

Alma Mater Studiorum - Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE CARDIO NEFRO TORACICHE

Ciclo 34

Settore Concorsuale: 06/D2 - ENDOCRINOLOGIA, NEFROLOGIA E SCIENZE DELLA
ALIMENTAZIONE E DEL BENESSERE

Settore Scientifico Disciplinare: MED/14 - NEFROLOGIA

EFFICACIA DEL TOCILIZUMAB NEL TRATTAMENTO DEL RIGETTO
UMORALE CRONICO-ATTIVO NEL PAZIENTE TRAPIANTATO DI RENE

Presentata da: Marco Busutti

Coordinatore Dottorato

Gaetano Domenico Gargiulo

Supervisore

Gaetano La Manna

Esame finale anno 2022

INDICE

1.	<i>Introduzione</i>	3
2.	<i>Obiettivi dello studio</i>	6
3.	<i>Materiali e Metodi</i>	7
	3.1. <i>Disegno dello studio</i>	
	3.2. <i>Popolazione dello studio</i>	
	3.3. <i>Trattamenti</i>	
	3.4. <i>Visite e valutazioni (studio prospettico)</i>	
	3.5. <i>Metodi statistici</i>	
	3.6. <i>Metodi di laboratorio</i>	
4.	<i>Risultati Studio Retrospettivo</i>	16
5.	<i>Risultati Preliminari Studio Prospettico</i>	21
6.	<i>Discussione</i>	24
7.	<i>Conclusioni</i>	26
8.	<i>Bibliografia</i>	27
9.	<i>Abstract</i>	30

1. Introduzione

Il trapianto di rene rappresenta il gold standard terapeutico nel paziente affetto da insufficienza renale terminale (End Stage Renal Disease – ESRD), garantendo migliori outcomes sia in termini di sopravvivenza che di qualità della vita rispetto al trattamento dialitico (1).

Negli ultimi decenni, grazie ai progressi ed all'ottimizzazione delle terapie immunosoppressive di induzione e di mantenimento, sono stati effettuati significativi miglioramenti nella sopravvivenza a breve termine dell'organo trapiantato (2; 3); al contrario, non si è osservato un corrispondente miglioramento nella sopravvivenza dell'organo a lungo termine, spingendo la comunità scientifica alla ricerca delle "barriere" che ostacolano la *long-term graft survival*.

Una delle maggiori cause di perdita tardiva del rene trapiantato, riconosciuta e meglio caratterizzata solo in tempi molto recenti, ed è rappresentata dal rigetto umorale cronico-attivo (chronic-active Antibody Mediated Rejection, cAMR), principalmente causato dalla presenza di anticorpi anti-HLA donatore specifici (donor specific antibodies, DSA) (4).

La diagnosi di cAMR si basa su elementi laboratoristici ed istologici: la presenza di DSA associata a specifiche lesioni morfologiche, in particolare l'infiammazione ed il danno microvascolare associati o meno alla deposizione di C4d (5).

La fisiopatologia del rigetto anticorpo mediato (AMR) riconosce un ruolo primario degli anticorpi, dei linfociti B e delle plasmacellule, pertanto il trattamento si basa sulla deplezione di tali elementi mediante IVIg, rituximab and/or plasma exchange (6 - 10). Sebbene i dati disponibili siano perlopiù provenienti da studi retrospettivi e piccoli trial pilota, tali terapie hanno mostrato risultati incoraggianti nel trattamento del rigetto acuto anticorpo mediato. Al contrario, i risultati sul trattamento del cAMR si sono rivelati deludenti (11) e diversi studi hanno mostrato che nell'epoca dei più moderni regimi di terapia immunosoppressiva la principale causa di perdita dell'organo a lungo termine è rappresentata proprio dal cAMR con deposizione di C4d (4); si stima che negli USA circa 5000 trapianti di rene ogni anno vadano incontro a fallimento funzionale principalmente a causa del cAMR (12). Considerate queste premesse, appare chiaro come gli sforzi della comunità scientifico-trapiantologica si siano rivolti ad individuare nuove strategie terapeutiche efficaci nei confronti del cAMR.

L'interleukina 6 (IL-6) è una citochina che svolge un ruolo chiave nella regolazione dell'infiammazione e nello sviluppo, maturazione ed attivazione dei linfociti B e T e delle plasmacellule (13). Una iperproduzione di IL-6 è stata associata a numerose patologie

caratterizzate da autoimmunità e disregolata produzione di anticorpi (14). E' stato inoltre dimostrato come l'interazione tra IL-6 ed il suo recettore (IL-6R) rappresenti un passaggio fondamentale nella produzione di alloanticorpi in modelli animali immunizzati; l'interruzione dell'interazione tra IL-6 ed IL-6R portava ad una significativa riduzione degli alloanticorpi, ad una riduzione della produzione splenica e midollare di anticorpi, all'inibizione diretta della produzione di anticorpi anti HLA da parte delle plasmacellule ed alla produzione di linfociti T ad attività regolatoria (Tregs) (15). (Figura 1)

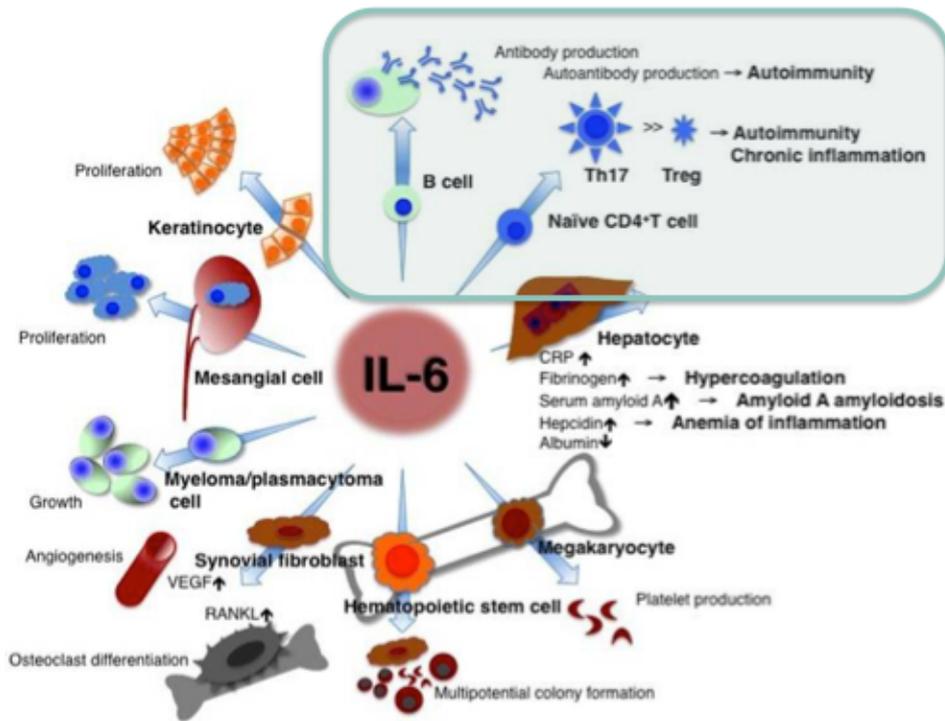


Figura 1: ruoli fisiopatologici dell'IL-6. *International Journal of Biological Sciences* 08: 1227.

Tocilizumab (Actemra/RoActemra, Roche/Genentech, San Francisco, CA) è un anticorpo monoclonale umanizzato diretto contro il recettore dell'IL-6 che lega sia la forma solubile che quella legata alle membrane cellulari, ed è stato approvato dalle agenzie regolatorie (FDA, EMA ed AIFA) per il trattamento dell'Artrite Reumatoide e dell'Artrite Giovanile Idiopatica.

Nel 2017 Choi et al. hanno descritto i benefici del trattamento con tocilizumab (TCZ) endovena come rescue-therapy in 36 pazienti affetti da cAMR non responsivo a IVIg, rituximab e plasma exchange. In questo studio si è osservato un calo dei livelli di DSA, una stabilizzazione della funzione renale a 36 mesi, associati ad una riduzione dell'infiammazione microvascolare e ad una stabilizzazione della transplant glomerulopathy (TG) nelle biopsie a 12 mesi (16), come riportato in Figura 2.

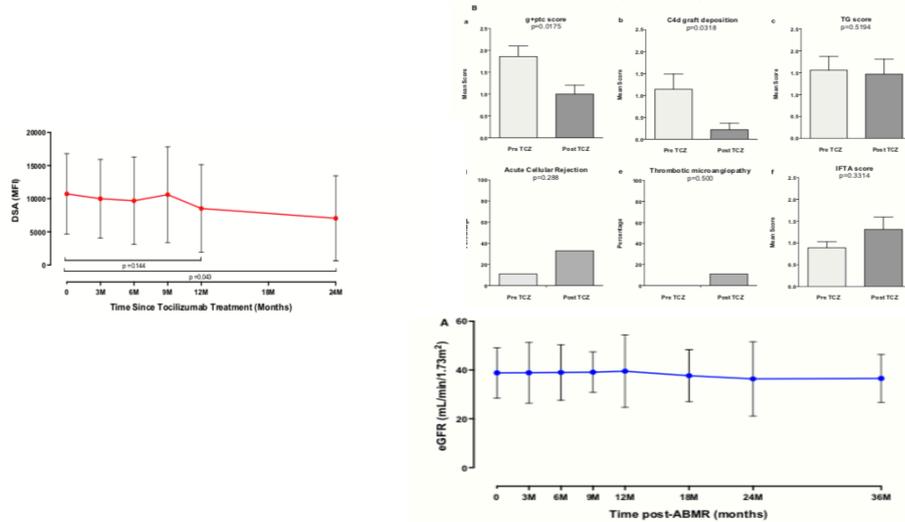


Figura 2: andamento dell'eGFR, dei DSA e dei parametri istologici di cAMR dopo trattamento con TCZ nello studio di Choi et al. (16).

Tuttavia questo studio ha sollevato dubbi per quanto concerne il carico di terapia immunosoppressiva al quale erano stati sottoposti i pazienti e se i risultati fossero esito del trattamento con TCZ o della somma del TCZ associato ai trattamenti effettuati in precedenza.

Un successivo studio italiano ha indagato l'efficacia del TCZ endovenoso come trattamento di prima linea del cAMR, ottenendo analoghi risultati sia dal punto di vista laboratoristico (stabilizzazione della funzione renale e riduzione dell'intensità dei DSA) che istologico (riduzione dell'infiammazione microvascolare e della deposizione di C4d, stabilizzazione della TG e dell'IF/TA) (17), come riassunto in Figura 3.

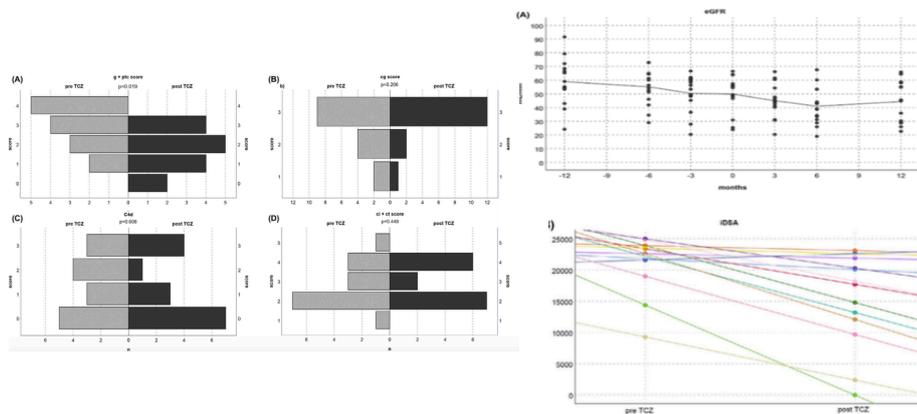


Figura 3: andamento dell'eGFR, dei DSA e dei parametri istologici di cAMR dopo trattamento con TCZ nello studio di Lavacca et al. (17).

In questo studio veniva inoltre evidenziata, sia a livello biomorale che immunostochimico, la up-regulation nell'espressione di geni coinvolti nella riparazione podocitaria, mesangiale e tubulare (TJP-1, AKR1C3, and CASK) dopo il trattamento con TCZ (17).

Un recente clinical trial randomizzato pubblicato dal gruppo del Prof.

Vincenti della UCSF, effettuato su pazienti trapiantati di rene con riscontro precoce in biopsie di protocollo di infiammazione del microcircolo, ha mostrato l'efficacia del TCZ sia nel ridurre il grado di infiammazione globale (Banff ti score 62.5% vs. 21.4%, $p = .03$) che nell'aumento di espressione di citochine (Teff) e cellule che inducono immunotolleranza (Treg frequency $7.1\% \pm 5.55\%$ vs. $3.6\% \pm 1.7\%$, $p = .0168$) rispetto al gruppo di controllo (20).

Risulta quindi evidente come i dati riguardanti l'efficacia del TCZ somministrato per via endovenosa nel trattamento del cAMR, seppur al momento limitati a pochi case series ed un unico trial randomizzato, abbiano fornito risultati molto incoraggianti.

Non sono ancora presenti dati in letteratura per quanto riguarda l'utilizzo del TCZ nella formulazione per iniezione sottocutanea, sebbene ampi trial clinici eseguiti su pazienti affetti da artrite reumatoide abbiano mostrato una totale sovrapponibilità sia in termini di efficacia che di sicurezza rispetto all'iniezione endovenosa, portando a ritenere la somministrazione sottocutanea da preferire anche in relazione al rapporto cost-effectiveness (18; 19).

2. Obiettivi dello studio

Lo studio ha come obiettivo primario quello di valutare l'efficacia del TCZ, sia nella formulazione endovenosa che sottocutanea, nel trattamento del cAMR nei pazienti portatori di trapianto di rene afferenti all'Ambulatorio di Follow-Up del Trapianto di Rene dell'U.O. Nefrologia, Dialisi e Trapianto del policlinico Sant'Orsola-Malpighi diretta dal Prof. G. La Manna.

L'efficacia del farmaco è stata valutata su tre classi di parametro:

- Parametri laboratoristici: stabilizzazione valori di sCreat ed eGFR a 24 mesi, riduzione della proteinuria e riduzione del titolo dei DSA;
- Parametri istologici: stabilizzazione delle lesioni croniche (TG, multilayering BM e arteriolar fibrosis) e regressione delle lesioni attive (g, ptc, reaction with vascular endothelium) secondo la Classificazione di Banff;
- Parametri biumorali e cellulari: monitoraggio routinario (esami del sangue e delle urine), quantificazione Luminex citochinica, caratterizzazione sottopopolazioni linfocitarie e monocitarie attraverso citometria a flusso.

Gli obiettivi secondari dello studio sono:

- il monitoraggio degli effetti collaterali della terapia specifica ed eventuale necessità di interrompere momentaneamente o in maniera definitiva la terapia

3. Materiali e Metodi

3.1. Disegno dello studio

Questo è uno studio osservazionale monocentrico, non sponsorizzato, effettuato per finalità scientifiche e di tutela della salute.

Lo studio si compone di 2 bracci temporalmente consecutivi:

- un braccio retrospettivo che prevede l'arruolamento dei pazienti con diagnosi di cAMR e già in trattamento con TCZ **endovena** afferenti all'Ambulatorio di Follow-Up del Trapianto di Rene dell'U.O. Nefrologia, Dialisi e Trapianto del policlinico Sant'Orsola-Malpighi diretta dal Prof. G. La Manna dal 01/01/2018 al 01/01/2020 (24 mesi).
- un braccio prospettico che prevede l'arruolamento dei pazienti con nuova diagnosi di cAMR afferenti all'Ambulatorio di Follow-Up del Trapianto di Rene dell'U.O. Nefrologia, Dialisi e Trapianto del policlinico Sant'Orsola-Malpighi diretta dal Prof. G. La Manna dal 01/09/2021 al 31/08/2023 (24 mesi).

3.2. Popolazione dello studio

Criteri di inclusione

- Soggetti maggiorenni con diagnosi di cAMR definita sulla base della Classificazione di Banff (21).
- Ottenimento del Consenso Informato scritto.
- Disponibilità dati sulla funzione renale, proteinuria e quantificazione Luminex citochinica a T0 ed ogni 6 mesi per 24 mesi (solo studio restrospektivo).

Criteri di esclusione

- Pazienti portatori di trapianto combinato (cuore-rene, fegato-rene o rene-pancreas)
- Trattamenti con terapie immunosoppressive quali rituxumab, plasma exchange, IVIg, eculizumab nei 12 mesi precedenti l'arruolamento
- Riscontro istologico di patologie concomitanti. (es. recidiva della nefropatia originaria o diagnosi di nefropatia "de novo", rigetto cellulare acuto, nefropatia da polyomavirus BK...)

3.3 Trattamenti

Nei pazienti con diagnosi di cAMR secondo i Criteri di Banff (21) alla terapia immunosoppressiva di mantenimento secondo pratica clinica, è stata associata la somministrazione di TCZ 8mg/kg ad infusioni endovenose mensili nel braccio retrospettivo ed ogni 14 giorni di 162 mg di TCZ sottocute nel braccio prospettico

3.4 Visite e valutazioni componente prospettica

Schema delle visite e delle valutazioni

Alla visita di baseline (V1) sono stati acquisiti i dati relativi alle variabili cliniche, laboratoristiche, istologiche e radiologiche. Sono stati valutati i criteri di inclusione e di esclusione ed acquisito il consenso informato.

I pazienti che soddisfano i criteri di inclusione ed esclusione e che prestano il loro consenso allo studio sono stati arruolati e nelle visite trimestrali è stato valutato: l'obiettività generale, le terapie concomitanti e gli esami di laboratorio; per tali visite è stata prevista una tolleranza di +/- 15 giorni.

Ogni 6 mesi è stata eseguita la ricerca di anticorpi anti-HLA e valutato il grado di soddisfazione per il trattamento. Sono stati inoltre eseguiti prelievi specifici per le analisi bioumorali e cellulari sotto riportati.

Ogni 12 mesi è stata eseguita la biopsia del rene trapiantato e l'ecografia doppler.

Parametri	V1 (baseline)	V2 (3 mesi)	V3 (6 mesi)	V4 (9 mesi)	V5 (12 mesi)	V6 (15 mesi)	V7 (18 mesi)	V8 (21 mesi)	V9 (24 mesi)
Storia clinica	x								
Criteri di incl./escl.	x								
Terapie concomitanti	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Consenso informato	x								
Obiettività generale	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Esami di laboratorio	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Ricerca anticorpi anti HLA			x		x		x		x
Pannello Citochine e sottopopolazioni linfocitarie + stoccaggio materiale biologico (siero e urine)	x		x		x		x		x
Esami strumentali (Ecografia addome)	x				x				x
Biopsia rene Trapiantato					x				x
Eventi avversi		x	x	x	x	x	x	x	x
Valutazione del grado di soddisfazione per il trattamento			x		x		x		x

Esami di laboratorio

Emocromo completo, Creatinina (mg/dL), eGFR (mL/min), Na/K (mmol/L), Ca/P (mg/dL), valori di uricemia (mg/dL), AST/ALT (U/L), GGT (U/L), glicemia (mg/dL), Hb Glicata (mmol/mol), sottopopolazioni linfocitarie, PCR; esame urine completo, proteinuria delle 24 ore (mg/24h), alb-U/creat-U ratio.

Livelli ematici della terapia immunosoppressiva concomitante (tacrolema T0, everolema T0, ciclosporinemia T0 e T2); i range di riferimento utilizzati sono gli stessi della abituale pratica clinica.

Controllo degli esami virologici (CMV, EBV e BKV DNA) secondo pratica clinica.

3.5 Metodi statistici

I dati sono descritti per quanto riguarda le caratteristiche demografiche e basali, i parametri di efficacia e le osservazioni di tollerabilità e sicurezza. Sono state quindi condotte analisi descrittive utilizzando le statistiche appropriate: i parametri qualitativi sono espressi come frequenze assolute e relative, le variabili quantitative sono mostrate come media, mediana e deviazione standard (DS) o come mediana e range interquartile (IQR, P25, P75), in accordo con la loro distribuzione. Le variabili non parametriche sono state comparate con il Mann-Whitney U test o con il test Kruskal-Wallis. Curve Kaplan Meyer verranno eseguite per mostrare le sopravvivenze. E' stata considerata statisticamente significativa una $p < 0.05$. L'analisi dei dati è stata eseguita utilizzando il software SPSS 25.0 (SPSS, Chicago, IL, USA).

3.6 Metodi di laboratorio

Raccolta PBMC

Cellule mononucleate del sangue periferico (Peripheral blood mononuclear cells - PBMCs) saranno ottenute a partire dai soggetti in studio dopo consenso informato, e a T1, T2 e T3.

I PBMC verranno isolati da sangue intero mediante centrifugazione su gradiente di densità su Ficoll (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Svezia) contati e congelati per ulteriori indagini di caratterizzazione citometrica e genica.

Il seguente protocollo descrive in dettaglio il metodo di isolamento per un campione di 9 ml di sangue EDTA:

- Diluire il sangue periferico in PBS 1:2.

- Stratificare delicatamente 10 ml di sangue diluito su 4,5 ml di Ficoll in falcon da 15 ml
- Centrifugare a 1500 rpm per 30 minuti a 21°C.
- Aspirare lo strato superiore di plasma lasciando l'anello di cellule mononucleate all'interfase tra plasma e Ficoll.
- Trasferire l'anello di cellule mononucleate a una nuova falcon da 50 ml e portare a volume con PBS.
- Mescolare e centrifugare a 1500 rpm per 5 minuti a 21° C. Rimuovere totalmente il surnatante.
- Per la conta cellulare verrà utilizzata la camera Bürker e le cellule saranno colorate con Trypan Blue. Preparare 190 µl di Trypan Blue e 10 µl di sospensione cellulare e risospesione. Trasferire 10 µl di sospensione cellulare nella camera di conta. Contare le cellule in quadrati delimitati dalla linea tripla.

Il numero totale di cellule sarà calcolato con la seguente formula:

$\text{num.cellule/ml} = \text{media cell contate} \times \text{fattore di diluizione della camera (10000)} \times \text{diluizione Trypan (20)}$

Le cellule verranno centrifugate e risospese in FBS + DMSO al 10% (almeno 20 milioni di cellule mononucleate per vial). Le provette verranno poste a -80°C per almeno una notte intera. Il giorno dopo la provetta sarà trasferita in azoto liquido.

Le cellule così ottenute sono pronte per analisi citofluorimetriche di markers intracellulari e di superficie o per saggi su colture cellulari.

Analisi citometrica di sottopopolazioni cellulari

I PBMC ottenuti mediante centrifugazione su gradiente di densità di Ficoll verranno marcati con sonde fluorescenti specifiche (anticorpi marcati con fluorocromi) e misurata la quantità di fluorescenza emessa dalla cellula stessa. Il citofluorimetro a flusso è un particolare strumento che può rilevare la fluorescenza emessa da una singola cellula in sospensione e quindi determinare il numero delle cellule che esprimono la molecola a cui la sonda fluorescente si lega.

Analisi di marker di superficie

- Risospesione i PBMC in 1ml Flow Cytometry Staining Buffer (PBS + 1% BSA);
- centrifugare a 1200 rpm per 7 min;
- risospesione il pellet ottenuto in 50 µl di mixture ottenuta dagli anticorpi desiderati in Flow Cytometry Staining Buffer;
- incubare gli anticorpi per 30 minuti a 4°C.

- Aggiungere 1 ml di Flow Cytometry Staining Buffer e centrifugare a 1200 rpm per 7 min;
- risospendere il pellet in 100 µl di Flow Cytometry Staining Buffer e si lascia il tutto a 4°C fino al momento della lettura al Cytoflex S (BeckmanCoulter).

Per analisi di markers di superficie di PBMC saranno utilizzati i seguenti anticorpi: Live/Dead Blue (ThermoFisher) per escludere le cellule morte. Anti-CD3 Brilliant Ultraviolet 737 (clone UCHT1, BD), anti-CD4 BV650 (clone OKT4, Biolegend), anti-CD8 APC/Cy7 (clone RPA-T8, Biolegend), e anti-granzima B Alexa Fluor 700 (clone GB11, BD). Inoltre, anti-CD45 BV510 (clone HI30, BioLegend), CD14 AF700 (clone M5E2 BioLegend), CD3 BV650 (clone OKT3 BioLegend), CD19 FITC (clone HIB19, BD), CD56 PerCPCy5.5 (clone HCD56, BioLegend), CD16 PE-CF594 (clone 3G8, BD), HLA-DR BV785 (clone L243, BioLegend) e CD69 PE (clone FN50, BD).

Intracellular staining

Per l'analisi del rilascio di citochine o di markers intracellulari, le cellule verranno stimulate con brefeldina A (Golgi-plug, BD), la quale impedisce il rilascio extracellulare delle citochine, permeabilizzate e fissate.

- Attivare le cellule con brefeldina A (Golgi-plug, BD) per 4 ore a 37°C.
- Lavare le cellule con 100ul di PBS e centrifugare a 1200 rpm per 7 min;
- staining di superficie.
- Trattare con citofix-citoperm (BD) per un'ora in ghiaccio.
- centrifugare a 1200 rpm per 7 min;
- risospendere il pellet ottenuto in 50 µl di mixture ottenuta dagli anticorpi desiderati in citoperm;
- incubare gli anticorpi per 30 minuti a 4°C.
- lavare in Perm/wash (BD) e risospendere il pellet in 200 µl di Perm/wash;
- conservare i campioni a 4°C fino al momento della lettura al Cytoflex S (BeckmanCoulter).

Per analisi di markers intracellulari saranno utilizzati i seguenti anticorpi: IFNγ-PECy7 (clone 4S, BD) e IL17A-PE (clone BL168). Cellule marcate con controlli isotipici e privi di anticorpi sono state usate come controlli negativi di fluorescenza.

Proliferazione cellulare con CFSE

La proliferazione di PBMC, nei vari tempi analizzati sana misurata tramite la valutazione della diminuzione dell'intensità di fluorescenza del CFSE (BD, Cat 51-9010817). Il CFSE si intercala a livello del DNA. In particolare, formando un legame tra il gruppo succinimmidico del CFSE e i residui amminici del DNA, in particolare di lisina.

Le cellule derivate dal campione di sangue (PBMC), saranno scongelate e risospese in 5 ml di PBS 1X (Phosphate-buffered saline), ed incubate con 1 µl di CFSE per 5 minuti a 37°. Terminata e bloccata la reazione di marcatura, le cellule verranno risospese in terreno di cultura RPMI 1640 integrato con 2 mM L-glutammina (EuroClone, Cat ECB3000D), 1% di siero umano AB (EuroClone, Cat ECS0219D), 100 U/ml di penicillina-streptomina (Aurogene, Cat AU-L0022-100), 0,1% di b-Mercaptoetanol (Gibco, Cat 31350-010), 1% di sodio piruvato (Aurogene, Cat AU-L0642-500), 1% di amminoacidi non essenziali (Aurogene, AU-X0557-100). Le cellule verranno attivate tramite anticorpi CD3 (Invitrogen, Cat 16-0039-85) e CD28 (Invitrogen, Cat 16-0289-85), e incubate per 3 giorni in piastre da 96 pozzetti a 37° al 5% di CO₂.

Dopo l'incubazione per verificare la proliferazione di CD4 e CD8 le cellule saranno raccolte, marcate con anticorpi specifici, e preparate per l'analisi citofluorimetrica tramite Cytotflex S (BeckmanCoulter).

Saggio dell'Annessina V

Il saggio consente di rilevare lo stadio precoce e tardivo di apoptosi e di distinguere l'apoptosi dalla necrosi in citofluorimetria. Le cellule mononucleate prelevate dal sangue periferico dei pazienti, saranno risospese in 100 µl di buffer specifico, presente nel kit annessina V, e marcate con 2 µl di annessina V coniugata PE (Biolegend, Cat 640908) e 7AAD+ (Biolegend, Cat 79993) e incubati per 15 minuti a temperatura ambiente. In questo modo le cellule positive solo all'Annessina verranno classificate in cellule in apoptosi precoce. Quelle positive al 7AAD+ saranno distinte come cellule in necrosi, e quelle positive ad entrambi in cellule in apoptosi tardiva. Dopo l'incubazione la reazione verrà bloccata con 400 µl di buffer e i risultati acquisiti tramite citofluorimetro Cytotflex S (BeckmanCoulter). L'analisi dei dati sarà effettuata tramite il software dedicato, Cytobank, Inc

Raccolta plasma

Il plasma sarà ottenuto a partire dai soggetti in studio dopo consenso informato. Il seguente protocollo descrive in dettaglio il metodo di isolamento per un campione di 6 ml di sangue EDTA in pazienti a digiuno.

1. Effettuare il prelievo di sangue intero da una vena periferica con provette contenenti K3 EDTA;
2. centrifugare entro due ore dal prelievo, a 3000 rpm 10 min alla temperatura di 4°C;
3. prelevare il plasma (surnatante) con pipette adeguate, facendo attenzione a non aspirare il pellet che si forma sul fondo della provetta e dividerlo in aliquote (da 500ul) in provette adatte alla crioconservazione (tale procedura è essenziale per evitare ripetuti congelamenti e scongelamenti);
4. conservare tutte le provette, in scatole da congelamento, a -80°C fino al loro utilizzo.

Il plasma così ottenuto è pronto per indagini quantitative, di proteine, citochine, chemochine, anticorpi, markers di danno renale o di rigetto tramite saggio Luminex.

Raccolta siero

Il siero sarà ottenuto a partire dai soggetti in studio dopo consenso informato. Il seguente protocollo descrive in dettaglio il metodo di isolamento per un campione di 6 ml di sangue intero in pazienti a digiuno.

1. Effettuare il prelievo di sangue intero da una vena periferica con provette senza anticoagulante (provette vuote per siero) rispettando gli standard di sterilità/asepsi;
2. mantenere il prelievo a temperatura ambiente per un intervallo di tempo compreso tra 30 e 45 minuti per favorire la formazione del coagulo;
3. centrifugare il sangue a 3000 rpm per 15 minuti a temperatura ambiente;
4. Dividere il surnatante in aliquote (da 500ul) in provette adatte alla crioconservazione (tale procedura è essenziale per evitare ripetuti congelamenti e scongelamenti);
5. conservare tutte le aliquote, in scatole da congelamento, a -80°C fino al loro utilizzo.

Il siero così ottenuto è pronto per indagini quantitative, di proteine, citochine, chemochine, anticorpi, markers di danno renale o di rigetto tramite saggio Luminex.

Raccolta urine

L'analisi delle urine rappresenta un mezzo indispensabile nella valutazione del paziente con funzione renale alterata, proteinuria, ematuria, infezione delle vie urinarie o nefrolitiasi, fornendo informazioni insostituibili riguardo a numerose malattie renali

primitive, condizioni sistemiche ma anche una fonte di materiale fondamentale per l'identificazione di markers di danno e tossicità renale.

L'urina sarà raccolta dai soggetti in studio dopo consenso informato. Il seguente protocollo descrive in dettaglio il metodo di raccolta e conservazione per un campione di 30 ml di urine.

- Raccogliere l'urina nel contenitore con sonda di prelievo integrata;
- mantenere il prelievo a 4°C e trasferire l'urina in tubi da 15ml attraverso la sonda;
- centrifugare l'urina a 1500 rpm per 15 minuti a temperatura controllata;
- dividere il surnatante in aliquote (da 500ul) in provette adatte alla crioconservazione (tale procedura è essenziale per evitare ripetuti congelamenti e scongelamenti);
- conservare tutte le aliquote, in scatole da congelamento, a -20°C fino al loro utilizzo.

L'urina così ottenuto è pronta per indagini quantitative, di proteine, citochine, chemochine, anticorpi, markers di danno renale o di rigetto tramite saggio Luminex.

Analisi Luminex xMAP

In siero, plasma e urine verranno analizzate, tramite tecnologia Luminex, proteine caratterizzanti pathway infiammatori, di apoptosi, di attivazione del complemento, di necrosi o di danno renale. La tecnica si basa sull'uso di microsferi che permettono dosaggi sia in singolo che in multiplex per la determinazione qualitativa e quantitativa di proteine ed acidi nucleici.

I protocolli sono forniti dall'azienda fornitrice.

4. Risultati Studio Retrospektivo

Nella componente retrospektiva dello studio sono stati arruolati 12 pazienti con diagnosi di cAMR e sottoposti a trattamento con TCZ endovena al dosaggio di 8mg/kg al mese nel periodo previsto dai criteri di inclusione. Le principali caratteristiche sono riportate nella tabella 1.

L'età media dei pazienti al trapianto era di 39 anni, si trattava per 60% di pazienti di sesso maschile ed erano tutti primi trapianti con organo singolo; in 1 caso si trattava di donatore vivente ed in 1 caso di un donatore marginale (ECD). Le cause di ESRD più comuni erano rappresentate da anomalie congenite (CAKUT) e da policistosi che rappresentavano entrambe il 25% dei casi, così come i pazienti con eziologia non definita; altre cause più rare sono riportate in tabella.

Nessuno dei pazienti arruolati presentava DSA al momento del trapianto ed il livello medio di immunizzazione era piuttosto basso con un PRAMax medio di 26. Metà dei pazienti ha ricevuto una terapia di induzione con ab anti IL2 recettore (basiliximab), il 25% con siero antilinfocitario (rATG) ed nel restante 25% non è stato possibile risalire all'informazione a causa della lunga età di trapianto.

Sono stati valutati l'andamento del trapianto in termini di creatinina sierica (sCreat) espressa in mg/dl, di velocità di filtrazione glomerulare (eGFR), stimata secondo l'equazione CKD-EPI, e di proteinuria espressa in rapporto mg/g di albumuria e creatininuria (UACR). Al momento della dimissione il filtrato medio (eGFR sec CKD-EPI) era di 49 ml/min, mentre non erano disponibili dati sull'incidenza di ritardata ripresa funzionale e sulla proteinuria.

Alla diagnosi di cAMR, l'età media dell'organo era di circa 15 anni ed il filtrato glomerulare medio di 32 ml/min. Tutti i pazienti presentavano diversi gradi di albuminuria, uno solo in range nefrosico; il valore medio era di circa 980 mg/g. Lo schema di terapia di mantenimento più comune era rappresentato da una triplice terapia con prednisone, inibitore di calcineurina e acido micofenolico nel 60% dei casi, seguito da schema duplice con prednisone e inibitore di calcineurina (25%); erano rappresentati più raramente anche altri schemi immunosoppressivi con inibitori di mTOR e privi di steroide.

Tutti i pazienti (come richiesto dai criteri di inclusione) avevano completato un follow-up di 24 mesi.

Tabella 1: Caratteristiche Pazienti Arruolati nello Studio Retrospektivo

	TCZ EV-treated patients (n=12)
Caratteristiche ricevente	
• Età al trapianto, media (DS)	39 ± 13
• Genere maschile, n° (%)	7 (58)
• Ritrapianti, n° (%)	0 (0)

• Trapianti Doppi, n° (%)	0 (0)
• Nefropatia originaria, n° (%)	
○ CAKUT	3 (25)
○ ADPKD/ARPKD	3 (25)
○ FSGS	1 (8.5)
○ Nefropatia Diabetica	1 (8.5)
○ Necrosi Corticale post CID	1 (8.5)
○ Sconosciuta	3 (25)

Caratteristiche Donatore

• Donatore deceduto, n° (%)	11 (91)
• Extended criteria donors, n° (%)	1 (8.5)

Caratteristiche del graft al trapianto

• sCreat (mg/dl), media (DS)	1.4 ± 0.5
• eGFR (mL/min/1.73 m²), media (DS)	49 ± 13
• UACR (mg/g), media (DS)	NA
• Delayed Graft Function, n° (%)	2 (25%)
• Anti-HLA DSA positivi, n° (%)	0 (0)
• maxPRA (%), media (DS)	26 ± 29
• Terapia di Induzione, n° (%)	
○ Basiliximab	6 (50)
○ ATG	3 (25)
○ Altro	3 (25)

Caratteristiche del graft alla diagnosi di cAMR

• Età del trapianto, media (DS)	14.6 ± 7
• sCreat (mg/dl), media (DS)	2.3 ± 0.7
• eGFR (mL/min/1.73 m²), media (DS)	32.2±14
• UACR (mg/g), media (DS)	982 ± 327
• Terapia di mantenimento, n° (%)	
○ PDN+ CNI + AMF	7 (58)
○ PDN + CNI	3 (25)
○ CNI + AMF (steroid-free)	1 (8,5)
○ PDN + mTORi + AMF	1 (8,5)

Follow-up 24 mesi, n° (%)	12 (100)
----------------------------------	-----------------

Legenda: UACR: urine albumine-creatinine ratio; PDN: prednisone; CNI: inibitore di calcineurina; AMF: acido micofenolico; mTORi: inibitore di mTOR

Per quanto riguarda le caratteristiche istologiche, tutti pazienti arruolati avevano effettuato una biopsia del rene trapiantato al tempo 0 (T0), necessaria per la diagnosi, ed una rivalutazione istologica a 12 mesi (T12, disponibile per 6/12 pazienti). La valutazione del preparato istologico è stata eseguita secondo i criteri di Banff (21).

Il livello medio di IFTA era pari a 2 e quello di transplant glomerulopathy (TG) pari a 3; entrambi si sono confermati invariati alla biopsia effettuata dopo 12 mesi di trattamento. Quindi lesioni croniche si sono mantenute stabili, mentre le lesioni attive presenti nella biopsia a T0 sono regredite nel 100% dei pazienti dopo 12 mesi di trattamento. I dati sono riassunti nella sottostante Tabella 2.

Tabella 2: Caratteristiche Istologiche a T0 e T12 nello Studio Retrospectivo

Caratteristiche Istologiche		T0	T12 (6 pz)
IFTA, media		1.8±0.7	2±0
TG, media		1.7±1.3	2±0.8
Glomerulitis, media		0.7±0.7	0.5±0.5
Banff	TG	x	x
Chronic	PTC multilayering EM	x	x
	Arterial intimal fibrosis	x	x
Active	Acute tissue injury (MTA, g>0/ptc>0, v>0, ATI)	x	0
	Antibody interaction with vascular endothelium (C4d)	x	0
	Serological evidence of donor-specific antibodies	x	x

Nel corso dei 24 mesi dello studio, di tutti i pazienti è stato valutato l'andamento del trapianto in termini di creatinina sierica (sCreat) espressa in mg/dl, di velocità di filtrazione glomerulare (eGFR), stimata secondo l'equazione CKD-EPI, e di proteinuria espressa in rapporto mg/g di albuminuria e creatininuria (UACR).

Il valore di eGFR medio a T0 era pari a 32 ml/min e, come atteso, si è progressivamente ridotto durante i 24 mesi di osservazione arrivando al valore medio di 26 ml/min, con una variazione di 6 ml/min che presentava significatività statistica (pValue <0.05); analogo andamento è stato conseguentemente osservato per quanto riguarda i valori di creatinina sierica.

4 pazienti, ovvero il 30% del campione, hanno raggiunto uno stadio di *end stage renal disease* (eGFR <15 ml/min), 3 dei quali con necessità di avviamento a trattamento sostitutivo e 1 in terapia conservativa.

Meno significativo l'andamento dei reperti urinari: tutti i pazienti a T0 presentavano proteinuria di modesta entità, solo 1 paziente in range nefrosico. Tali valori sono rimasti sostanzialmente invariati nel corso del periodo di osservazione con un UACR medio passato da 1190 mg/g a 980 mg/g con pValue non significativo. I dati sono riportati graficamente in Figura 4.

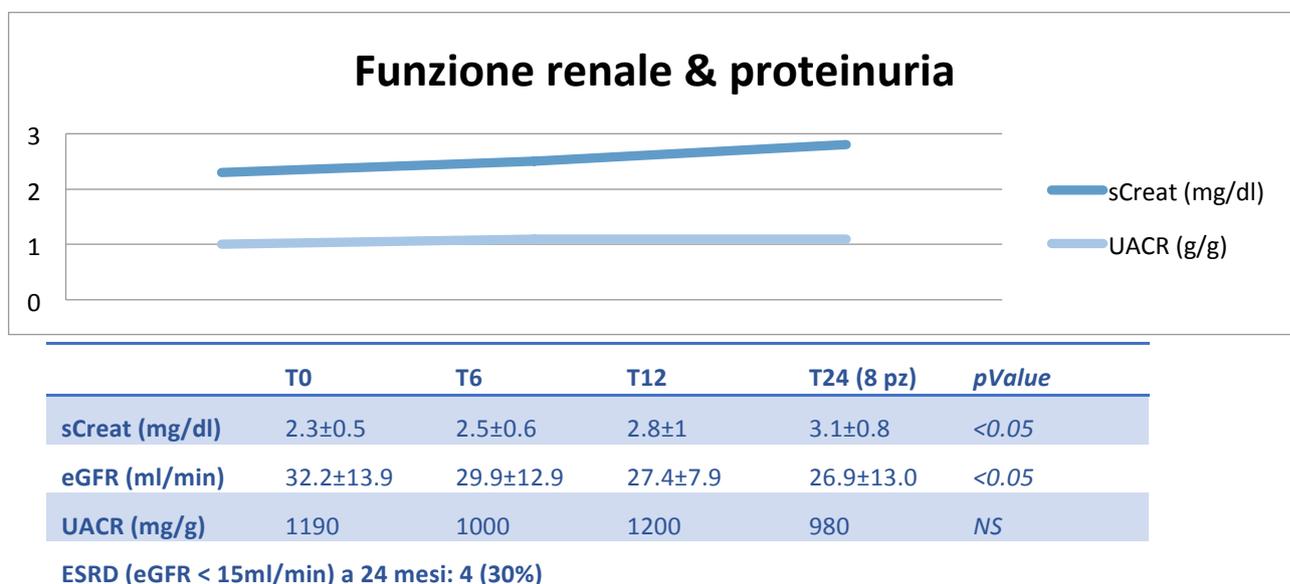


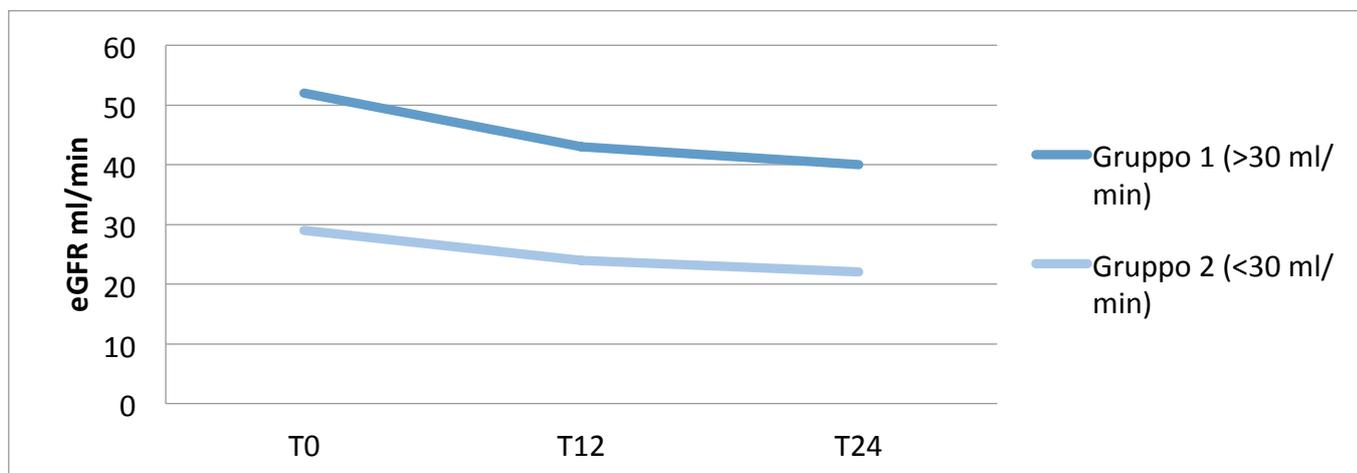
Figura 4: andamento della funzione renale e della proteinuria pazienti Studio Retrospectivo (graficamente riportato il valore della sCreat invece dell'eGFR per migliore fruibilità grafica)

Considerati i bassi valori medi di eGFR, l'elevata anzianità di trapianto ed la presenza di lesioni croniche avanzate al baseline, abbiamo provato suddividere la popolazione in studio in 2 gruppi per valutare il peso di queste caratteristiche sull'andamento funzionale.

Tuttavia, in relazione alla relativamente bassa numerosità del campione, non è stato possibile suddividere la popolazione in base a parametri istologici o all'età di trapianto; abbiamo potuto invece effettuare una suddivisione in base ai valori di eGFR a T0 utilizzando il valore di 30 ml/min come cut-off ed ottenendo così due gruppi da 6 pazienti ciascuno.

Risulta evidente come la curva dell'andamento dell'eGFR, seppur traslata verso il basso nel Gruppo II, sia sostanzialmente

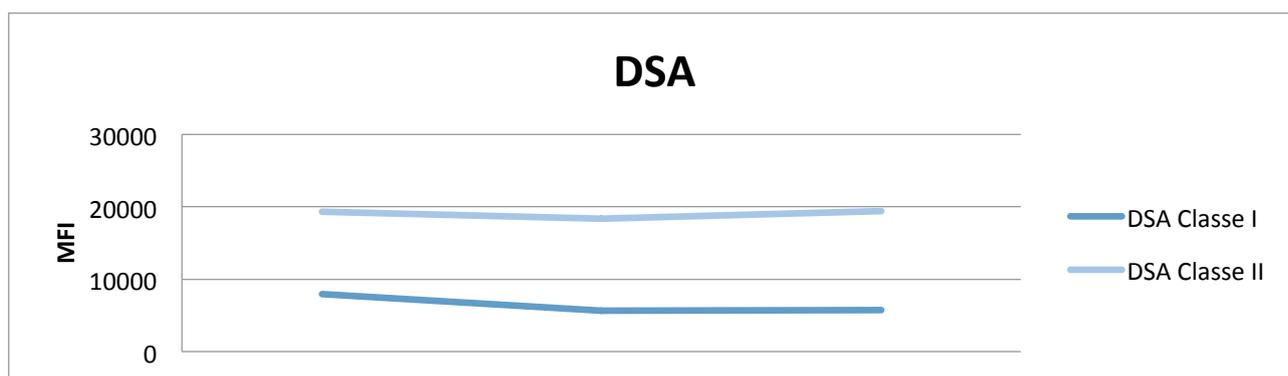
sovrapponibile; non è pertanto giustificato un diverso approccio terapeutico in base alla funzione renale al momento della diagnosi. Figura 5.



	T0	T12	T24	pValue
Gruppo I (eGFR baseline >30 ml/min)	52	43	40	NS
Gruppo II (eGFR baseline <30 ml/min)	29	24	22	NS

Figura 5: andamento dell'eGFR nei pazienti suddivisi in due gruppi in base all'eGFR a T0

Riguardo l'andamento dei DSA, quando ne erano presenti più di uno, è stato preso in considerazione (come indicato in letteratura) il DSA cosiddetto "immunodominante", ovvero quello con MFI più elevato. Come già riportato, nella popolazione in studio 8 pazienti presentavano DSA di Classe II e 4 pazienti avevano DSA di Classe I. Nessun paziente aveva DSA in entrambe le Classi contemporaneamente. Nel corso dei 24 mesi dello studio, il valore dei DSA era disponibile ogni 6 mesi (criterio di inclusione) e non sono stati osservate variazioni statisticamente significative nell'MFI medio né in Classe I né in Classe II; importante sottolineare come al T24 fossero disponibili i valori di DSA solo di 8 pazienti, in quanto i 4 pazienti che avevano raggiunto l'ESRD sono stati esclusi dalle valutazioni. I dati sono riportati graficamente in Figura 6.



	T0	T6	T12	T24 (8 pz)	pValue
DSA Classe I*	7950	5650	5700	6200	NS
DSA Classe II*	19300	18300	19400	19100	NS
* DSA immunodominante, ovvero con MFI più elevato in caso di presenza di multipli DSA					

Figura 6: andamento DSA pazienti studio Retrospectivo

Nel periodo di osservazione, non sono stati osservati eventi avversi di alcuna natura; nessun paziente ha necessitato di ricovero ospedaliero e/o ha dovuto sospendere il trattamento con TCZ in corso.

5. Risultati Preliminari Studio Prospettico

Nello studio Prospettico sono stati al momento arruolati 10 pazienti (reclutamento aperto fino al 31/08/2023, ovvero 24 mesi complessivi). Il target di arruolamento è rappresentato da 30 pazienti.

L'età media al trapianto era di 40 anni, si trattava nel 60% dei casi di pazienti di sesso maschile. 9 erano primi trapianti con organo singolo ed 1 era un secondo trapianto; 1 paziente aveva ricevuto l'organo da un donatore vivente e 9 da un donatore deceduto, dei quali il 30% marginale (ECD).

Nella maggior parte dei casi (60%) la nefropatia originaria non era nota, a seguire le più comuni erano rappresentate da glomerulonefriti, anomalie congenite (CAKUT) e ADPKD, rispettivamente il 20, 10 e 10% dei casi. Nessuno dei pazienti arruolati presentava DSA al momento del trapianto ed il livello medio di immunizzazione era intermedio basso con un PRAMax medio di 56. La maggior parte dei pazienti (40%) aveva ricevuto una terapia di induzione con ab anti IL2 recettore (basiliximab), il 30% con siero antilinfocitario (rATG) ed il restante 30% non nota.

Al momento della dimissione il filtrato medio (eGFR sec CKD-EPI) era di 42 ml/min, il 40% dei pazienti ha presentato una DGF mentre non erano disponibili dati sui reperti urinari.

Alla diagnosi di cAMR, l'età media dell'organo era di circa 17 anni ed il filtrato glomerulare medio di 32 ml/min. Tutti i pazienti presentavano diversi gradi di albuminuria, nessuno dei quali in range nefrosico; il valore medio era di circa 360 mg/g. Lo schema di terapia di mantenimento più comune era rappresentato da una triplice terapia con prednisone, inibitore di calcineurina e acido micofenolico (70% dei casi), seguito da schema duplice con prednisone e inibitore di calcineurina (30%).

Il tempo di follow-up medio disponibile per questi primi 10 pazienti dello studio prospettico è pari a circa 5 mesi.

I dati sono riassunti nella Tabella 3.

Tabella 3: Caratteristiche Pazienti Arruolati nello Studio Prospettico

	TCZ SC-treated patients (n=10)
Caratteristiche ricevente	
• Età al trapianto, media (DS)	40 ± 16
• Genere maschile, n° (%)	6 (60)
• Ritrapianti, n° (%)	1 (10)
• Trapianti Doppi, n° (%)	0 (0)
• Nefropatia originaria, n° (%)	
○ CAKUT	1 (10)
○ ADPKD	1 (10)
○ Nefrite Lupica	1 (10)
○ GN necrotizzante extracapillare	1 (10)
○ Sconosciuta	6 (60)
Caratteristiche Donatore	
• Donatore deceduto, n° (%)	9 (90)
• Extended criteria donors, n° (%)	3 (30)
Caratteristiche del graft al trapianto	
• sCreat (mg/dl), media (DS)	1.7 ± 0.7
• eGFR (mL/min/1.73 m²), media (DS)	42 ± 11
• UACR (mg/g), media (DS)	NA
• Delayed Graft Function, n° (%)	4 (40%)
• Anti-HLA DSA positivi, n° (%)	0 (0)
• maxPRA (%), media (DS)	56 ± 32
• Terapia di Induzione, n° (%)	
○ Basiliximab	4 (40)
○ ATG	3 (30)
○ Altro	3 (30)
Caratteristiche del graft alla diagnosi di cAMR	
• Età del trapianto, media (DS)	17 ± 11
• sCreat (mg/dl), media (DS)	2.0 ± 0.5
• eGFR (mL/min/1.73 m²), media (DS)	32.4 ± 8.6
• UACR (mg/g), media (DS)	366 ± 425
• Terapia di mantenimento, n° (%)	
○ PDN+ CNI + AMF	7 (70)
	3 (30)

○ PDN + CNI

Follow-up Medio, media mesi (DS)

5±3.8

Legenda: UACR: urine albumine-creatinine ratio; PDN: prednisone; CNI: inibitore di calcineurina; AMF: acido micofenolico; mTORi: inibitore di mTOR

Per quanto riguarda le caratteristiche istologiche, la valutazione della biopsia del rene trapiantato effettuata al T0 è stata eseguita secondo i criteri di Banff (21). Il livello medio di IFTA era pari a 1.6, la transplant glomerulopathy (TG) era presente nel 90% dei pazienti, così come la presenza di lesioni attive. Il C4d era positivo nel 60% dei pazienti.

Tabella 4: Caratteristiche Istologiche al Baseline dello Studio Prospettico

Caratteristiche Istologiche		T0
IFTA, media (DS)		1.6±0.9
TG, media (DS)		0.5±1.1
Glomerulitis, media (DS)		2.4±0.7
Banff	TG, n° (%)	9 (90)
Chronic	PTC multilayering EM	NA
	Arterial intimal fibrosis	8 (80)
Active	Acute tissue injury (MTA, g>0/ptc>0, v>0, ATI)	9 (90)
	Antibody interaction with vascular endothelium (C4d)	6 (60)
	Serological evidence of donor-specific antibodies	10 (100)

Purtroppo non è stato possibile effettuare alcuna considerazione sull'andamento dei pazienti arruolati nello studio prospettico in quanto, al momento della stesura del presente manoscritto, solo 2 pazienti avevano raggiunto il primo time point (6 mesi), rendendo impossibile una analisi statistica significativa.

Un paziente ha dovuto sospendere il trattamento per un rialzo degli indici di citolisi epatica (AST/ALT fino a 3x) in assenza di sintomatologia clinica.

6. Discussione

Il miglioramento della *long-term graft survival* rappresenta attualmente uno degli obiettivi principali della comunità scientifica trapiantologica ed appare quindi chiaro come, nel perseguimento di tale obiettivo, trovare un trattamento efficace del rigetto umorale cronico-attivo (cAMR) rappresenti un punto chiave.

I trattamenti del cAMR oggetto di studio in letteratura sono basati sulla sua fisiopatologia, che riconosce un ruolo primario degli anticorpi, dei linfociti B e delle plasmacellule; pertanto i trattamenti proposti si basano sulla deplezione di tali elementi: IVIg, rituximab and/or plasma exchange (6 - 10). Tali trattamenti si sono dimostrati efficaci nel trattamento del rigetto umorale acuto, mentre i risultati nel cAMR sono stati deludenti (11), oltre che gravati da un significativo tasso di complicanze legate all'elevato potenziale immunosoppressivo.

Il TCZ ha fornito invece risultati incoraggianti in termini di efficacia e ottimi dal punto di vista della tolleranza e della safety (16; 17; 20). Tuttavia i dati presenti in letteratura sono relativi a pochi case series (16;17;23) ed 1 trial randomizzato controllato (20) con numeri di pazienti relativamente bassi.

Nella maggior parte delle esperienze pubblicate in letteratura, il TCZ è stato utilizzato nel cAMR come rescue-therapy dopo l'utilizzo di schemi terapeutici più consolidati come rituximab e plasmaferesi (16;23), ponendo il sospetto che i risultati ottenuti fossero più l'esito della somma dei trattamenti effettuati che non del TCZ in sé. Lo studio del gruppo di Torino (17) ha invece confermato i risultati degli studi precedenti utilizzando il TCZ come trattamento di prima linea. Lo studio di Chandran et al. ha invece valutato l'efficacia del TCZ somministrato a pazienti nei quali fosse stata riscontrata un'inflammatione del microcircolo nelle biopsie di protocollo durante il primo anno di trapianto, ottenendo un miglioramento sia dal punto di vista istologico che bio-umorale (diminuzione citochine pro-infiammatorie e sviluppo di sottopopolazioni linfocitarie di tolleranza) (20).

Abbiamo quindi voluto valutare nella nostra casistica l'efficacia del TCZ utilizzato come trattamento di prima linea del cAMR, sia analizzando in maniera retrospettiva i pazienti già trattati con la formulazione EV che, in maniera prospettica, i pazienti con nuova diagnosi trattati con formulazione SC.

Analizzando la componente retrospettiva del nostro studio, una delle caratteristiche più significative della nostra casistica è rappresentata

dall'elevata età trapiantologica, circa 15 anni. Si tratta di un dato oltre la sopravvivenza media dell'organo che viene attualmente riportata in letteratura per il trapianto di rene singolo da donatore cadavere per morte cerebrale, pari a circa 11.7 anni (22). Tale caratteristica è verosimilmente da ricondurre alla giovane età dei pazienti al momento del trapianto ed alle conseguenti caratteristiche dei donatori; possiamo infatti osservare una prevalenza di donatori marginali nettamente inferiore a quella abituale (8.5% vs circa 60%).

Non è stato purtroppo possibile determinare l'epoca di comparsa dei DSA, in quanto non erano oggetto di sistematico monitoraggio.

Per quanto riguarda l'efficacia del TCZ sottocute abbiamo ottenuto risultati comparabili a quelli presentati da Choi et al. e Lavacca et al. in termini di funzionalità dell'organo e di reperti urinari, mentre sono discordanti i rilievi concernenti l'andamento dei DSA durante il trattamento.

Più in dettaglio possiamo osservare come, nei 24 mesi dello studio, si sia assistito ad un tasso di graft-loss nettamente inferiore a quello riportato in letteratura nei pazienti con cAMR ed elevato grado istologico di cronicità (30% vs 80%) (24), seppur lievemente più alto da quello riportato da Choi et al. (11.1%).

La riduzione dell'eGFR è stata pari a 3 ml/min/anno, consistente a quanto riportato nello studio di Lavacca et al. (4.4 ml/min/anno) ed inferiore a quanto evidenziato nei pazienti non trattati (24).

E' inoltre interessante evidenziare come, dividendo la nostra popolazione in 2 gruppi in base alla funzione renale a T0, lo slope dell'eGFR sia sovrapponibile tra chi partiva con una buona funzione e chi aveva già una significativa alterazione al momento della diagnosi. Questo conferma i dati di Lavacca et al. sull'efficacia del TCZ anche nel trattamento dei pazienti con danno cronico avanzato.

Dal punto di vista della proteinuria il dato non ha mostrato una significativa variazione, mantenendosi su un UACR di circa 1000 mg/g a tutti i time-point.

I nostri risultati non sono invece concordanti con quanto presente in letteratura per quanto concerne l'andamento del titolo dei DSA: nella nostra casistica il valore di MFI non ha subito variazioni statisticamente significative nei 24 mesi di osservazione, sia per quanto riguarda gli anticorpi di Classe I che di Classe II.

Da un punto di vista istologico, le caratteristiche della nostra popolazione al baseline sono sostanzialmente sovrapponibili a quelle di Choi et al., con segni di cronicità moderati con un IFTA media di 1.7 ed una *Transplant Glomerulopathy* media di 1.6; dati più favorevoli rispetto a quelli della casistica di Lavacca et al., pari a 2.47. E' importante però ricordare in tal senso l'età trapiantologica nettamente più elevata dei nostri pazienti.

Le biopsie di controllo effettuate a 12 mesi, seppur non sul campione completo dei pazienti arruolati, hanno mostrato in maniera indiscutibile l'efficacia del TCZ nel ridurre la componente attiva del cAMR: nel 100% nei pazienti si è assistito alla scomparsa dei segni di danno tissutale acuto e di interazione dell'anticorpo con l'endotelio. Mentre si è osservata una stabilizzazione del danno cronico (IFTA e TG). Queste rilevazioni sono sovrapponibili a quanto già riportato in letteratura.

Questo studio, pur fornendo risultati molto interessanti, presenta delle significative limitazioni, rappresentate principalmente dalla natura retrospettiva delle analisi e dal campione limitato di pazienti arruolati. Al fine di ovviare a queste limitazioni abbiamo disegnato uno studio prospettico per valutare l'efficacia del TCZ nel cAMR, questa volta nella formulazione sottocutanea (che ha mostrato efficacia e tollerabilità assolutamente sovrapponibili alla formulazione endovenosa) (18; 19). Tale studio prevede l'arruolamento di 30 pazienti ed il disegno prospettico permette di effettuare analisi molto più raffinate ed approfondite dal punto di vista bioumorale e immunologico (sottopopolazioni linfocitarie, marcatori di danno renale, ...). Purtroppo la pandemia Covid 19 in atto ha portato a significativi ritardi nell'arruolamento, principalmente legate all'impossibilità di ricoverare i pazienti per la biopsia renale diagnostica; per questa ragione, al momento della stesura di questa tesi, sono stati arruolati 10 pazienti sui 30 previsti, dei quali solo 2 hanno raggiunto il primo time-point previsto dallo studio (6 mesi). Risulta quindi impossibile proporre risultati anche parziali di questo studio, poiché privi di significato statistico.

7. Conclusioni

La componente retrospettiva del presente studio ha confermato i dati già presenti in letteratura, dimostrando l'efficacia del TCZ somministrato per via endovenosa nel trattamento del cAMR nei pazienti portatori di trapianto di rene. In particolare il farmaco si è dimostrato efficace nella stabilizzazione dei valori di eGFR e nello spegnimento della componente attiva del rigetto, pur non assistendo ad una riduzione di intensità degli anticorpi donatore-specifici.

E' in corso uno studio prospettico con il fine di consolidare tali riscontri e di confermare la sovrapponibilità nell'efficacia della formulazione sottocutanea a quella endovenosa del TCZ.

8. Bibliografia

1. Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL et al. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N Engl J Med* 1999; 341: 1725–1730
2. J.D. Pirsch, J. Miller, M.H. Deierhoj, et al., A comparison of tacrolimus (FK506) and cyclosporine for immunosuppression after cadaveric renal transplantation. FK506 kidney transplant study group, *Transplant*. 63 (1997) 977–983.
3. R.M. Merion, D.J. White, S. Thiru, et al., Cyclosporine: five years' experience in cadaveric renal transplantation, *N. Engl. J. Med.* 310 (1984) 148–154.
4. Loupy A, Hill GS, Jordan SC. The impact of donor-specific anti-HLA antibodies on late kidney allograft failure. *Nat Rev Nephrol*. 2012;8(6):348-357.
5. Haas M, Sis B, Racusen LC, Solez K, Glotz D, Colvin RB, et al. Banff 2013 meeting report: inclusion of c4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transplant Surg*. 2014;14(2):272–83.
6. Jordan SC, Tyan D, Stablein D, et al. Evaluation of intravenous immunoglobulin as an agent to lower allosensitization and improve transplantation in highly sensitized adult patients with end-stage renal disease: Report of the NIH IG02 trial. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 3256–3262.
7. Marfo K, Lu A, Ling M, Akalin E. Desensitization protocols and their outcome. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011; 6: 922–936.
8. Montgomery RA, Lonze BE, King KE, et al. Desensitization in HLA-incompatible kidney recipients and survival. *N Engl J Med* 2011; 365: 318–326.
9. Vo AA, Lukovsky M, Toyoda M, et al. Rituximab and intravenous immune globulin for desensitization during renal transplantation. *N Engl J Med* 2008; 359: 242–251.

10. Vo AA, Petrozzino J, Yeung K, et al. Efficacy, outcomes, and cost-effectiveness of desensitization using IVIg and rituximab. *Transplantation* 2013; 95: 852–858.
11. Moreso F, Crespo M, Ruiz JC, et al. Treatment of chronic antibody mediated rejection with intravenous immunoglobulins and rituximab: A multicenter, prospective, randomized, double-blind clinical trial. *Am J Transplant*. 2018;18(4):927-935
12. Gloor J, Cosio F, Lager DJ, Stegall MD. The spectrum of antibody-mediated renal allograft injury: Implications for treatment. *Am J Transplant* 2008; 8: 1367–1373.
13. Tanaka T, Kishimoto T. The biology and medical implications of interleukin-6. *Cancer Immunol Res* 2014; 2: 288–294.
14. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2014; 6: a016295
15. Kim I, Wu G, Chai NN, Klein AS, Jordan S. Anti-interleukin 6 receptor antibodies attenuate antibody recall responses in a mouse model of allosensitization. *Transplantation* 2014; 98: 1262–1270.
16. Choi J, Aubert O, Vo A, et al. Assessment of tocilizumab (anti-interleukin-6 receptor monoclonal) as a potential treatment for chronic antibody-mediated rejection and transplant glomerulopathy in hla-sensitized renal allograft recipients. *Am J Transplant*. 2017;17(9):2381-2389
17. Lavacca A, Presta R, Gai C, et al. Early effects of first-line treatment with anti-interleukin-6 receptor antibody tocilizumab for chronic active antibody-mediated rejection in kidney transplantation. *Clin Transplant*. 2020;34:e13908.
18. Burmester GR, Rubbert-Roth A, Cantagrel A, et al. *Ann Rheum Dis* 2016;75:68–74
19. Lauper K, Mongin D, Iannone F, et al. comparative effectiveness of subcutaneous tocilizumab versus intravenous tocilizumab in a pan-european collaboration of registries. *RMD Open* 2018;4:e000809. doi:10.1136/rmdopen-2018-000809
20. Chandran S, Leung J, Hu C, Laszik ZG, Tang Q, Vincenti FG.

Interleukin-6 blockade with tocilizumab increases Tregs and reduces T effector cytokines in renal graft inflammation: A randomized controlled trial. Am J Transplant. 2021;00:1–12. <https://doi.org/10.1111/ajt.16459>

21. Haas M, Loupy A, Lefaucheur C, et al. *The Banff 2017 Kidney Meeting Report: Revised diagnostic criteria for chronic active T cell-mediated rejection, antibody-mediated rejection, and prospects for integrative endpoints for next-generation clinical trials. Am J Transplant. 2018;18(2):293-307*
22. Poggio ED, Augustine JJ, Arrigain S, Brennan DC, Schold JD. *Long-term kidney transplant graft survival-Making progress when most needed. Am J Transplant. 2021 Aug;21(8):2824-2832. doi: 10.1111/ajt.16463. Epub 2021 Feb 8. PMID: 33346917*
23. Shin B-H, Everly MJ, Zhang H, et al. *Impact of tocilizumab (Anti- IL-6R) treatment on immunoglobulins and anti-hla antibodies in kidney transplant patients with chronic antibody-mediated rejection. Transplantation. 2020;104(4):856–863.*
24. Redfield RR, de Ellis TM, Zhong W, et al. *Current outcomes of chronic active antibody mediated rejection - A large single center retrospective review using the updated BANFF 2013 criteria. Hum Immunol. 2016;77(4):346-352.*

9. Abstract

Kidney transplant is the gold standard treatment for end-stage renal disease (ESRD), offering better outcome both in terms of quality and expectation of life. In the last decades significant improvements has been reached in short term graft survival, conversely long-term graft survival is still an open challenge for the scientific community. One of the major causes of long term graft loss is represented by chronic-active antibody mediated rejection (cAMR), a recently identified entity whose diagnosis is based on laboratoristic and histologic elements: the presence of DSA associated to specific morphological lesions as inflammation and microvascular damage associated or not to C4d deposition. Treatment of cAMR is an open field of debate. Tocilizumab, an anti-IL6 monoclonal antibody has been recently proposed as a first line treatment for cAMR, showing encouraging results.

We describe our monocentric experience using Tocilizumab as first-line therapy for cAMR.

Graft function (eGFR), proteinuria and DSA have been evaluated every 6 month for 24 months; histology have been performed after 12 months of treatment.

No adverse events have been observed during study period.

12 patients completed the study with a follow-up of 24 months. Kidney function showed a worsening during follow-up that reaches statistical significance at 12 and 24 months (eGFR from 32.2 ± 13.9 ml/min to 26.9 ± 13 ml/min), but far less than expected for these kind of patients. 4 patients (30%) reached ESRD during follow-up, 3 requiring renal replacement therapy.

We did not observed any statically significant variation in proteinuria and in DSA MFI levels.

From a histological point of view, we observed a significant improvement in active cAMR lesions (C4d deposition and Acute tissue injury (MTA, $g > 0$ /ptc > 0 , $v > 0$) and no progression among chronic lesions (Transplant glomerulopathy, PTC multilayering and arterial intimal fibrosis)

Tocilizumab shown good results, with a stabilization of graft function, a reduction in kidney inflammation and active lesions in kidney biopsy and not allowing progression of chronic lesions.