureadenosinnukleotidphosphat (NAADP). Sowohl cADPR als auch NAADP sind Second Messenger, die Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern freisetzen. Calcium-Ionen sind wichtig für viele intrazelluläre Prozesse, darunter Genexpression und Zellteilung.[5] Weitere Liganden und Funktionen von CD38, seine Interaktionen mit anderen Membranproteinen[6] und seine Rolle in Zellphysiologie und Pathophysiologie werden intensiv untersucht[7]. Bei Multiplem Myelom und bei chronisch-lymphatischen Leukämien ist die CD38-Expression durch die malignen Zellen deutlich erhöht. Die erhöhte CD38-Expression wird zum einen als Marker für eine schlechte Prognose verwendet. Zum anderen wird sie therapeutisch genutzt: Nur an stark exprimierende Zellen binden genügend viele Anti-CD38-Antikörper und erreichen die kritische Dichte, die erforderlich ist zur Aktivierung der Effektormechanismen komplementvermittelte Lyse, antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität und Induktion von Apoptose[7]. Andere Körperzellen, einschließlich der Erythrozyten, tragen deutlich weniger CD38 auf ihrer Oberfläche und entkommen so den Angriffen von Daratumumab. Über Erythrozyten wurde berichtet, dass viele Menschen gleichzeitig eine stark und eine schwach exprimierende Population besitzen sollen[8].

Die schwache Expression von CD38 schützt die Erythrozyten unter der Therapie mit Anti-CD38 vor messbarer Hämolyse[9], sie reicht aber aus, um so viele Antikörper zu binden, dass sie im indirekten Coombs-Test durch positive Reaktionen entdeckt werden. Deshalb sorgten die Proben der mit Daratumumab behandelten Testzellen anfangs in den Laboren für größere Aufregung: Die Plasmen dieser Patienten reagierten mit allen Testzellen positiv. Das betraf sowohl den Antikörpersuchtest als auch die Verträglichkeitsprobe. Die Patientenerythrozyten waren überraschenderweise von dieser Störung nicht betroffen: Eigenkontrolle (Patientenerythrozyten inkubiert mit Patientenplasma, anschließend untersucht im Coombs-Test) und der direkte Coombs-Test der Patientenerythrozyten reagierten meistens unauffällig negativ. Warum, das ist bis heute unklar. Entweder werden die CD38 stark exprimierenden Erythrozyten der Patienten kurz nach der Infusion des Antikörpers hämolysiert[8] oder die Antigene verschwinden unter der Wirkung des Antikörpers von der Zelloberfläche[10].

Da die patienteneigenen Erythrozyten in der Regel nicht mit Daratumumab beladen sind, können die Blutgruppenmerkmale ganz normal bestimmt werden, auch der Bedside-Test vor der Transfusion von Erythrozytenkonzentraten wird nicht gestört. Gestört werden Antikörpersuchtest, Antikörperidentifizierung und Verträglichkeitsproben. Eine negative Eigenkontrolle und positive Reaktionen mit allen Testzellen läuten bei den Mitarbeitern im Labor die Alarmglocken, weisen sie doch auf einen Alloantikörper gegen ein hochfrequentes Antigen hin. Antikörper gegen hoch-

frequente Antigene bedeuten aufwändige und langwierige Untersuchungen zur Feststellung der Spezifität des Antikörpers und große Schwierigkeiten, kompatible Präparate oder Spender zu finden. Reaktive Antikörpersuchteste und Verträglichkeitsproben können eventuell vorhandene zusätzliche Antikörper maskieren. Lägen zum Beispiel noch ein Anti-Fy^a oder ein Anti-Jk^a vor, beides klinisch relevante Antikörper, die immer wieder Hämolysen verursachen, dann würde deren Reaktion in der Verträglichkeitsprobe überdeckt. Gäbe man notgedrungen Erythrozytenkonzentrate mit reaktiven Verträglichkeitsproben aus, könnte es passieren, dass Präparate darunter sind, deren Inkompatibilität man nicht erkannt hatte.

Die Titer des freien Daratumumab sind hoch, oft liegen sie bei 512 oder 1024, aber die Reaktionen sind im Verhältnis dazu überraschend schwach, sie fallen meistens zweifach positiv aus. Die geringe Antigendichte von CD38 auf den Erythrozyten reicht nicht für starke Reaktionsausfälle in den üblicherweise verwendeten Gelkärtchen aus.

MÖGLICHKEITEN DER STÖRUNGSBEGRENZUNG

Daratumumab verschwindet nur langsam aus dem Plasma. Nach Angaben des Herstellers muss noch sechs Monate nach der letzten Infusion mit Störungen im indirekten Coombs-Test gerechnet werden. Wie also kann ein Labor während der Therapie und in der nachfolgenden Abklingzeit die durch Daratumumab verursachten Störungen umgehen?

Die Deutsche Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie (DGTI) veröffentlichte 2016 eine Empfehlung zum Vorgehen bei serologischen Störungen durch den therapeutischen monoklonalen Antikörper Daratumumab[11]. In der Empfehlung werden zwei Wege beschrieben, auf denen die Störungen durch Daratumumab umgangen werden können. Die Empfehlung dient der Bestätigung, dass Labore, die einen dieser Wege beschreiten zwar von der Richtlinie Hämo-

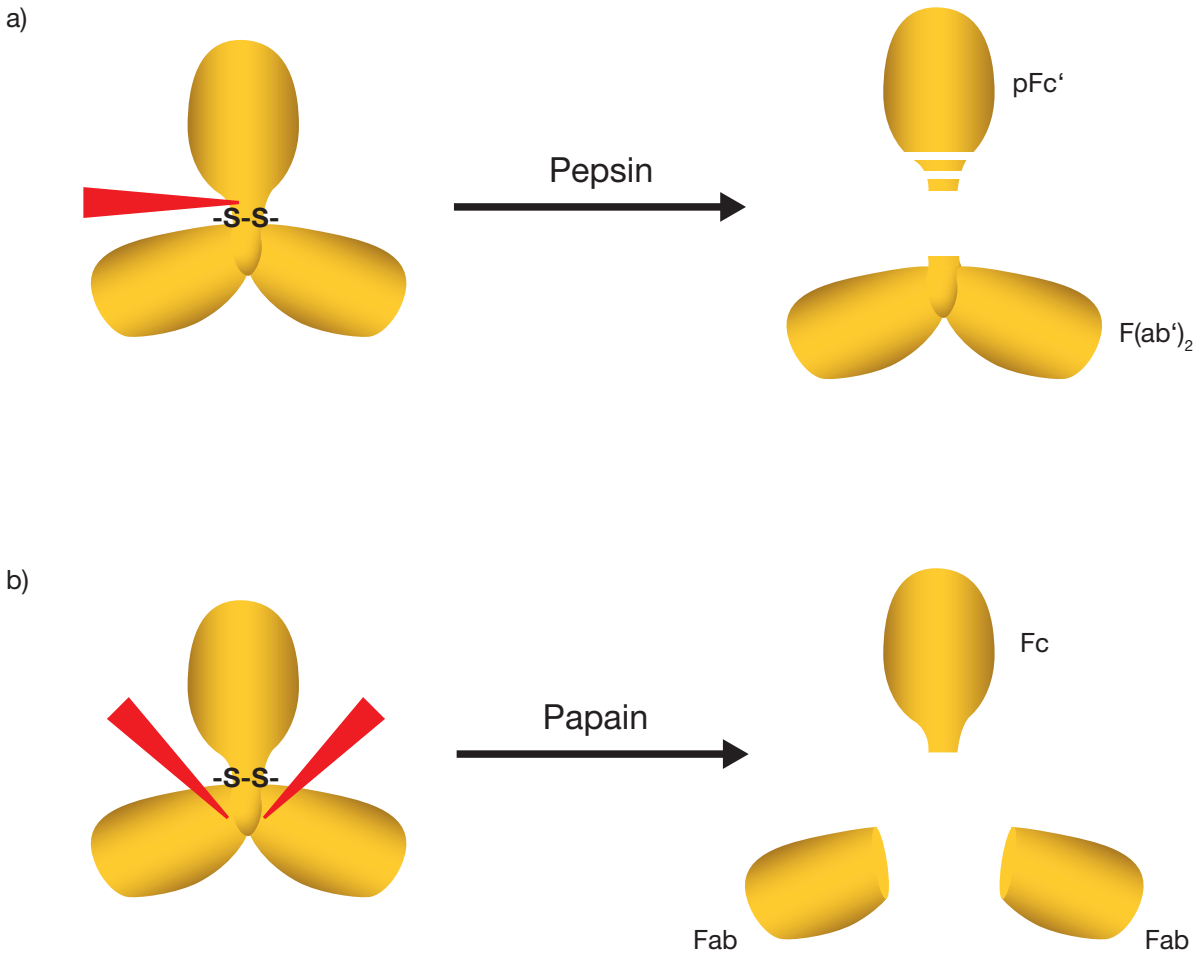

Abbildung 1a: Pepsin spaltet Daratumumab in ein F(ab‘)$_2$-Fragment, ein partielles Fc(pFc)-Fragment und in mehrere kleinere Fragmente
Abbildung 1b: Papain spaltet Daratumumab in zwei Fab-Fragmente und ein Fc-Fragment

therapie abweichen, dass diese Abweichung aber dem momentanen Stand von Wissenschaft und Technik entspricht. Einer der in dieser Empfehlung beschriebenen Wege ist die Behandlung der Testzellen mit Dithiothreitol (DTT) zur Zerstörung des CD38-Antigens. Häufig gelingt es mit DTT-behandelten Testzellen einen nicht-reaktiven Antikörpersuchtest und nicht-reaktive Verträglichkeitsproben zu erhalten. Oder falls zusätzliche Antikörper vorliegen gelingt es, diese zu erkennen und zu identifizieren. Alternativ kann das Risiko einer immunhämolytischen Reaktion umgangen werden, indem der Patient weitgehend antigenkompatible Erythrozyten erhält.

ENZYMATISCHE BEHANDLUNG DER TESTZELLEN MIT DITHIOTHREITOL (DTT)

DTT spaltet Disulfidbrücken und zerstört so bei der Behandlung der Erythrozyten des Antikörpersuchtests und der Verträglichkeitsprobe das CD38-Antigen. Damit bieten diese Zellen dem Daratumumab keine Bindungsstellen mehr und der indirekte Coombs-Test fällt negativ aus (sofern keine zusätzlichen anti-erythrozytären Antikörper vorliegen). Neben CD38 werden auch andere Strukturen mit Disulfidbrücken zerstört, darunter Antigene der Blutgruppensysteme Kell (KEL), Dombrock (DO), Indian (IN), Cartwright (YT), Lutheran (LU), Landsteiner-Wiener (LW), John-Milton-Hagen (JMH) und Knops (KN). Nun haben sich Antikörper gegen Antigene des KN-Systems oder gegen JMH als klinisch nicht relevant erwiesen. Zahlreiche Patienten wurden und werden aus Mangel an antigennegativen Präparaten gegen diese hochfrequenten Antikörper mit inkompatiblen Erythrozyten transfundiert, ohne dass (merkbare) Hämolysen auftraten. Diese Antikörper gelten als klinisch nicht relevant. Es ist unkritisch, sie nicht entdecken zu können, wenn Suchtest und Verträglichkeitsprobe mit DTT-behandelten Testzellen durchgeführt werden. Antikörper in den Systemen LU, YT und LW können Hämolysen verursachen. Sofern es in der Vergangenheit zu Hämolysen kam, wurden sie überwiegend als extravasal und mild verlaufend beschrieben. Auch für Antikörper aus diesen Systemen gilt: Wenn die mit DTT-behandelten Testzellen nicht entdeckt werden, ist das Risiko einer schwerwiegenden Hämolyse relativ gering. Dagegen werden Antikörper in den Systemen KEL, IN und DO respektvoll betrachtet, sie wurden als Ursache schwerwiegender und akuter Hämolysen beschrieben. Allerdings sind Antikörper gegen Antigene in den Systemen DO und IN in Mitteleuropa extrem selten. Anders verhält es sich mit dem KEL-System. Antikörper gegen die Antigene K und Kp^a sind häufig. Sie können aber leicht umgangen werden, wenn die Patienten untersucht und kompatibel zu ihrem K- und Kp^a-Phänotyp versorgt werden. Seltene Antikörper gegen KEL-Merkmale bilden bei Verträglichkeitsproben mit DTT-behandelten Zellen ein Restrisiko. Diesem Risiko muss aber der Gewinn an Sicherheit gegenübergestellt werden, der dadurch entsteht, dass mit DTT-behandelten Erythrozyten häufiger vorkommende Antikörper wie Anti-S oder Anti-Jk^a gefunden werden.

Zwischenfazit

Die Verträglichkeitsprobe mit DTT-behandelten Erythrozyten hat nicht ganz die gleiche Vorhersagekraft wie eine Standard-Verträglichkeitsprobe mit unbehandelten Erythrozyten, da sie das Risiko birgt, Antikörper in den sieben genannten Blutgruppensystemen zu übersehen. Aber abgesehen von Antikörpern gegen KEL-Merkmale, sind diese Antikörper entweder sehr selten oder haben keine klinische Relevanz. Da DTT-behandelte Erythrozyten aber ermöglichen, klinisch relevante Antikörper in anderen Blutgruppensystemen zu erkennen, bietet eine Verträglichkeitsprobe mit ihnen mehr Sicherheit als gar nichts zu tun und die Präparate mit reaktiver Verträglichkeitsprobe, sozusagen blind auszugeben.

VERSORGUNG MIT KOMPATIBLEN ERYTHROZYTENKONZENTRATEN

Bei dieser Versorgungsstrategie werden Erythrozyten transfundiert, die möglichst dem Antigenmuster des Patienten entsprechen, die also keine Antigene tragen, gegen die der Patient relevante Alloantikörper gebildet haben kann. Der Schutz vor einer Immunhämolyse kommt nicht mehr durch die Verträglichkeitsprobe, sondern durch die Auswahl der Präparate zustande. Trotzdem wird man die Verträglichkeitsprobe durchführen. Zum einen fordert die Richtlinie die Durchführung von Verträglichkeitsproben ohne Ausnahmen zu benennen, zum anderen bieten diese einen Schutz vor AB0-Vertauschungen oder anderen sehr stark reaktiven Antikörpern gegen Antigene, die bei der Auswahl nicht beachtet wurden (z. B. Wr^a). Derart stark positive Reaktionen werden in der Verträglichkeitsprobe hinter dem Daratumumab-Schleier sichtbar.

Was versteht man nun in diesem Zusammenhang unter relevanten Antikörpern oder unter den Begriffen kompatibel bzw. „matched“? Hier gibt es keine offizielle Definition, die Entscheidung kann und muss vom Labor selbst getroffen werden. Es ist nicht möglich, alle der über 400 Blutgruppenmerkmale und Phänotypen zu berücksichtigen. Manche Befürworter dieser Strategie beachten neben der Rhesusformel und Kell zusätzlich die Anti-

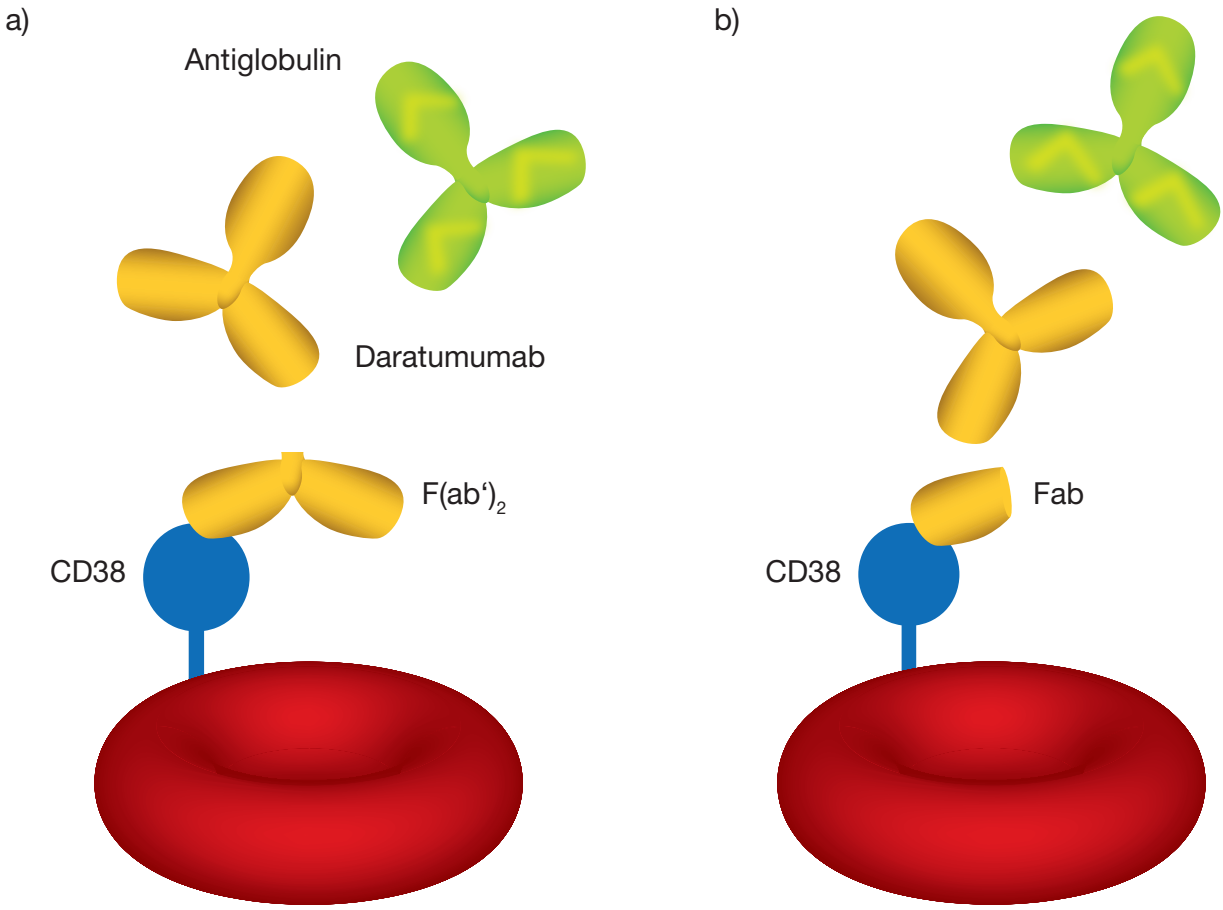

Abbildung 2:

Sowohl die F(ab')$_2$-Fragmente (a) als auch die Fab-Fragmente (b) binden an das CD38 der Testzellen und blockieren dieses für das mit dem Patientenplasma kommende Daratumumab. Das Antiglobulinserum kann weder an die gebundenen F(ab')$_2$-Fragmente noch an die Fab-Fragmente binden, der Antiglobulin-Test wird nicht durch das Daratumumab in der Patientenprobe gestört.

gene Fy^a, Fy^b, Jk^a, Jk^b, S und s. Sie lehnen sich damit an Überlegungen an, die man für die Versorgung von Patienten mit Sichelzellerkrankung angestellt hat. Die meisten immunhämolytischen Reaktionen werden von diesen Antikörperspezifitäten (zusammen mit Antikörpern des RH- und des KEL-Systems) verursacht, so dass man mit Beachtung der genannten Antigene ebenfalls einen sehr großen Schutz vor immunhämolytischen Reaktionen erreicht. Auch bei dieser Vorgehensweise bleibt ein Restrisiko, da Antikörper gegen andere Blutgruppenantigene nicht erkannt und auch nicht umgangen werden.

Voraussetzung für diese Art der Versorgung ist die serologische Phänotypisierung oder die Genotypisierung des Patienten und ein großer Vorrat an Erythrozytenkonzentraten, aus dem geschöpft werden kann. Vernünftigerweise sollten Phänotyp oder Genotyp der Erythrozytenkonzentrate schon vorbestimmt sein, anforderungsaktuelle Typisierungsaktionen würden sehr aufwendig und teuer.

KOMMERZIELLES REAGENS ZUR INHIBITION VON DARATUMUMAB: DARAEX®

2018 kam das erste und bislang einzige kommerzielle Reagens zur Inhibition der Daratumumab-Störung auf den Markt[12]. Es handelt sich dabei um Daratumumab, dem mit Pepsin das Fc-Stück abgespalten wurde (**Abbildung 1a**). Es wird mit den Test-Erythrozyten vorinkubiert, bindet an die CD38-Antigene und blockiert diese für das mit dem Patientenplasma kommende Daratumumab. Die F(ab')$_2$-Fragmente des DaraEx® werden im indirekten Coombs-Test vom Anti-Humanglobulin nicht erkannt (**Abbildung 2a**), Antikörpersuchtest und Verträglichkeitsprobe fallen negativ aus[13,14].

KOSTENERSTATTUNG

Die derzeitigen Kosten für DaraEx® überschreiten die nach den Gebührenordnungen erzielbaren Erlöse für Verträglichkeitsprobe und Antikörpersuchtest um ein Mehrfaches. Die Kosten für die DTT-Behandlung sind nicht ganz so einfach zu ermitteln. Die Zellen für die Verträglichkeitsprobe werden aktuell für jede Anforderung mit DTT behandelt. Die Zellen für den Antikörpersuchtest werden in manchen Laboren parallel zur Verträglichkeitsprobe behandelt, in anderen Laboren dagegen auf Vorrat hergestellt. Der Umfang der Kontrollen variiert und letztlich auch der erforderliche Zeitaufwand. Es ist aber unbestritten, dass auch die Kosten der DTT-Behandlung nicht durch die Erlöse für Suchtest und Verträglichkeitsprobe gedeckt werden.

Zum 1. April 2019 wurde für den Einheitlichen Bewertungsmaßstab (EBM) die Einführung der Gebührenordnungsziffer 32557 beschlossen: „Zuschlag zu der Gebührenordnungsposition 32545 oder 32556 für eine Vorbehandlung mit Dithiothreitol (DTT) zur Vermeidung von Interferenzen durch Daratumumab“. Die Ziffer kann zusätzlich zum Antikörpersuchtest (GOP 32545) oder zur Verträglichkeitsprobe (GOP 32556) berechnet werden, maximal aber viermal pro Patient und Behandlungstag. Die Vergütung wird mit 19,20 € beziffert.

Es sind Bestrebungen im Gange, auch für den Einsatz von DaraEx® (und kommenden Inhibitoren) eine Gebührenordnungsziffer im EBM zu schaffen. Für die Abrechnung nach der Gebührenordnung für Ärzte (GOÄ) gibt es derzeit keine speziellen Gebührenordnungspositionen.

WEITERE VERFAHREN

Inhibition von Daratumumab durch anti-idiotypische Antikörper

Der Hersteller von Daratumumab verfügt über anti-idiotypische Antikörper gegen Daratumumab (**Abbildung 3**). Diese werden für die Klinische Chemie, für die Serumelektrophorese und Immunfixationselektrophorese zur Verfügung gestellt[15]. Daratumumab wandert mit der gamma-Fraktion und verändert das kappa-/lambda-Leichtketten-Verhältnis. Um die Therapie von Patienten mit Multiplem Myelom dennoch überwachen zu können, werden die anti-idiotypischen Antikörper mit dem Patientenserum vorinkubiert und verändern nach Bindung an Daratumumab dessen Wanderungsverhalten im elektrischen Feld so, dass es abseits der natürliche Serumproteine des Patienten auf dem Gel zum Liegen kommt. Für blutgruppenserologische Untersuchungen stehen sie leider nicht zur Verfügung.

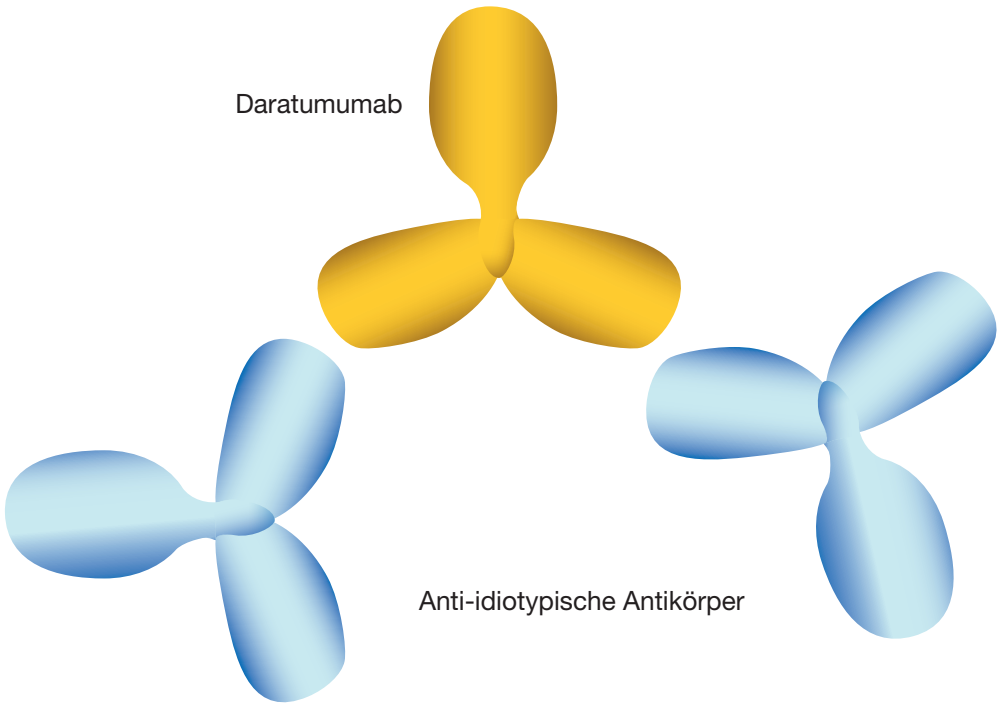

Abbildung 3:

Das Antigen, gegen welches die anti-idiotypische Antikörper gerichtet sind, ist die Antigenbindungsstelle (Fab) eines anderen Antikörperklons. Sie können so Antikörper dieses Klons binden und blockieren.

Inhibition durch rekombinantes lösliches CD38

Rekombinante lösliche Blutgruppenantigene werden seit einigen Jahren erfolgreich zur Inhibition von Antikörpern eingesetzt[16]. Auch die Inhibition von Daratumumab wurde mit sCD38 versucht. Damit eventuell vorhandene zusätzliche anti-erythrozytäre Antikörper im Plasma der Patienten nicht unter die Nachweisgrenze verdünnt werden, darf nur ein kleines Volumen sCD38 für den indirekten Coombs-Test hinzugefügt werden. Unter Therapie werden Plasmaspiegel von bis zu 1.000 µg/ml Daratumumab erreicht[17], was sCD38-Lösungen mit einer Konzentration von bis zu 100 mg/ml erfordert. Die auf dem Markt befindlichen rekombinanten Proteine erreichen jedoch nur eine Konzentration von 0,2 mg/ml sCD38. Einzig die Firma Grifols hat sCD38 in einer Konzentration von 30 mg/ml[18], setzt dieses aber bislang nur in ihrem Referenzlabor ein. Lösliches CD38 ist sicher die eleganteste Möglichkeit, diese Störungen zu beseitigen. Aber auch die Herstellungskosten für rekombinante Proteine sind hoch und im Falle einer Markteinführung müsste der Einsatz von sCD38 gut kalkuliert werden.

Inhibition von Daratumumab durch zellgebundenes CD38

Tremblay und Kollegen adsorbierten das Plasma von Daratumumab-Patienten an Zelllinien, die CD38 stark exprimieren[19]. Sie verwendeten dazu Zellen der Daudi-Linie und hatten nach zweimaliger Adsorption Daratumumab ausreichend aus dem Plasma entfernt. Versuche des Autors und Kollegen mit Daudi-, Raji-, Ramos-, Nawalma- und RPMI 8226-Zellen waren dagegen erfolglos (500 µl gepooltes Serum mit Titer 64 auf 10^8 Zellen; 1 h, 37 °C). Auch wenn diese technischen Hürden überwunden würden, bliebe die Frage nach der akuten Verfügbarkeit dieser Zelllinien bei Eingang einer Anforderung und natürlich nach den Kosten, sollten diese Zellen nur für diesen Zweck gezüchtet werden.

Blockade von CD38 durch Anti-CD38 der Maus

Ebenfalls die Gruppe um Tremblay versuchte, mit Anti-CD38 von der Maus die CD38-Antigene auf den Erythrozyten zu blockieren[19]. Diesem Unterfangen war kein Erfolg beschert. Der Grund dafür ist unklar: Entweder war der Anti-Humanglobulintest nicht so speziesspezifisch wie erwartet und das Anti-Humanglobulin agglutinierte auch Erythrozyten, die mit dem Maus-Antikörper beladen waren oder Daratumumab verdrängte die Maus-Antikörper aus der Bindung und wurde richtig vom Anti-Humanglobulin auf den Erythrozyten entdeckt.

Inhouse Panels

Die Erythrozyten von Neugeborenen tragen noch kein oder nur sehr wenig CD38. Vereinzelt stellten sich Labore deshalb Zellpanels zur Antikörpersuche und -identifizierung aus Nabelschnurblut zusammen. Die Erythrozyten von Patienten unter Daratumumab-Therapie werden CD38-negativ. Sind diese Patienten nicht vortransfundiert, lässt sich auch aus ihren Zellen ein Panel an Testzellen zusammenstellen. In beiden Fällen ist jedoch eine intensive Sammlung der Proben mit Blutgruppe 0 und deren ausgiebige Phäno- oder Genotypisierung erforderlich.

Papain, Trypsin, Capture®-Technik

Es gibt Berichte über ungestörte Antikörpersuchen mit papainbehandelten Testzellen[20], bei einigen Patienten wurden auch erfolgreich trypsinbehandelte Testzellen eingesetzt[21]. Des Weiteren wurde berichtet, dass die Capture®-Technik der Firma Immucor weniger empfindlich gegenüber Daratumumab sei, etwa die Hälfte der untersuchten Proben konnte ohne Störung durch Daratumumab untersucht werden[22]. Das oben erwähnte DaraEx® besteht aus pepsingespaltenem Daratumumab. Statt Pepsin kann auch Papain verwendet werden, um Daratumumab in Fab- und Fc-Fragmente zu spalten (**Abbildung 1b**)[23]. Die Fab-Fragmente blockierten die CD38-Antigene der Testerythrozyten und ermöglichten negative Coombs-Tests (**Abbildung 2b**) oder, sofern vorliegend, die Erkennung anti-erythrozytärer Alloantikörper in den Plasmen von Daratumumab-behandelten Patienten.

FAZIT

Die Störungen durch Daratumumab sind für die betroffenen Labore ärgerlich, weil mit erhöhtem Aufwand verbunden. Das Risiko für Patienten, während der Daratumumab-Therapie serologisch inkompatible Erythrozytenkonzentrate transfundiert zu bekommen, ist vermutlich aber recht gering. Dem Autor sind jedenfalls keine Fallberichte zu Alloimmunhämolysen bei solchen Patienten gegenwärtig. Bislang gibt es auch keine Hinweise, dass Patienten unter Daratumumab-Therapie häufiger als andere Patienten anti-erythrozytäre Alloantikörper bilden. Im Gegenteil, es ist eher zu erwarten, dass diese Gruppe seltener Antikörper bildet und wahrscheinlich sogar bestehende Antikörper (zumindest vorübergehend) verliert. Denn auch B-Lymphozyten und Plasmazellen exprimieren CD38 in großer Dichte und werden von Daratumumab dezimiert. Mit diesem Wirkungsmechanismus im Sinn wurde Daratumumab in mehreren Fällen von Autoimmunhämolysen nach Stammzelltransplantation erfolgreich eingesetzt[24].

ÜBER DARATUMUMAB HINAUS: WAS KOMMT AUF UNS ZU?

Die Entwicklung therapeutischer Antikörper ist vielversprechend und wird dementsprechend vorangetrieben: 570 Antikörper befinden sich zur Zeit in klinischer Untersuchung und jedes Jahr erhält eine niedrig zweistellige Zahl von Antikörpern die Zulassung durch die European Medicines Agency (EMA)[25]. Glücklicherweise stören die wenigsten von ihnen die blutgruppenserologischen Untersuchungen. Außer Daratumumab ist bisher nur ein zweiter Antikörper mit diesen Eigenschaften aufgefallen: Hu5F9-G4, ein monoklonaler Antikörper der Subklasse IgG_4, der gegen das Oberflächenmerkmal CD47 gerichtet ist[26]. Die US-amerikanischen Zentren, in denen die ersten Studien durch geführt wurden, berichteten über massive Störungen der blutgruppenserologischen Untersuchungen.[27] Anti-CD47 stört nicht nur den indirekten Coombs-Test sondern auch die Blutgruppenbestimmung durch falsch positive Agglutinationen sowohl bei der Untersuchung der Erythrozyten (z. B. bei der Bestimmung der AB0-Blutgruppe oder der Rh-Merkmale) als auch bei der Untersuchung des Patientenplasmas bei der Bestimmung der Serumeigenschaften und im Coombs-Test. Die Vorbehandlung der Testzellen mit Enzymen wie Papain, Ficin, Trypsin, Chymotrypsin oder DTT brachte keine Abhilfe. Es wurde beschrieben, dass das Antiglobulinserum von Immucor® kein IgG_4 erkennt und daher mit diesem Antiserum der indirekte Coombs-Test negativ ausfalle. Es bleibt abzuwarten, wie sich die Antiglobulinseren der Kartenhersteller verhalten werden, aber möglicherweise werden Patientenproben mit Anti-CD47 den bereits totgeglaubten Röhrchentest wiederbeleben. Zum jetzigen Zeitpunkt wird Anti-CD47 in Europa nur in zwei Studien in Großbritannien untersucht.

Der Autor

Dr. med. Christof Weinstock
Institut für Klinische Transfusionsmedizin und Immungenetik Ulm gemeinnützige GmbH
c.weinstock@blutspende.de

Die Literaturhinweise zu diesem Artikel finden Sie im Internet zum Download unter: www.drk-haemotherapie.de