

Therapeutisches Monitoring von Immunsuppressiva

Immunoassay oder Massenspektrometrie?

Die Bestimmung von Immunsuppressivaspiegeln gehört zu den anspruchsvollsten Aufgaben der Labormedizin. Neben gut automatisierbaren Immunoassays finden zunehmend auch komplexe massenspektrometrische Verfahren Eingang in die klinische Praxis.

Vor knapp 70 Jahren gelang die erste Übertragung einer Niere von einem gesunden Spender auf einen eineiigen Zwilling, und immerhin seit rund 40 Jahren kommen Immunsuppressiva zum Einsatz, um auch die Verpflanzung von Organen nicht verwandter Spender zu ermöglichen. Trotz der inzwischen immensen Erfahrung ist die Dosierung von Medikamenten, die die Immunabwehr unterdrücken, weiterhin eine medizinische Herausforderung und stellt vor allem an die Labormedizin hohe analytische und organisatorische Ansprüche.

Der Einsatz derzeit verfügbarer Immunsuppressiva (Tacrolimus, Sirolimus, Everolimus, Cyclosporin, Mycophenolat-Mophetil) ist stets eine Gratwanderung zwischen Über- und Unterdosierung: Zu niedrige Wirkstoffkonzentrationen im Blut sind mit einem erhöhten Abstoßungsrisiko assoziiert, bei zu hohen Spiegeln steigt vor allem das Risiko von Infektionen und Malignomen. Erschwerend kommt hinzu, dass die Dosis, die zum Erreichen von Blutspiegeln

im therapeutischen Zielbereich erforderlich ist, individuell um etwa eine Zehnerpotenz variieren kann. Das heißt, Patienten mit schlechter Resorption oder intensiver Metabolisierung können eine zehnfach höhere Dosierung benötigen als jeweils entgegengesetzt disponierte Patienten. Dabei beeinflussen sich endogene (zum Beispiel genetische) und exogene (zum Beispiel Xenobiotika) Faktoren in kaum vorhersehbarer Weise.

Der einzige Ausweg aus diesem vielschichtigen Dilemma sind individualisierte Dosierungsschemata auf Basis zuverlässiger Medikamentenspiegelbestimmungen im Blut. Die Messung von Tacrolimus, Cyclosporin, Everolimus und Sirolimus

erfolgt aus Vollblut, Mycophenolsäure wird aus Plasma bestimmt. Bei den meisten Immunoassays führt man vor der automatisierten Analytik eine manuelle Proteinfällung durch.

Die Etablierung therapeutischer Bereiche für Immunsuppressiva erweist sich als ausgesprochen schwierig; sie erfordert multizentrische Studien und Beobachtungen über lange Zeiträume. Da die Medikamente meist lebenslang verabreicht werden, müssen die Reagenzien eine hohe Stabilität und Chargenkonstanz aufweisen und die Messmethoden untereinander gut übereinstimmen; das erfordert ein hohes Maß an analytischer Richtigkeit.

Immunsuppressiva

Name	Erstzulassung	Wirkung	Quantifizierungslimit
Cyclosporin	1983	Calcineurin-Inhibitor	< 30 ng/mL
Tacrolimus	1989	Calcineurin-Inhibitor	< 1 ng/mL
Mycophenolsäure	1995	IMP-Dehydrogenase-Inhibitor	< 1 ng/mL
Sirolimus	2000	mTOR-Inhibitor	< 1 ng/mL
Everolimus	2004	mTOR-Inhibitor	< 1 ng/mL

Produktübersicht

Aus Gründen der Standardisierung und Qualitätssicherung raten Fachleute zum Einsatz kommerzieller Testkits anstelle von Eigenentwicklungen (Ausnahme: Forschungsanwendungen). Immunoassays werden von vielen führenden Herstellern der in-vitro-Diagnostik für ihre jeweiligen Automationsplattformen angeboten. Für die Massenspektrometrie gibt es dagegen nur wenige auf die Herstellung von Kits spezialisierte Anbieter.

Beispielhaft finden Sie nebenstehend eine Vorstellung neuer Immunoassays für Cyclosporin und Tacrolimus von Roche, entwickelt für Plattformen mit unterschiedlichem Durchsatz. Für routinierterprobte Anwendungen in der Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) bieten die Unternehmen Recipe (S. 161) und Chromsystems (S. 163) Testkits und Services an.

gh



Elecsys® Cyclosporine und Elecsys® Tacrolimus

Seit Juli 2013 sind Elecsys® Cyclosporine und Elecsys® Tacrolimus für die beiden am häufigsten eingesetzten Immunsuppressant Drugs (ISDs) auf den Roche Systemen **cobas e 411**, **cobas e 601**, **cobas e 602**, Elecsys® 2010 und MODULAR® ANALYTICSEVO <E170> verfügbar. Sie erfüllen die hohen Anforderungen an Messbereich, Präzision und Effizienz, die das therapeutische Monitoring an ISDs-Tests stellt. Zusammen mit dem bereits etablierten Test zur Bestimmung von Mycophenolsäure stehen somit drei von fünf relevanten ISDs auf den Systemplattformen von Roche Diagnostics zur Verfügung.

Die Praxistauglichkeit der neuen Tests Elecsys® Cyclosporine und Elecsys® Tacrolimus ist leicht zu belegen:

- breite Messbereiche und hervorragende Präzisionen (auch im niedrigen Konzentrationsbereich)
- sehr gute Wiederfindung von Ringversuchs-Proben
- sehr gute Korrelation zu anderen immunologischen Methoden und zur LC-MS/MS
- hohe Chargenkonstanz, lange Reagenz- und Kalibrationsstabilitäten.

	Elecsys® Cyclosporine	Elecsys® Tacrolimus
Messbereich	30 bis 2000 ng/mL	0,5 bis 40 ng/mL
Funktionale Sensitivität ¹	20 ng/mL	0,3 ng/mL
Intra-Assay Präzision (VK) ²	≤ 2,5 bis ≤ 4,3% ³	≤ 1,4 bis ≤ 2,8% ³
Inter-Assay Präzision (VK) ²	≤ 4,2 bis ≤ 9,2% ³	≤ 2,4 bis ≤ 7,3% ³

¹ Erfassungsgrenze LoB, ² bei 64,3 bzw. 2,54 ng/mL, ³ je nach Analysensystem

Nicht zuletzt ist die Möglichkeit der Konsolidierung mit anderen Parametern, die für Transplantationspatienten wesentlich sind (zum Beispiel Infektionskrankheiten, Diabetes, Anämie, Nieren- und Leberfunktion), ein schlagkräftiges Argument für den Einsatz dieses jüngsten Nachwuchses der Elecsys-Familie.

Weitere Assays zur Überwachung von Sirolimus und Everolimus sind in der Entwicklung.

Kontaktinformation

Roche Diagnostics Deutschland GmbH • Martin Steinmetz • Tel. 0621/759-3837 • martin.steinmetz@roche.com • www.roche.de



ClinMass® LC-MS/MS Komplettkits – zuverlässig, effizient und sicher

Qualität seit über 30 Jahren

RECIPE bietet ein umfassendes Portfolio an Testkits und Referenzmaterialien für HPLC und LC-MS/MS in der klinischen Diagnostik an.



Die LC-MS/MS Analytik eignet sich besonders für das *Therapeutic Drug Monitoring* (TDM), da sie sich durch eine selektive Quantifizierung des Wirkstoffes auszeichnet. Das TDM spielt vor allem in der Transplantationsmedizin bei der Arzneispiegelkontrolle von Immunsuppressiva eine bedeutende Rolle.

Mit dem CE/IVD ClinMass® LC-MS/MS Komplettkit für Immunsuppressiva von RECIPE steht ein schnelles und sicheres Verfahren zur Überwachung der Wirkstoffkonzentration im Blut zur Verfügung.

Der ClinMass® LC-MS/MS Komplettkit im Überblick:

- **Simultane Bestimmung der wichtigsten Immunsuppressiva** Cyclosporin A, Tacrolimus, Sirolimus und Everolimus im Vollblut
- **Anwenderfreundlich** durch vollautomatische on-line Analytik via 96-Well-Platten (z. B. für TECAN-Systeme)
- **Zeiteffiziente Analyse** in nur zwei Minuten
- **Zuverlässige Messung** durch
 - ClinMass® Optimierungs Mixe für MS/MS-Optimierung und Testlauf
 - ClinMass® Interner Standard mit isotoopenmarkierten Analyten
- **Präzise, qualitätsgesicherte Messergebnisse** durch Verwendung von ClinCal® Mehrpunkt-Kalibratoren und ClinChek® Kontrollen

Kontaktinformation

RECIPE Chemicals + Instruments GmbH • Birgit Henschel • Tel. 089/547081-54 • henschel@recipe.de • www.recipe.de

Vor- und Nachteile immunologischer Methoden und der LC-MS/MS

Aussagen	Immuno-Assay	LC-MS/MS
Spezifität	Kreuzreaktion mit Metaboliten möglich	hoch
Praktikabilität	Auf Standardanalyzern implementierbar; gute Praktikabilität	Uneinheitliche Geräteplattformen; komplexe Handhabung
Probendurchsatz, Personalbindung	Bis zu 100 Tests/h Geringe Personalbindung; Standard-Qualifikation	20 bis 40 Tests/h Erhebliche Bindung von besonders qualifiziertem Personal
Störanfälligkeit	Interferenzen durch Anti-Reagenz-Antikörper und unvorhersehbare Matrix-Effekte möglich (selten)	Risiko falscher Probenpositionierung; Matrix-Effekte durch interne Standards kompensiert
Kosten	Relativ hohe Reagenzpreise; im Allgemeinen keine Investitionskosten, v. a. bei Finanzierung über Reagenzumsatz	Hohe Investitions-, Wartungs- und Personalkosten, keine teuren Reagenzien (Antikörper)

Ringversuche demonstrierten vor allem in den 1990er-Jahren unbefriedigend große Unterschiede zwischen den in immer größerer Zahl verfügbaren Immunoassays. Deshalb gingen große Labore dazu über, hoch-spezifische massenspektrometrische Verfahren (LC-MS/MS) einzusetzen, was zu einer Harmonisierung der gesamten Immunsuppressiva-Analytik beitrug: Die Kalibration der Immunoassays wurde zunehmend an die LC-MS/MS-Technik angepasst; Probleme mit der Spezifität von Immunoassays durch Kreuzreaktionen mit Metaboliten der Arzneistoffe lassen sich dadurch allerdings nicht lösen.

Tacrolimus ist der im Markt dominierende Calcineurin-Inhibitor, aber auch das bereits länger verfügbare Cyclosporin behält seine Bedeutung. Es wird wegen seiner ausgeprägten und variablen hepatischen Metabolisierung sowie etwas ungünstiger Studienergebnisse bei Neueinstellungen heute zwar kaum mehr eingesetzt, ist jedoch relativ preisgünstig und zudem das einzige zur Behandlung der Graft-versus-Host-Erkrankung nach Knochenmarktransplantation zugelassene Immunsuppressivum. Die neueren mTOR-Antagonisten Sirolimus und Everolimus sind im Gegensatz zu Tacrolimus und Cyclosporin nicht nephrotoxisch, es wurden jedoch tendenziell häufiger Wundheilungsstörungen beobachtet.

Während für die bisher genannten Immunsuppressiva Tacrolimus, Cyclosporin,

Everolimus und Sirolimus ein Therapeutisches Drug Monitoring (TDM) – also die Messung von Arzneimittelspiegeln in der Zirkulation mit daran angepasster Dosisindividualisierung – in seiner Bedeutung nicht bezweifelt wird, ist die Relevanz eines TDM für MPA (Mycophenolsäure, ein aktiver Metabolit von Mycophenolat-Mofetil) umstritten und wird keineswegs in allen Transplantationszentren durchgeführt.

Schrittweise Umstellung

Das TDM von Sirolimus spielte für die Einführung der LC-MS/MS in klinische Laboratorien eine große Rolle, denn das Präparat wurde im Jahr 2000 eingeführt, obwohl damals kein immunologischer Routine-Assay zur Verfügung stand. Somit war es zwingend erforderlich, an vielen Transplantationszentren LC-MS/MS-Assays für das TDM zu etablieren.

Da diese dann ohne zusätzlichen apparativen Aufwand auch die Messung aller anderen Immunsuppressiva ermöglichen, löste die neue Technologie – nachdem sie stabil lief und sich im Routineeinsatz bewährt hatte – an vielen großen Zentren schrittweise die immundiagnostische Analytik ab. Für den Nacht- und Wochenenddienst sowie für die meisten nicht auf die Transplantationsdiagnostik spezialisierten Labore bleiben Immunoassays wegen ihrer vergleichsweise leichten Automatisierbarkeit allerdings weiterhin bedeutsam.

Während anfangs LC-MS/MS-Methoden komplett selbst entwickelt und validiert werden mussten, sind inzwischen Kits für die Messung aller wichtigen Immunsuppressiva mittels LC-MS/MS verfügbar. Sie enthalten neben Kalibratoren und Kontrollen einen Mix von internen Standards, Chromatografie-Säulen und Laufmittel. Diese Kits sind als Medizin-Produkt IVD-CE markiert und können im Prinzip auf die unterschiedlichen Systeme aller LC-MS/MS-Anbieter implementiert werden (z. B. ABSciex, Waters, Thermo, Agilent, Shimadzu).

Aufgrund der vielschichtigen, in der Tabelle zusammengefassten Vor- und Nachteile ist anzunehmen, dass beide analytischen Ansätze auch langfristig Anwendung finden werden – je nach Struktur und Ausrichtung des individuellen Labors.

Alternative Einsatzbereiche

Außerhalb der Transplantationsmedizin kommen moderne Immunsuppressiva auch bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen zum Einsatz, und Everolimus zusätzlich bei neuroendokrinen Tumoren. In diesen Indikationsfeldern ist ein TDM jedoch nicht etabliert.

Azathioprin – das am längsten verfügbare Immunsuppressivum – spielt in der Transplantationsmedizin keine Rolle mehr, wohl aber in der Behandlung von Autoimmunerkrankungen von Niere und Darm. Ein Monitoring kann über die Bestimmung von 6-Thioguanin-Nukleotiden erfolgen, dies erfordert jedoch diffizile chromatografische Methoden, die nur in wenigen Laboren etabliert sind. 🌸



Prof. Dr. med. Michael Vogeser

Klinikum der Univ. München, Inst. für Labormedizin

Michael.Vogeser@med.uni-muenchen.de