

// Forschungsprojekt INA: Analyse differenzieller Gen- und Proteinexpression zum In-vitro-Nachweis einer Arzneimittelallergie //

A. GLÄSSNER

C. KRÄMER

(BfArM)

A. YAZDI

(Klinik für Dermatologie
und Allergologie,
Uniklinik RWTH Aachen)

M. NÖTHEN

(Life & Brain GmbH,
Bonn)

A. SICKMANN

(Leibniz-Institut für Ana-
lytische Wissenschaften,
ISAS, Dortmund)

B. SACHS

(BfArM)

Arzneimittelallergien sind medizinisch relevant und werden vermutlich, bedingt durch den demografischen Wandel und die häufigere Arzneimitteltherapie im Alter, weiter zunehmen. Allerdings gibt es für viele dieser unerwünschten Reaktionen keine zufriedenstellenden diagnostischen Möglichkeiten. Demgegenüber steht ein großer Bedarf für eine zuverlässige, in der täglichen Routine einsetzbare Diagnostik, die für den Patienten ungefährlich, nicht belastend und deren Durchführung mit geringem zeitlichem Aufwand verbunden ist. Gerade In-vitro-Testungen bieten sich hier an, da sie lediglich eine Blutabnahme erfordern. Ein weiterer Vorteil ist die einfache Möglichkeit, mehrere Arzneimittel zu testen, wenn verschiedene Arzneimittel als Auslöser infrage kommen.

Das durch den Europäischen Fonds für regionale Entwicklung (EFRE) und das Land Nordrhein-Westfalen (Leitmarkt Gesundheit.NRW) geförderte Projekt INA hat daher zum Ziel, durch Nutzung moderner, innovativer Methoden Grundlagen zu erforschen, die es ermöglichen sollen, zukünftig einen für den Routineeinsatz geeigneten diagnostischen In-vitro-Test zum Nachweis von Arzneimittelallergien zu entwickeln.

ARZNEIMITTELALLERGIEN

Das klinische Spektrum von Arzneimittelallergien reicht von harmlosen Hautausschlägen (Exanthenen) bis hin zu tödlichen Reaktionen wie beispielsweise dem allergischen Schock oder der toxisch epidermalen Nekrolyse (siehe Abbildung 1). Meist ist die Haut, gelegentlich sind aber auch andere Organsysteme, wie z. B. die Leber oder die Blutbildung, betroffen.¹ Die genaue Inzidenz und Prävalenz von Arzneimittelallergien in Deutschland und auch weltweit sind unbekannt, geschätzt sind ca. sieben Prozent der Allgemeinbevölkerung betroffen.¹ In Bezug auf die Pathophysiologie der Reaktionen wird im klinischen Alltag weiterhin die Klassifikation nach Coombs und Gell verwendet (mittlerweile mit Subdifferenzierungen), die vier Formen (I [= Soforttyp] bis IV [= Spättyp]) unterscheidet.¹

Abbildung 1:
Schwere arzneimittel-
allergische Reaktionen

A) toxisch epidermale Nekrolyse (TEN)

B) makulopapulöses Exanthem im Rahmen eines DRESS-Syndroms (Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms); in der Literatur wird auch der Begriff arzneimittelinduziertes Hypersensitivitätssyndrom als Synonym verwendet²

Quelle: DermNet New Zealand



METHODEN ZUM NACHWEIS VON ARZNEIMITTELALLERGIEN

Der belastbare Nachweis, aber auch der Ausschluss einer Arzneimittelallergie sind für den Patienten, die behandelnden Ärzte und das Gesundheitssystem von großer Bedeutung. So ist beispielsweise die Verwendung von Ersatzantibiotika bei vermuteter Penicillinallergie mit höheren Kosten, mehr Nebenwirkungen und der Verbreitung von Antibiotikaresistenzen verbunden.³ Die Diagnostik von Arzneimittelallergien erfolgt durch:

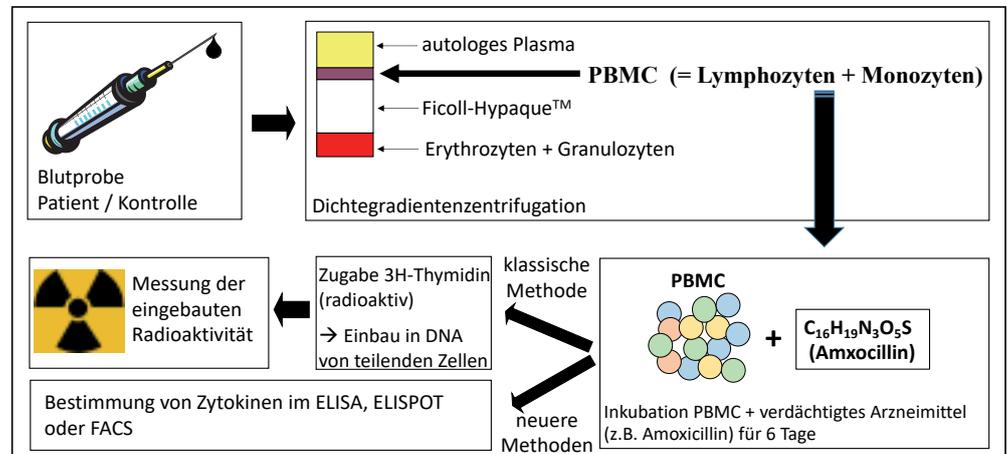
- **Anamnese:** Für die Anamnese gibt es standardisierte Fragebögen.^{4,5} Allerdings ist die Anamnese gerade in Bezug auf die Klinik der Reaktion nicht immer zuverlässig.⁶
- **In-vitro-Testungen:** Bei den In-vitro-Testungen können Verfahren, die spezifische Antikörper vom Typ IgE nachweisen, von zellulären Testsystemen unterschieden werden. Die Bestimmung des spezifischen IgE ist nur bei Soforttypreaktionen hilfreich und hat dort keine überzeugende Sensitivität. Für die Betalaktam-Antibiotika wird eine Spannweite von 0–75 Prozent angegeben.⁷ Weiterhin sind diese Testverfahren nur für sehr wenige Wirkstoffe verfügbar (Penicillin, Amoxicillin oder Cefaclor) und oftmals mehrere Jahre nach der Reaktion nicht mehr zuverlässig.⁸ Demgegenüber stehen die zellulären Testsysteme, wie z. B. der Lymphozytentransformationstest (LTT), der vorzugsweise bei Spättypreaktionen eingesetzt wird. Der LTT ist in seiner traditionellen Form jedoch zeitaufwendig und störanfällig und damit für die tägliche Routinediagnostik ungeeignet.⁹
- **In-vivo-Testungen (= Hauttestungen):** In-vivo-Testungen, wie der Prick- und Intrakutan-Test, sind zeitaufwendig und haben oft keine hohe Sensitivität.⁵ Darüber hinaus sind lokale oder selten auch generalisierte Reaktionen möglich und das Risiko einer iatrogenen Sensibilisierung kann nicht ausgeschlossen werden. Gerade für Kinder und ältere oder multimorbide Patienten sind daher In-vitro-Testungen wesentlich besser geeignet. Weiterhin sind Prick- und Intrakutan-Test im Wesentlichen bei Soforttypreaktionen hilfreich und dort auch nur für wenige Wirkstoffe etabliert und standardisiert.⁵
- **Provokationstestungen:** Provokationstestungen sind aufgrund der Gefahr einer allergischen Reaktion nicht risikofrei und werden von Patienten aus Angst vor den möglichen Reaktionen oft abgelehnt. Sie werden auch nur in wenigen großen Kliniken durchgeführt. Darüber hinaus sind sie bei anamnestisch schwereren Reaktionen aus Sicherheitsgründen kontraindiziert.⁵

Zusammenfassend gibt es für viele arzneimittelallergische Reaktionen keine zuverlässige, in der Routine einsetzbare diagnostische Möglichkeit, die für den Patienten ungefährlich, nicht belastend und mit geringem zeitlichem Aufwand verbunden ist. Demgegenüber steht der dringende Bedarf für ein solches Testsystem, wie es bereits auch von der europäischen Fachgesellschaft für Arzneimittelallergien beschrieben wurde.¹⁰

DER LYMPHOZYTENTRANSFORMATIONSTEST (LTT)

Der LTT wird in seiner traditionellen Form seit den 1960er Jahren verwendet. Es handelt sich um einen zellbasierten In-vitro-Test zum Nachweis von Allergien, der je nach klinischem Krankheitsbild und Arzneimittel variierende Sensitivitäten (ca. 40–65 %) und Spezifitäten (ca. 90–97 %) aufweist.¹¹ Methodisch werden im LTT sogenannte PBMC (periphere mononukleäre Zellen) des Patienten mit dem verdächtigten Arzneimittel kokubiert.⁹ Unter den PBMC befinden sich antigenpräsentierende Zellen (Monozyten), die das Antigen (=Arzneimittel) den spezifisch sensibilisierten T-Zellen präsentieren können. Diese erkennen das Antigen, was zu einer Aktivierung und klonalen Expansion der spezifischen T-Zellen führt. Im klassischen LTT wird radioaktives ³H-Thymidin zu der Zellsuspension hinzugefügt, das in die DNA von proliferierenden Zellen eingebaut wird. Die Messung der Radioaktivität in der Probe

Abbildung 2:
Methodischer Ablauf eines
Lymphozytentrans-
formationstests



kann dann als Parameter für das Ausmaß der Proliferation (sogenannter Read-out-Parameter) verwendet werden. Mittlerweile wird auch die Bestimmung ausgewählter Zytokine im Kulturüberstand mittels ELISA oder in den Zellen mittels Durchflusszytometrie eingesetzt.^{12, 13} Dabei scheinen Interleukin (IL) 2, 5, 13 und Interferon (IFN)- γ besonders geeignet zu sein.^{14–16} Weiterhin wurde ein früher Aktivierungsmarker (CD69) als möglicherweise hilfreich identifiziert.¹⁷ Die Abbildung 2 zeigt den methodischen Ablauf eines LTT.

Auch wenn Arzneimittelallergien über unterschiedliche pathophysiologische Endstrecken vermittelt werden, die mit unterschiedlichen klinischen Bildern einhergehen, ist der Ausgangspunkt die Aktivierung von Gedächtnis-T-Zellen durch das Arzneimittel.¹⁸ Deshalb bietet sich die Aktivierung dieser Zellen als ein zentraler Ansatzpunkt für ein Testverfahren (wie beim LTT) an.¹⁹ Dieses könnte dann prinzipiell bei allen vier Typen von Arzneimittelallergien einsetzbar sein.

DAS INA-PROJEKT

Das INA-Projekt wird durch den Europäischen Fonds für regionale Entwicklung (EFRE) und das Land NRW (Leitmarkt Gesundheit.NRW) gefördert. Neben dem Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM), das die Konsortialführung des Projektes übernimmt, sind die Klinik für Dermatologie und Allergologie des Uniklinikums RWTH Aachen, die Life & Brain GmbH in Bonn und das Leibniz-Institut für Analytische Wissenschaften (ISAS) in Dortmund als Kooperationspartner an der Durchführung beteiligt.

In dem Projekt soll auf Grundlage der LTT-Plattform eine neue In-vitro-Methode zum diagnostischen Nachweis von Arzneimittelallergien etabliert werden, die auf der Nutzung neuer Read-Out-Parameter wie der genom- und proteomweiten Expressionsanalyse beruht.

Dazu sollen zunächst Patienten mit gesicherter Arzneimittelallergie und Kontrollpersonen ohne Allergie gegen das betreffende Arzneimittel untersucht werden. Aus ihrem Blut werden die peripheren mononukleären Zellen (PBMC) isoliert und mit dem verdächtigten Arzneimittel koinkubiert. Nach Abschluss der Koinkubation wird die Gen- und Proteinexpression in den PBMC genom- und proteomweit in Bezug auf geeignete Ziel-Gene und/oder deren Transkriptionsprodukte analysiert. Hierbei sollen Gene oder Proteine gefunden werden, die nach Koinkubation der PBMC mit dem auslösenden Arzneimittel signifikant dereguliert werden. Auch eine für die Arzneimittelallergie charakteristische Kombination von deregulierten Genen oder Proteinen wird mit diesen Ansätzen untersucht.

REFERENZEN

1. Demoly P et al.: International Consensus on drug allergy. *Allergy*. 2014;69(4):420-437
2. Watanabe H: Recent Advances in Drug-Induced Hypersensitivity Syndrome/Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms. *J Immunol Res*. 2018;2018:5163129
3. Macy E et al.: Health care use and serious infection prevalence associated with penicillin „allergy“ in hospitalized patients: A cohort study. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(3):790-796
4. Wedi B: Fragebogen Medikamentenüberempfindlichkeit. *Allergo J*. 2005;14:611-617
5. Brockow K et al.: Guideline for the diagnosis of drug hypersensitivity reactions: S2K-Guideline of the German Society for Allergology and Clinical Immunology (DGAKI) and the German Dermatological Society (DDG) in collaboration with the Association of German Allergologists (AeDA), the German Society for Pediatric Allergology and Environmental Medicine (GPA), the German Contact Dermatitis Research Group (DKG), the Swiss Society for Allergy and Immunology (SGAI), the Austrian Society for Allergology and Immunology (OGAI), the German Academy of Allergology and Environmental Medicine (DAAU), the German Center for Documentation of Severe Skin Reactions and the German Federal Institute for Drugs and Medical Products (BfArM). *Allergo J Int*. 2015;24(3):94-105
6. Brockow K. et al.: EAACI position paper on how to classify cutaneous manifestations of drug hypersensitivity. *Allergy*. 2019; 74(1):14; <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=mdc&AN=30028512&lang=de&site=eds-live>
7. Wurpts G et al.: S2k-Leitlinie: Diagnostik bei Verdacht auf eine Beta-laktamantibiotika-Überempfindlichkeit. *Allergo J Int*. 2019;28:121-151
8. Decuyper I et al.: In Vitro Diagnosis of Immediate Drug Hypersensitivity Anno 2017: Potentials and Limitations. *Drugs R D*. 2017;17(2):265-278
9. Robert Koch-Institut: „Qualitätssicherung beim Lymphozytentransformationstest“ – Addendum zum LTT-Papier der RKI-Kommission „Methoden und

Nachdem in der ersten Projektphase geeignete Read-Out-Parameter identifiziert wurden, soll ihre Verwendung in der zweiten Projektphase an einer größeren Anzahl von Patienten getestet und verifiziert werden.

Die wesentlichen Arbeitsschritte des Projektes sind (federführende Partner in Klammern):

1. die Rekrutierung von Patienten mit gesicherter Arzneimittelallergie und Kontrollpersonen ohne Allergie gegen das betreffende Arzneimittel (Klinik für Dermatologie und Allergologie, Uniklinik RWTH Aachen)
2. die Isolierung der peripheren mononukleären Zellen (PBMC) der Patienten und Kontrollpersonen und Koinkubation der PBMC mit dem angeschuldigten Arzneimittel sowie die Isolierung ihrer RNA (BfArM)
3. die genom- und proteomweite Analyse der differentiellen Gen- und Proteinexpression (Life & Brain, Leibniz-Institut für Analytische Wissenschaften [ISAS])
4. die Identifikation geeigneter Target-Gene und/oder deren Transkriptionsprodukte als Read-Out-Parameter (Life & Brain, ISAS)

Am Ende des Forschungsprojektes soll ein Protokoll etabliert sein, das die Methodik und Materialien zum zuverlässigen In-vitro-Nachweis einer Arzneimittelallergie für die breite Anwendung beschreibt.

FAZIT

Zusammenfassend gibt es für viele arzneimittelallergische Reaktionen derzeit keine zufriedenstellenden diagnostischen Möglichkeiten, obwohl ein dringender Bedarf nach einer zuverlässigen, in der Routine einsetzbaren Methode vorhanden ist. Ziel des INA-Projektes ist es daher, mittels differentieller Gen- und Proteinexpression neue Grundlagen zu erforschen, die es ermöglichen sollen, die aktuelle In-vitro-Diagnostik von Arzneimittelallergien zu verbessern.

Qualitätssicherung in der Umweltmedizin – Mitteilung der Kommission „Methoden und Qualitätssicherung in der Umweltmedizin“. Bundesgesundheitsbl – Gesundheitsforsch – Gesundheitsschutz. 2008;51:1070-1076

10. Mayorga C et al.: In vitro tests for drug hypersensitivity reactions: an ENDA/EAACI Drug Allergy Interest Group position paper. *Allergy*. 2016;71(8):1103-1134

11. Mayorga C et al.: The Value of In Vitro Tests to Diminish Drug Challenges. *Int J Mol Sci*. 2017;18(6):1222

12. Martin M et al.: In vitro detection and characterization of drug hypersensitivity using flow cytometry. *Allergy*. 2010;65(1):32-39

13. Khalil G et al.: Cytokine expression profile of sensitized human T lym-

phocytes following in vitro stimulation with amoxicillin. *Eur Cytokine Netw*. 2008;19(3):131-141

14. Sachs B et al.: Determination of interleukin-5 secretion from drug-specific activated ex vivo peripheral blood mononuclear cells as a test system for the in vitro detection of drug sensitization. *Clin Exp Allergy*. 2002;32(5):736-744

15. Lochmatter P et al.: Drug-specific in vitro release of IL-2, IL-5, IL-13 and IFN- γ in patients with delayed-type drug hypersensitivity. *Allergy*. 2009;64(9):1269-1278

16. Porebski G et al.: In vitro diagnosis of T cell-mediated drug allergy. *Clin Exp Allergy*. 2011;41(4):461-470

17. Beeler A et al.: CD69 upregulation on T cells as an in vitro marker for

delayed-type drug hypersensitivity. *Allergy*. 2008;63(2):181-188

18. Cornejo-Garcia JA et al.: Differential cytokine and transcription factor expression in patients with allergic reactions to drugs. *Allergy*. 2007;62(12):1429-1438

19. Luque I et al.: In vitro T-cell responses to β -lactam drugs in immediate and nonimmediate allergic reactions. *Allergy*. 2001;56(7):611-618