

IL LABORATORIO DI IMMUNOEMATOLOGIA IN EPOCA DI TERAPIE BIOLOGICHE

Erica Maiorana

AULSS 8 BERICA, Vicenza

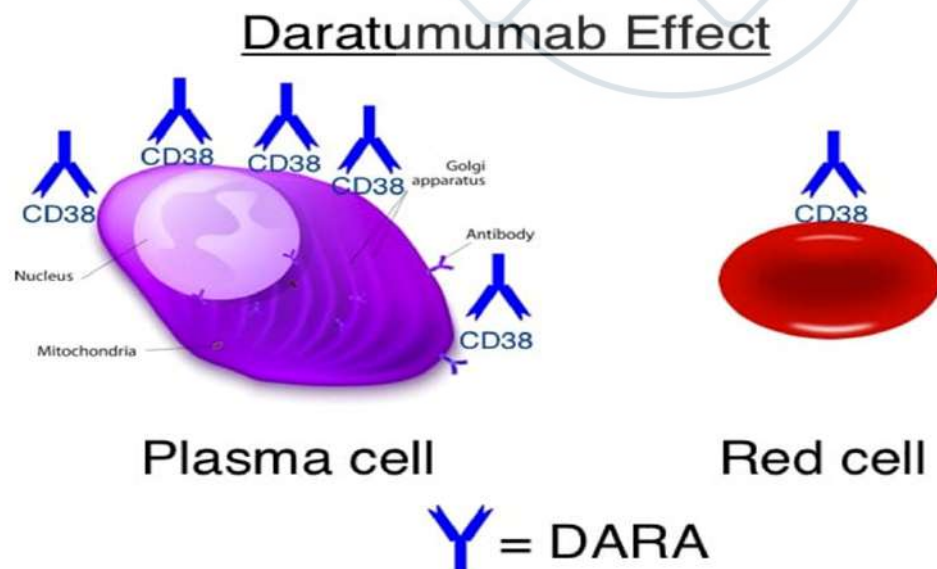
La sottoscritta Erica Maiorana,

in qualità di Relatore dichiara che nell'esercizio della Sua funzione e per l'evento in oggetto, NON È in alcun modo portatore di interessi commerciali propri o di terzi; e che gli eventuali rapporti avuti negli ultimi due anni con soggetti portatori di interessi commerciali non sono tali da permettere a tali soggetti di influenzare le mie funzioni al fine di trarne vantaggio.

Anticorpi monoclonali anti-CD38

Il CD38, glicoproteina transmembrana di tipo II, è espressa a livelli relativamente bassi dalle cellule linfoidi e mieloidi mature, nonché da altri tessuti non ematologici.

La marcata espressione sulle plasmacellule neoplastiche, indipendentemente dallo stadio di malattia, ha reso il recettore un **target terapeutico** per l'inibizione della componente neoplastica CD38 +



Daratumumab (DARA), anticorpo monoclonale umanizzato IgG1 k, è stato il primo della classe degli anti-CD38 a ricevere nel **2015**

l'approvazione da parte della Food and Drug Administration per il trattamento, in monoterapia, del Mieloma Multiplo.

Esplora la propria attività per mezzo di:

- attivazione della citotossicità complemento-dipendente (CDC)
- attivazione della citotossicità cellulo-mediata-anticorpo dipendente (ADCC)
- fagocitosi cellulare anticorpo-dipendente (ADCP)
- induzione diretta dell'apoptosi
- inibizione dell'attività ciclica e stimolazione dell'attività idrolasica del CD38

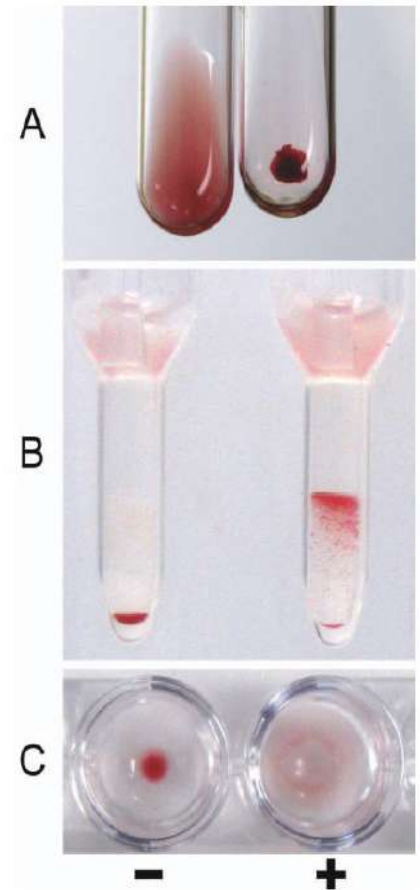
Interferenza del DARA nei test immunoematologici

L'interferenza dovuta al DARA viene osservata per un periodo che va da 2 sino a 6 mesi successivi all'ultima dose di farmaco somministrato.

Tabella I

Indagine immunoematologica	Interferenza da DARA (anti-CD38)
Tipizzazione antigeni ABO/RhD	No
Tipizzazione altri antigeni eritrocitari	Si
Test di Coombs Diretto	No/Si
Screening anticorpale	Si
Identificazione anticorpale	Si
Immediate spin (ABO/RhD)	No
Cross-match sierologico	Si
Utilizzo tecniche di assorbimento	Si

*Raccomandazioni per la gestione trasfusionale dei pazienti in trattamento con Daratumumab,
Società Italiana di Medicina Trasfusionale e Immunoematologia*



- A. Provetta
- B. Schedina
- C. Micropiastra/Fase solida

Raccomandazioni per la gestione trasfusionale dei pazienti in trattamento con Daratumumab

SOCIETA' DI MEDICINA TRASFUSIONALE E IMMUNOEMATOLOGIA

Indagini pre-trasfusionali nei pazienti trattati con DARA

E' auspicabile che l'ematologo contatti il medico della ST prima che il paziente inizi il trattamento con DARA per poter inquadrare in maniera corretta la condizione sierologica di base del paziente e condurre l'eventuale terapia trasfusionale in modo più appropriato.

Indagini da eseguire sul paziente PRIMA dell'inizio del trattamento con DARA

- Tipizzazione ABO/RhD/Fenotipo Rh completo, Fenotipo K/k, test di Coombs diretto (TCD) e ricerca/identificazione di anticorpi irregolari (di classe IgM e IgG)
- Tipizzazione eritrocitaria estesa, in base ai protocolli locali della ST

Indagini da eseguire sul paziente DOPO l'inizio del trattamento con DARA

- Tipizzazione ABO/RhD con metodi convenzionali
- Eventuale genotipizzazione eritrocitaria estesa Ricerca/identificazione di anticorpi irregolari con pre- trattamento dei globuli rossi con DTT per eliminare l'interferenza da anti-CD38.

Il trattamento dei globuli rossi deve essere effettuato con DTT 0.2M secondo la procedura riportata nell'Allegato Tecnico, ed eventualmente è consigliato consultare un Servizio di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale di Riferimento.

Prove di compatibilità

- Per pazienti con screening negativo dopo trattamento con DTT

Selezionare concentrati eritrocitari ABO/Rh/K fenotipicamente compatibili

Eseguire cross-match elettronico o cross-match sierologico dopo pre-trattamento degli eritrociti del donatore con DTT (**secondo la procedura riportata nell'Allegato Tecnico per le emazie test dei pannelli**) selezionando preferibilmente concentrati eritrocitari con match fenotipico o genotipico esteso, tenendo conto del grado di immunogenicità degli antigeni in caso di impossibilità a rispettare un match completo

- Per pazienti con alloanticorpi eritrocitari identificati dopo trattamento con DTT

Selezionare concentrati eritrocitari compatibili per ABO/Rh/K e negativi per gli antigeni verso i quali sono diretti gli anticorpi identificati, tenendo conto preferibilmente del match fenotipico o genotipico esteso

Eseguire cross-match sierologico dopo pre-trattamento degli eritrociti del donatore con DTT (**secondo la procedura riportata nell'Allegato Tecnico per le emazie test dei pannelli**)

- Richiesta trasfusionale in emergenza

Assegnare concentrati eritrocitari ABO/RhD/K compatibili secondo il protocollo in uso presso la ST

Benefits (+) and drawbacks (–) of interference mitigation strategies for anti-CD38 and anti-CD47 agents in the transfusion laboratory

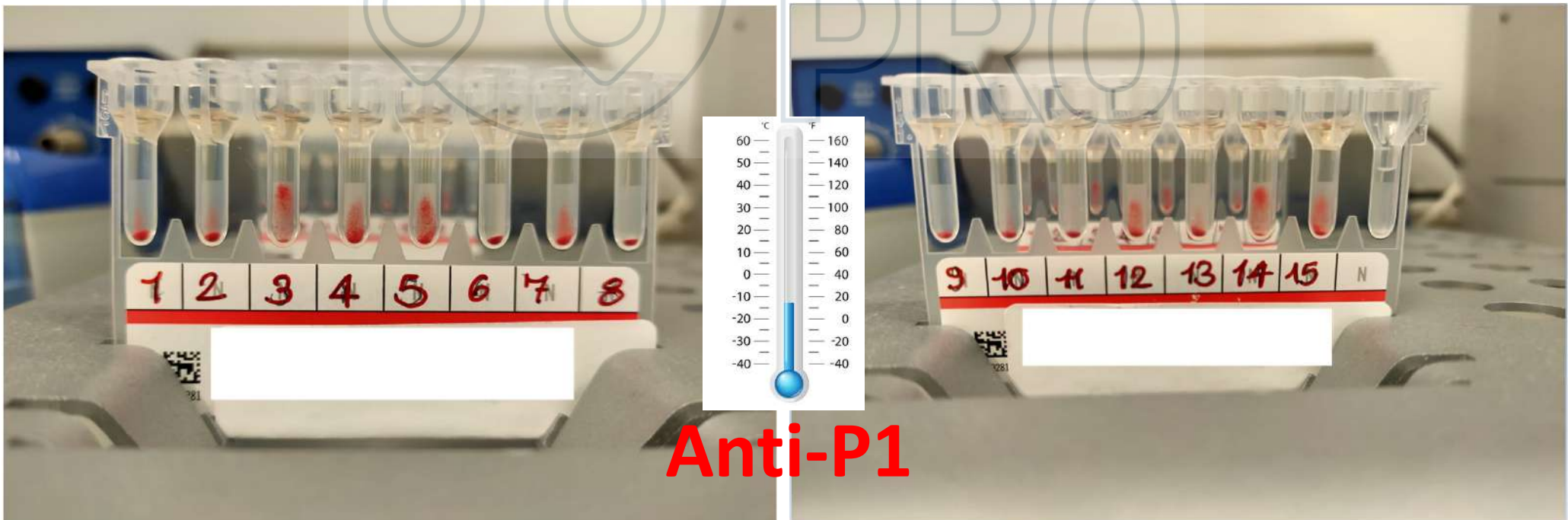
Mitigation strategy	Anti-CD38 agents	Anti-CD47 agents ^a
Reducing agents	(+) Validated, widely used (+) Inexpensive, reagents already available in TSL (+) Reagent cells can be pre-treated	(–) Does not denature CD47 or remove drug interference
Enzymes	(–) Denatures additional antigens, including K (+) Disrupts antigens different from those denatured by reducing agents (–) Less reliable CD38 disruption than DTT (–) Some clinically significant alloantibodies may be missed	(–) Does not deactivate or remove CD47
Soluble antigens	(+) Rapid neutralisation of anti-CD38 (–) Reagents not widely available, not licensed, and expensive (–) May dilute weakly reactive clinically significant antibodies	(+) Effective at negating interference with some anti-CD47 agents (–) Effect may be specific to particular anti-CD47 agent (–) Reagents not widely available or licensed (–) May dilute weakly reactive clinically significant antibodies
Antibody fragments	(+) Can be made with excess anti-CD38 drug (–) Reagents not commercially available and not licensed	Not studied
Adsorption studies	(–) CD38 concentrations on reagent RBCs too low for adsorption treatment	(+) Multiple rounds of papain-treated RBCs can be used in adsorption studies to mitigate interference with some anti-CD47 agents (–) Clinically significant alloantibodies may be lost during adsorptions leading to false negative results (–) Use of RBCs or platelets as adsorption substrate not readily available to TSLs
Antigen negative reagent cells	(–) Cells are rare and not available for routine antibody screening (–) Cannot be used for crossmatching	(–) Not successful in removing interference (–) Cannot be used for crossmatching
AHG without IgG4 reactivity	(–) DARA and SAR are IgG1 molecules; technique works only with drugs with IgG4 chain	(+) May mitigate interference at IAT with some anti-CD47 drugs (–) No difference in non-IAT testing (–) Not effective with all anti-CD47 agents (–) Carryover effect has been noted

AHG, antihuman globulin; DARA, daratumumab; IAT, indirect antiglobulin test; RBC, red blood cell; SAR, isatuximab; TSL, transfusion service laboratory.

^a Reactivity and interference patterns of anti-CD47 agents are not class-specific and may vary significantly between individual drugs.

Strategie di mitigazione per anticorpi resistenti al trattamento: enzimi

- Paziente in trattamento con Anti-CD38 dal 2/2/2022
- presente **studio di base** e nota storia trasfusionale
- dal 30/6/2022 al 5/7/2022, per frattura femore, pervenute al SIT di Vicenza 4 richieste trasfusionali di emazie concentrate
- al primo accesso **TCI positivo** dopo trattamento delle emazie di screening con DTT. Compatibilizzate un totale di 6 unità di cui **3** dall'esito **compatibile** e **3** dall'esito **incompatibile**



Anti-P1

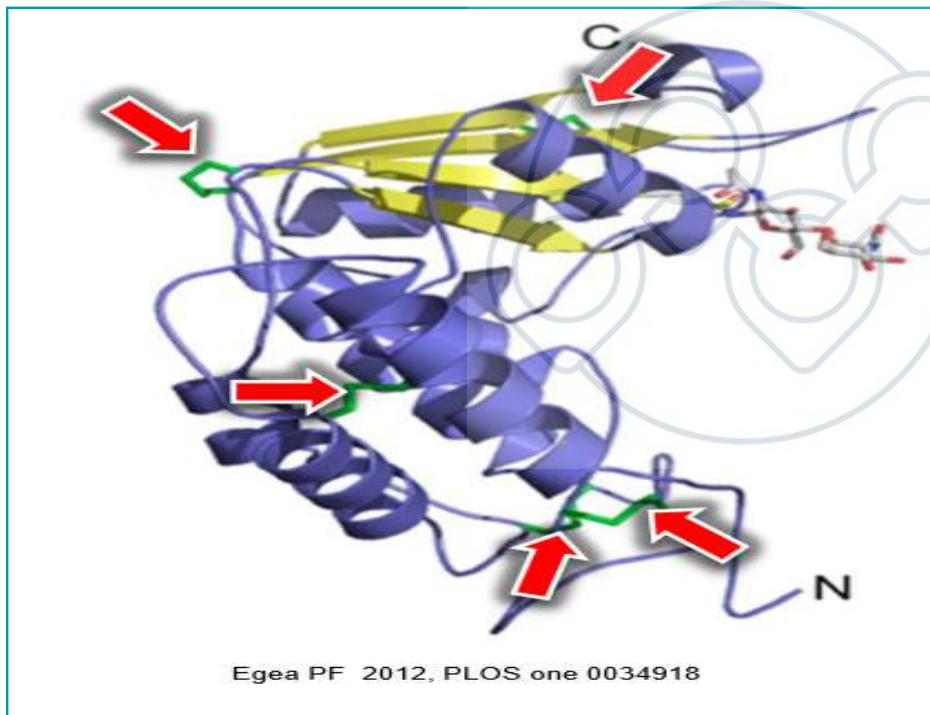
Strategie di mitigazione per anticorpi resistenti al trattamento: enzimi

- Paziente
- presenza
- dal 3
- 4 rich
- al pri
- con D
- e 3 d

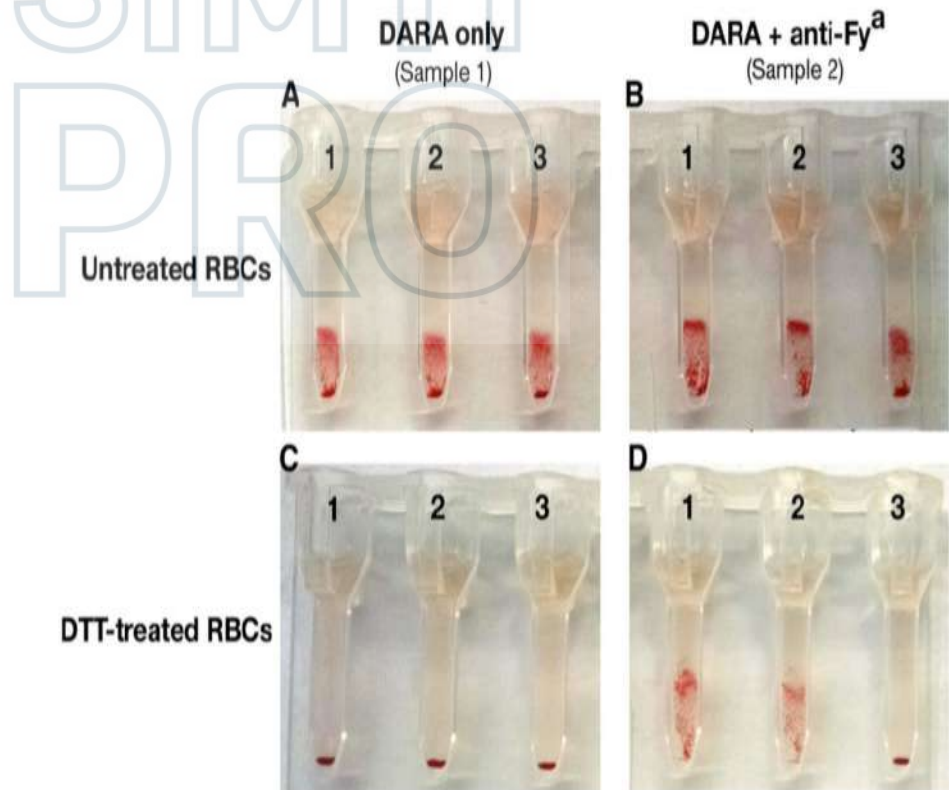


Strategie di mitigazione: agenti riducenti - Ditiotreitolo

Il Ditiotreitolo (DTT) è un agente riducente in grado di denaturare il CD38, clivandone i **5 legami disolfurici** che lo caratterizzano.



L'alterazione della struttura terziaria della proteina, impedisce il riconoscimento dell'epitopo da parte dell'anticorpo monoclonale, e pertanto il conseguente sviluppo dell'interferenza sierologica



Antigeni distrutti dal trattamento con DTT

Sistema	Antigeni	Rischio di Reazione Emolitica
KEL	K, k, Kp ^a , Kp ^b , Js ^a , Js ^b , altri	Immediata o ritardata, moderata o severa
DO	Do ^a , Do ^b , Hy, Jo ^a , altri	Immediata o ritardata, moderata o severa
YT	Yt ^a , Yt ^b	Ritardata (rara), moderata
KN	Kn ^a , Kn ^b	Nessuna
LU	Lu ^b in modo variabile, altri	Nessuna o moderata
LW	Lw ^a , Lw ^b	Ritardata, nessuna o moderata
IN	In ^a , In ^b , altri	Ridotta sopravvivenza eritrocitaria

ALLEGATO TECNICO-Procedura per il trattamento delle emazie con DTT e relativi test immunoematologici, Interpretazione dei risultati. Raccomandazioni per la gestione trasfusionale dei pazienti in trattamento con Daratumumab, Società Italiana di Medicina Trasfusionale e Immunoematologia.

Letteratura

Resolving the daratumumab interference with blood compatibility testing

Claudia I. Chapuy,¹ Rachel T. Nicholson,¹ Maria D. Aguad,¹ Bjoern Chapuy,² Jacob P. Laubach,² Paul G. Richardson,² Parul Doshi,³ and Richard M. Kaufman¹

TRANSFUSION June 2015; Vol 55, 1545-1554

Distinct effects of daratumumab on indirect and direct antiglobulin tests: a new method employing 0.01 mol/L dithiothreitol for negating the daratumumab interference with preserving K antigenicity (Osaka method)

Mika Hosokawa,¹ Hirokazu Kashiwagi,² Kotarosumitomo Nakayama,¹ Mikiko Sakuragi,¹ Mayumi Nakao,¹ Tamayo Morikawa,¹ Tomoko Kiyokawa,¹ Hiroshi Aochi,¹ Keisuke Nagamine,¹ Hirohiko Shibayama,² and Yoshiaki Tomiyama^{1,2}

TRANSFUSION December 2018; Vol 58, 3003-3013

Thirty-three-day storage of dithiothreitol-treated red blood cells used to eliminate daratumumab interference in serological testing

Henriette Lorenzen✉, Nazia Lone Akhtar, Maria Nielsen, Lea Svendsen, Pernille Andersen

Vox Sanguinis 2018; 113, 686-693

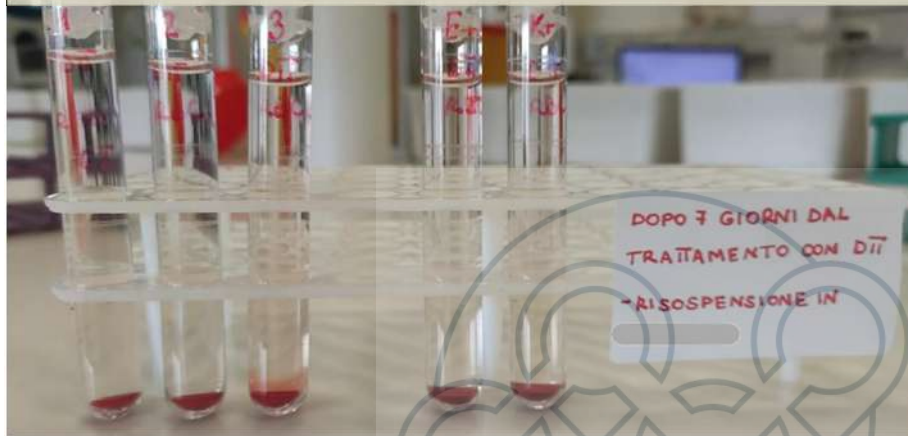
New method for overcoming the interference produced by anti-CD38 monoclonal antibodies in compatibility testing

Emma Castro Izaguirre¹, María del Mar Luis-Hidalgo¹, Luis Larrea González¹, Cristina Arbona Castaño¹

Blood Transfus 2020; 18: 290-4

Conservazione delle emazie dei pannelli di screening dopo trattamento con DTT

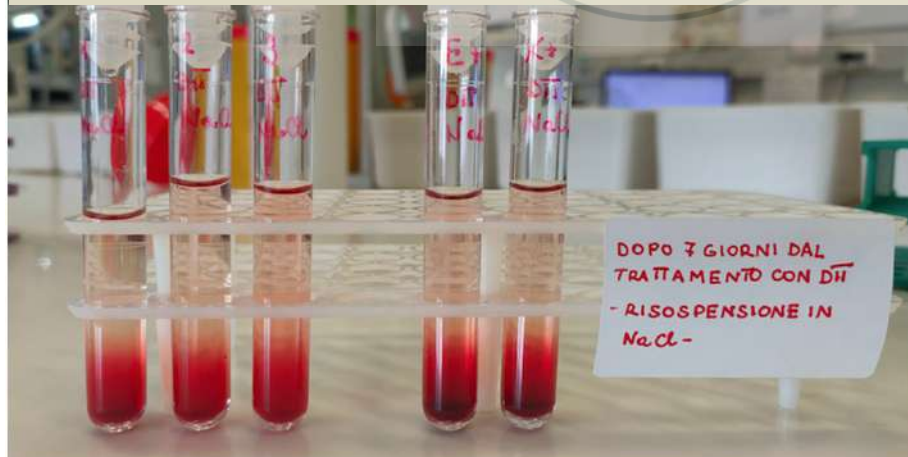
Emazie screening e controlli positivo e negativo dopo 7 giorno dal trattamento con DTT. Stabilizzazione in soluzione conservante



TCI con emazie test non trattate con DTT (1-3), controllo positivo e negativo (4-5) e TCI (6-8) con emazie trattate da 30 giorni e stabilizzate in soluzione conservante



Emazie screening e controlli positivo e negativo dopo 7 giorno dal trattamento con DTT. Stabilizzazione in NaCl

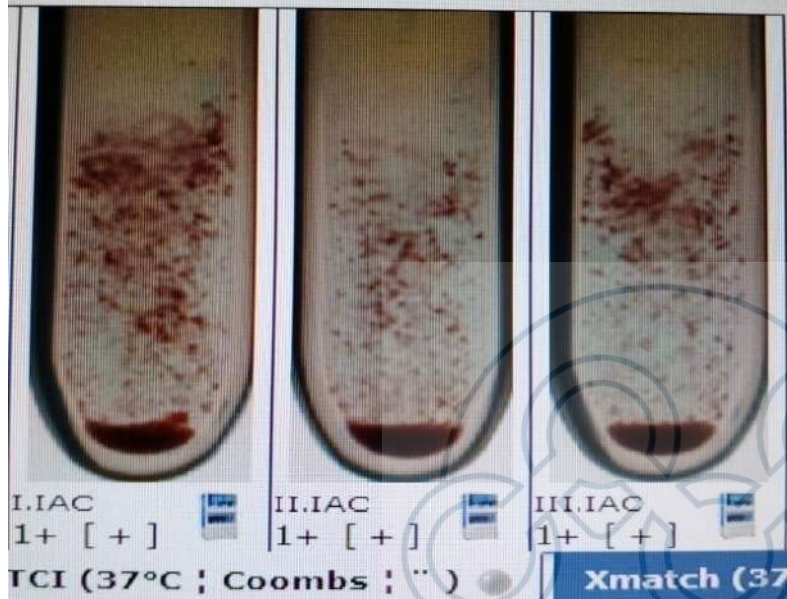


Controlli di Qualità Interni negativo (1-3) e positivo (5-7). Emazie test trattate con DTT da 30 giorni e stabilizzate in soluzione conservante

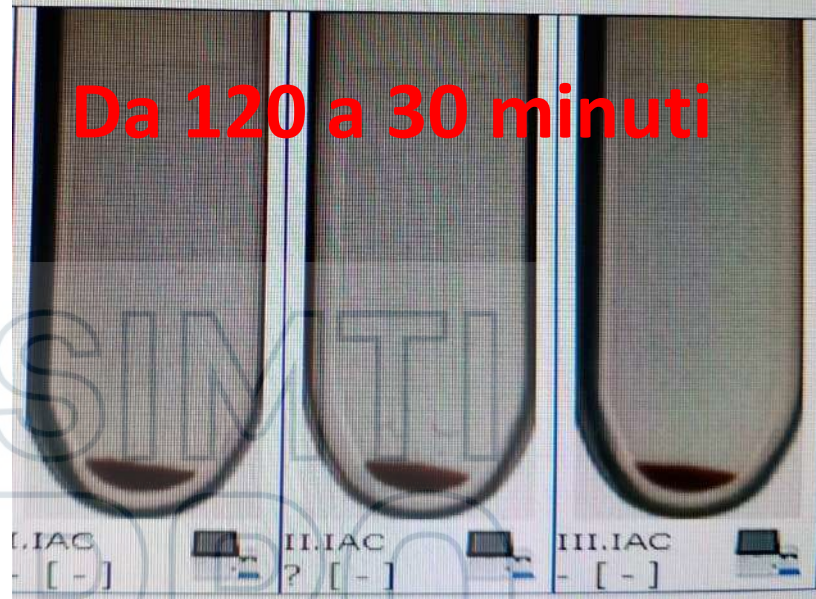


“Valencia Method”

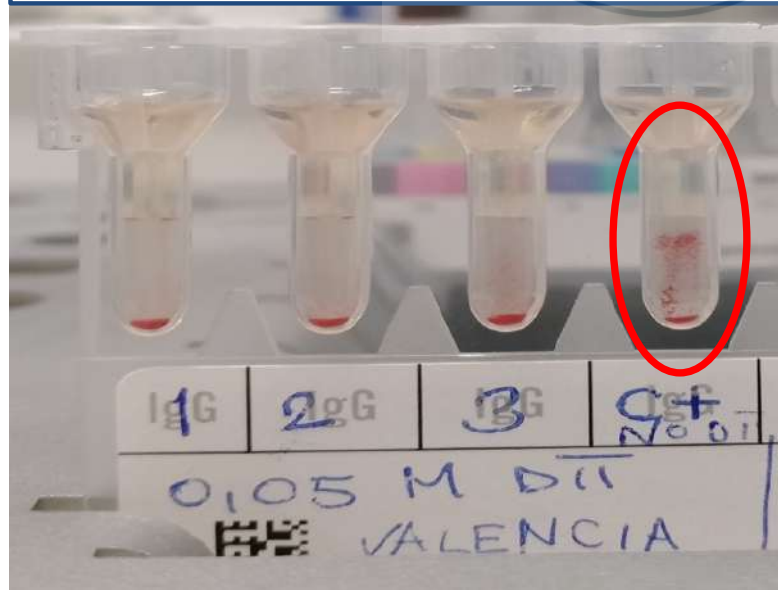
Nessun trattamento delle emazie test



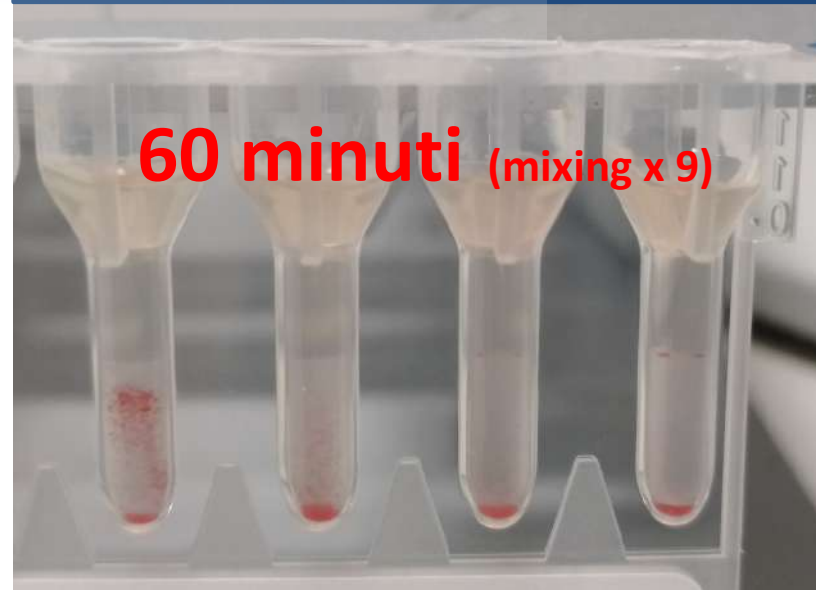
Trattamento emazie al 3% con DTT 0,2M



Trattamento delle emazie allo 0,8% con DTT 0,05 M



Trattamento delle emazie allo 0,8% con DTT 0,05 M



Caso clinico

SIT Vicenza dal 16/02/2022 al 02/04/2022

- Paziente 65 aa affetta da Mieloma Multiplo in trattamento con anti-CD38 dal 21/09/2021
- presente studio di base e nota storia trasfusionale
- **26 richieste trasfusionali** (di cui 17 dal Reparto di Anestesia e Rianimazione)
- Per **15 richieste di emazie concentrate** sono state compatibilizzate, dopo trattamento con DTT, un totale di **55 unità**
- Per **3 accessi in urgenza**, evase in 60 minuti, **9 unità** senza applicazione dell'intera procedura

In 2 casi abbinamento di unità, dall'esito **compatibile**, già assegnate in accessi precedenti.

In un caso abbinamento di unità non compatibilizzate dopo pretrattamento delle emazie con DTT

Esecuzione TCI con emazie pretrattate con DTT

- alcuna percentuale di alloimmunizzazione rilevata

Mitigazione interferenza sierologica da DARA

Metodo ELP-SIT Vicenza

- Lavaggi, con centrifuga per il lavaggio di cellule, di emazie paccate: autologhe, screening test 3-5%, unità per il crossmatch sierologico, pool controlli positivo (E+e+ oppure E+e-) e negativo (K+k+ oppure K+k-)
- Trattamento degli eritrociti con DTT 0,2 M (1:4) ed incubazione, in provetta, a 37°C per 40 minuti
- Lavaggi con lavatore automatizzato
- Risospensione delle emazie e semina in schedina Liss/Coombs
- Stabilizzazione degli eritrociti pretrattati in DTT per 30 giorni con soluzione conservante.

Distinct effects of daratumumab on indirect and direct antiglobulin tests: a new method employing 0.01 mol/L dithiothreitol for negating the daratumumab interference with preserving K antigenicity (Osaka method)

Mika Hosokawa,¹ Hirokazu Kashiwagi,² Kotarosumitomo Nakayama,¹ Mikiko Sakuragi,¹ Mayumi Nakao,¹ Tamayo Morikawa,¹ Tomoko Kiyokawa,¹ Hiroshi Aochi,¹ Keisuke Nagamine,¹ Hirohiko Shibayama,² and Yoshiaki Tomiyama^{1,2}

TRANSFUSION December 2018; Vol 58, 3003-3013

Resolving the daratumumab interference with blood compatibility testing

Claudia I. Chapuy,¹ Rachel T. Nicholson,¹ Maria D. Aguad,¹ Bjoern Chapuy,² Jacob P. Laubach,² Paul G. Richardson,² Parul Doshi,³ and Richard M. Kaufman¹

TRANSFUSION June 2015; Vol 55, 1545-1554

Thirty-three-day storage of dithiothreitol-treated red blood cells used to eliminate daratumumab interference in serological testing

Henriette Lorenzen, Nazia Lone Akhtar, Maria Nielsen, Lea Svendsen, Pernille Andersen

Vox Sanguinis 2018; 113, 686-693

Metodo ELP



Vantaggi

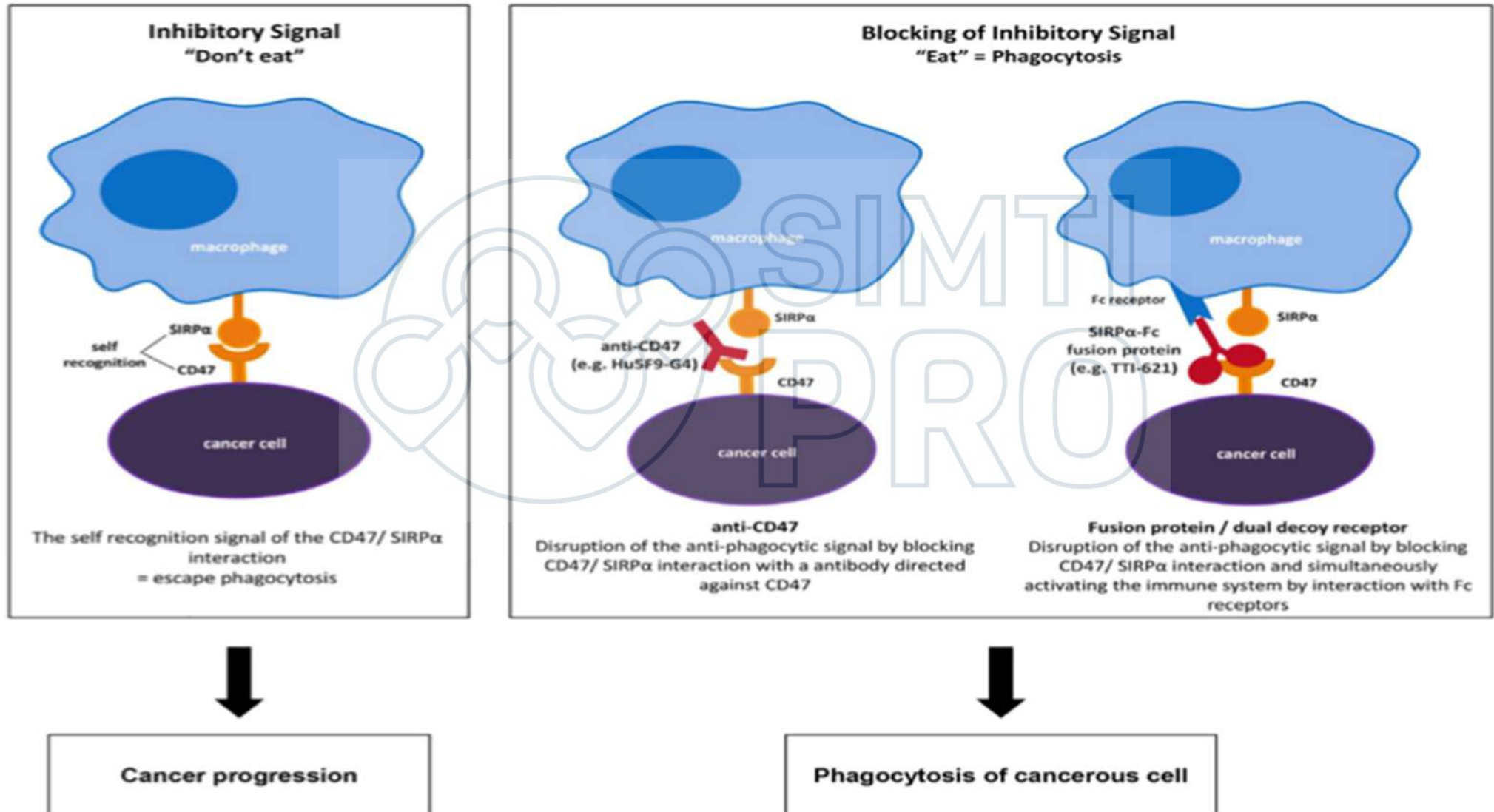
- **Riduzione turnaround time (TAT) da 180 a 120/30 minuti (Type and Screen)**
- **Estensione utilizzo pannelli di screening ed identificazione da 3 a 30 giorni**
- Possibilità di fornire risultati affidabili in tempistiche di urgenza
- Parziale automazione della procedura
- Tracciabilità dei risultati dopo applicazione della procedura
- Presenza di controllo positivo e negativo
- Metodo disponibile ed economico



Svantaggi

- Denaturazione antigeni Sistemi gruppoematici KEL, LU, DO, YT, KN, LW, IN
- Gestione dei test previsti dalla procedura in centri che processano un elevato numero di campioni

Mechanism of action of CD47- targeted anti-tumor therapy



Comparison between the RBC expression and the characteristics of pretransfusion interference observed with anti-CD38 and anti-CD47 therapy

Differences in	CD38	CD47
RBC expression	Low	High
Epitope/antigen shedding	Yes	No
Testing	*Anti-CD38	†Anti-CD47
Subclass	IgG1	IgG4
ABO interference	No	Yes
D and extended antigen typing problems	No	Possible
Antibody screen and crossmatch interference	IAT only (1+)	All phases (3+ to 4+)
Mitigation	Treat test RBCs with 0.2 M DTT or Trypsin	Use anti-IgG for IAT
Alloadsorption onto RBCs or platelets	No	Yes – multiple 3x to 4x
DAT/auto control (cause)	Negative or w+ (antigen loss)	Negative or w+ (blocking)
Eluate	Negative or w+	Strongly positive (3+ to 4+)

* Anti-CD38
† Anti-CD47
DTT = dithiothreitol; IAT = indirect antiglobulin testing.

Benefits (+) and drawbacks (–) of interference mitigation strategies for anti-CD38 and anti-CD47 agents in the transfusion laboratory

Mitigation strategy	Anti-CD38 agents	Anti-CD47 agents ^a
Reducing agents	(+) Validated, widely used (+) Inexpensive, reagents already available in TSL (+) Reagent cells can be pre-treated (–) Denatures additional antigens, including K	(–) Does not denature CD47 or remove drug interference
Enzymes	(+) Disrupts antigens different from those denatured by reducing agents (–) Less reliable CD38 disruption than DTT (–) Some clinically significant alloantibodies may be missed	(–) Does not deactivate or remove CD47
Soluble antigens	(+) Rapid neutralisation of anti-CD38 (–) Reagents not widely available, not licensed, and expensive (–) May dilute weakly reactive clinically significant antibodies	(+) Effective at negating interference with some anti-CD47 agents (–) Effect may be specific to particular anti-CD47 agent (–) Reagents not widely available or licensed (–) May dilute weakly reactive clinically significant antibodies
Antibody fragments	(+) Can be made with excess anti-CD38 drug (–) Reagents not commercially available and not licensed	Not studied
Adsorption studies	(–) CD38 concentrations on reagent RBCs too low for adsorption treatment	(+) Multiple rounds of papain-treated RBCs can be used in adsorption studies to mitigate interference with some anti-CD47 agents (–) Clinically significant alloantibodies may be lost during adsorptions leading to false negative results (–) Use of RBCs or platelets as adsorption substrate not readily available to TSLs (–) Not successful in removing interference (–) Cannot be used for crossmatching
Antigen negative reagent cells	(–) Cells are rare and not available for routine antibody screening (–) Cannot be used for crossmatching	(–) Not successful in removing interference (–) Cannot be used for crossmatching
AHG without IgG4 reactivity	(–) DARA and SAR are IgG1 molecules; technique works only with drugs with IgG4 chain	(+) May mitigate interference at IAT with some anti-CD47 drugs (–) No difference in non-IAT testing (–) Not effective with all anti-CD47 agents (–) Carryover effect has been noted

AHG, antihuman globulin; DARA, daratumumab; IAT, indirect antiglobulin test; RBC, red blood cell; SAR, isatuximab; TSL, transfusion service laboratory.

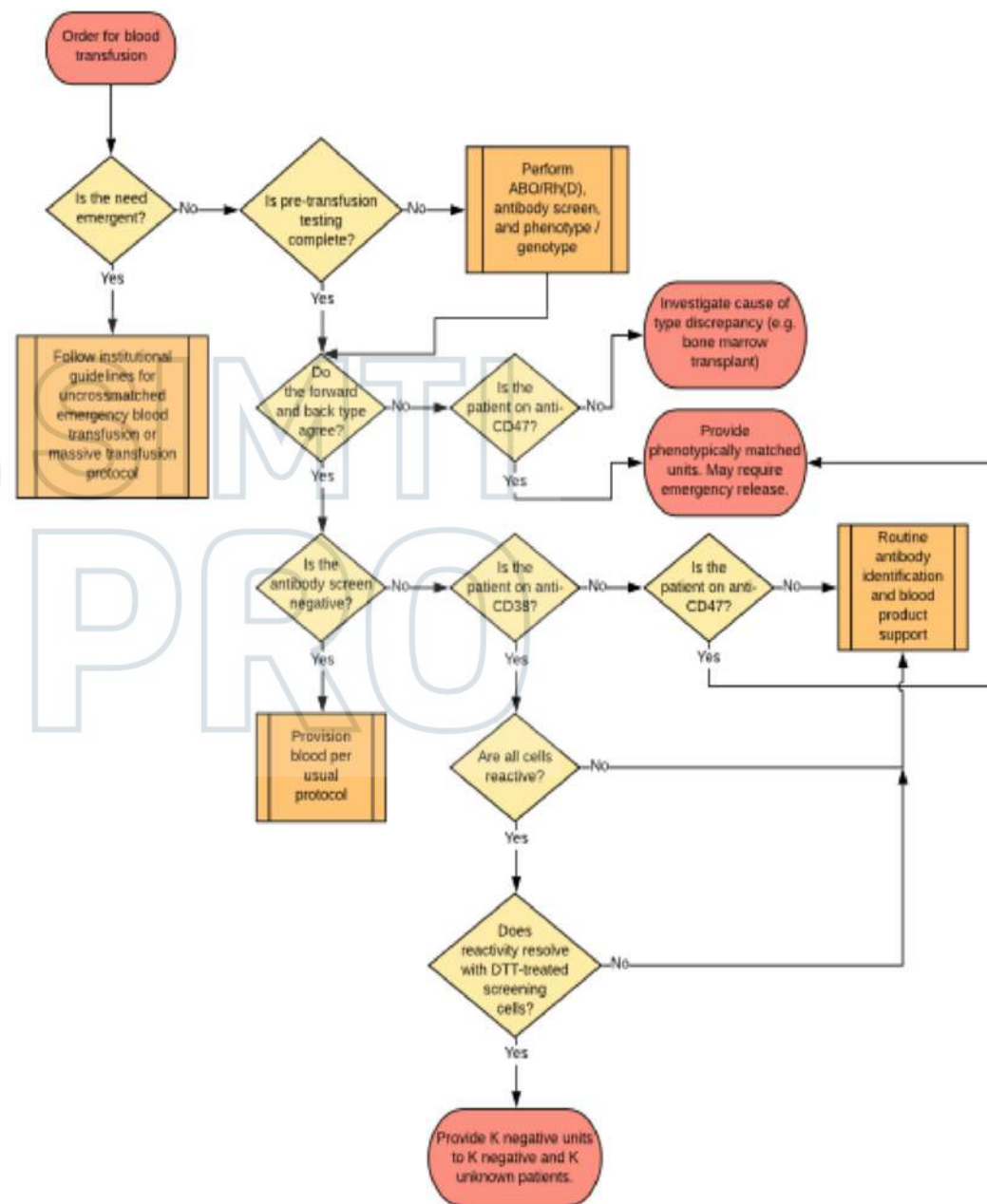
^a Reactivity and interference patterns of anti-CD47 agents are not class-specific and may vary significantly between individual drugs.



**Take home message*

- Comunicazione immediata al Servizio Trasfusionale dei pazienti candidati a terapia con anticorpi monoclonali
- Inquadramento della condizione sierologica di base
- Predisposizione di protocolli locali da parte dei laboratori delle Strutture Trasfusionali

General outline of blood product provisioning for patients on mAb therapy





Grazie!