

Immunosoppressivi alternativi ai CNI: Schemi terapeutici e tossicità

Articoli originali

Gianluigi Zaza

Unità di Nefrologia, Dipartimento di Medicina, Università degli Studi di Verona.



Gianluigi Zaza

Corrispondenza a:

Gianluigi Zaza

Unità di Nefrologia, Dipartimento di Medicina, Università degli Studi di Verona.

Piazzale Aritide Stefani 1, 37126, Verona.

Tel: 045 8122521, Fax:045 8027311

e-mail: gianluigi.zaza@univr.it

ABSTRACT

In un'ottica di preservazione del danno acuto e cronico del graft, negli ultimi anni sta emergendo una nuova filosofia terapeutica per i pazienti affetti da trapianto renale che contempli l'utilizzo combinato di tutti i farmaci immunosoppressivi disponibili in commercio e la minimizzazione/sospensione degli inibitori della calcineurina. Lo scopo di questa nuova visione (immunosoppressione sostenibile) è quello di contrastare lo sviluppo di comorbidità ed evitare un drammatico impatto negativo sulla sopravvivenza dei pazienti nefro-trapiantati. L'utilizzo degli inibitori di mTOR e di nuovi agenti biologici (come Belatacept e il nuovissimo Iscalimab) potrebbe aiutarci a raggiungere questo obiettivo e superare il classico approccio alle cure "organo-centrico" verso quello "paziente-centrico".

Introduzione

Negli ultimi anni, l'aggiornamento degli schemi immunosoppressivi e la concomitante ottimizzazione delle procedure chirurgiche e di preservazione dell'organo da trapiantare hanno significativamente ridotto l'incidenza delle problematiche cliniche dell'immediato post-trapianto (incluso il danno da ritardata ripresa funzionale e il rigetto acuto), ma hanno inciso poco nella minimizzazione/rallentamento della evoluzione del danno cronico e sulla sopravvivenza a lungo termine del graft. Al momento, infatti, circa il 40-50% dei reni trapiantati sono persi dopo 10-15 anni dal trapianto [1].

E' emerso, poi, un nuovo concetto di cronicità d'organo. Anche le aree di fibrosi, un tempo considerate semplici e "passive aree di cicatrizzazione parenchimale", hanno assunto un ruolo fisiopatogenetico più importante ed è stato rivalutato il ruolo e l'impatto sulla sopravvivenza dell'organo dell'infiltrato immuno-infiammatorio localizzato specificatamente in queste aree.

Tutto questo si accompagna alle già consolidate evidenze circa la relazione tra insorgenza di rigetto cronico anticorpo mediato (CAMR) e perdita precoce del graft [2].

In aggiunta, la letteratura internazionale continua a sottolineare l'importanza della corretta gestione delle tante comorbidità associate al trapianto (cardiologiche, infettivologiche, oncologiche) che incidono drammaticamente sulla qualità della vita dei pazienti. Basti pensare alle innumerevoli visite ambulatoriali e controlli strumentali a cui sono sottoposti dopo la diagnosi di tali condizioni [3,4].

Pertanto, la nuova filosofia immunosoppressiva, non più propensa a facili minimizzazioni, deve prendere in considerazione tutte queste osservazioni e pensare ad una gestione farmacologica sempre più personalizzata che contempi, anche, protocolli immunosoppressivi privi degli inibitori della calcineurina (CNI).

In quest'ottica, in una serie di protocolli immunosoppressori, è stato recentemente proposto l'uso degli inibitori di mTOR (mTOR-I) in associazione ai CNI (a basso dosaggio). Questa combinazione terapeutica è efficace nell'indurre un adeguato grado di immunosoppressione accanto ad una minore nefrotossicità [5,6].

Inibitori di mtor: un valido ausilio terapeutico per la minimizzazione/sospensione del trattamento con CNI

Caratteristiche biologiche e farmacologiche degli mTOR-I

L'azione farmacologica del sirolimus (SRL) e dell'everolimus (EVE) si esplica principalmente attraverso l'inibizione del mammalian target of rapamycin (mTOR), una protein-chinasi citoplasmatica che regola la crescita, la proliferazione, la motilità e la sopravvivenza delle cellule, la sintesi proteica e la trascrizione [7] con effetti considerevoli sulla risposta immunitaria, sui processi di rigenerazione muscolare e neuronale, e sulla crescita tumorale [8-10].

Strutturalmente, mTOR contiene 20 sequenze HEAT (necessarie per l'interazione con altre proteine) nella porzione ammino-terminale e il dominio chinasi e quello di legame del complesso FKBP-rapamicina (FRB) nella porzione carbossi-terminale. Insieme ad altre proteine, è parte integrante di 2 complessi intracitoplasmatici distinti: mTORC1 e mTORC2 [11].

mTORC1 è costituito da mTOR, mammalian lethal with Sec13 protein 8 (mLST8), proline-rich Akt substrate of 40 kDa (PRAS40) e da una proteina regolatoria chiamata regulatory-associated protein of mTOR (RAPTOR). I substrati di mTORC1 sono S6 chinasi (S6K) e eukaryotic translational initiation factor 4E (eIF4E)-binding protein 1 (4EBP1). mTORC1 attiva S6K e inibisce 4EBP1 per promuovere la

traduzione e la crescita cellulare. Questo complesso è sensibile alla inibizione da parte della rapamicina, la quale si lega alla immunofillina FKBP12 e il complesso FKBP12-rapamicina si lega, a sua volta, al dominio FRB su mTOR. Poiché questo dominio è situato in prossimità del sito catalitico, il complesso FKBP12-rapamicina inibisce allostericamente l'attività chinasi di mTORC1.

mTORC2, invece, è un complesso costituito da mTOR, mLST8, proline-rich protein 5 (PRR5), mitogen-activated protein kinase-associated protein 1 (SIN1) e rapamycin-insensitive companion of mTOR (RICTOR). La sua sensibilità alla rapamicina è influenzata dalla cronica esposizione al farmaco e dal livello di espressione di diverse forme di FKBP [12].

Questi due complessi regolano risposte cellulari diverse. mTORC1 attiva la sintesi proteica, la biogenesi dei ribosomi, il trasporto dei nutrienti, la sintesi lipidica e altri processi in risposta a nutrienti, fattori di crescita e disponibilità energetica della cellula. mTORC2 regola l'organizzazione del citoscheletro [13] e ha una notevole importanza nella biologia dei tumori, in quanto è implicato nella motilità e invasività delle cellule tumorali e nello sviluppo di metastasi tumorali [14]. Inoltre, mTORC2 attiva diverse chinasi della famiglia delle AGC chinasi, tra le quali AKT [15], serum/glucocorticoid-regulated kinase 1 (SGK1) [16] e varie protein chinasi C (PKC) [17]. AKT è una importante oncoproteina che induce programmi anti-apoptotici per la sopravvivenza cellulare; SGK1 regola il metabolismo energetico e dipendente dal segnale insulinico.

La regolazione di mTOR è complessa e avviene attraverso una serie di feedback loop e sfruttando molteplici sistemi di regolazione intracellulare basati sulla fosforilazione/defosforilazione proteica [19]. Questo fine processo di regolazione mantiene attive le diverse funzioni dei complessi mTORC1 e mTORC2 e permette il mantenimento di un corretto bilancio tra crescita e divisione cellulare.

mTOR è, poi, coinvolto nella transizione epitelio-mesenchimale (EMT) [20], un processo attraverso il quale le cellule epiteliali del tubulo renale, se adeguatamente stimolate, iperesprimono una serie di marker mesenchimali (come la vimentina, la fibronectina e l'actina muscolare liscia- α) [21] e, acquisendo un fenotipo fibroblastico o miofibroblastico, sono in grado di migrare nell'interstizio dove svolgono un ruolo chiave nel processo patogenetico che porta al danno renale cronico [22].

Utilizzo degli mTOR-I nella pratica clinica

Numerosi studi clinici randomizzati hanno valutato gli effetti della conversione dal trattamento con CNI a quello con mTOR-I nel post-trapianto [23-26]. Watson e coll., hanno dimostrato che in pazienti portatori di trapianto renale con funzione renale non ottimale, la conversione dal CNI al SRL era associata ad un significativo miglioramento della velocità di filtrazione glomerulare (GFR) a 3 e 12 mesi dopo la conversione farmacologica [27].

Altri autori hanno osservato che nei riceventi affetti da nefropatia cronica del trapianto, la conversione da CNI a SRL comportava un miglioramento della sopravvivenza del trapianto [28]. Le biopsie eseguite 2 anni post-conversione rivelavano lesioni croniche più lievi e una minore espressione intra-parenchimale di actina muscolare liscia- α che suggeriva un effetto protettivo anti-fibrotico degli mTOR-I [28]. In aggiunta, i risultati del trial CONVERT hanno mostrato che questa conversione farmacologica era particolarmente efficace nei pazienti con GFR \geq 40 ml/min e rapporto urinario proteine/creatinina \geq 0.1179 [23]. Comunque, nonostante questi incoraggianti risultati, lo studio CONCEPT, pubblicato nello stesso anno, mostrava una maggiore incidenza di rigetti acuti nei pazienti convertiti al SRL [25]. Questa condizione è stata confermata da studi successivi [29,30].

In aggiunta, è da sottolineare che, la terapia di mantenimento con gli mTOR-I è associata ad una ridotta incidenza di tumori post-trapianto rispetto alle altre terapie immunosoppressive [31,32] rappresentando uno strumento utile nella minimizzazione delle comorbidità neoplastiche nei

pazienti nefro-trapiantati. E' noto, infatti, che questi pazienti presentano un rischio di sviluppare una neoplasia da 3 a 5 volte maggiore rispetto alla popolazione generale e che questa complicanza rappresenta la prima causa di morbidità/mortalità post-trapianto [33,34].

Inoltre, è largamente descritto che, rispetto ai CNI, l'utilizzo di SRL o EVE determina un minor rischio di insorgenza di infezioni virali (principalmente citomegalovirus e BK virus) [35-37] poiché inibiscono la sintesi proteica e le vie metaboliche utilizzate da questi virus per replicarsi nelle cellule ospiti [38-40].

Diversi studi hanno anche dimostrato che questa categoria farmacologica, se somministrata correttamente, svolgendo un effetto anti-ipertensivo ed antagonizzando i meccanismi fisiopatologici responsabili dell'ipertrofia ventricolare sinistra, è in grado di svolgere significativi effetti cardioprotettivi [41,42].

Eventi avversi degli mTOR-I

Sebbene l'uso di questa categoria farmacologica abbia dimostrato analoghe potenzialità immunosoppressive rispetto alla standard care (MPA+CNI+steroidi) [37], il suo impiego clinico è ancora limitato da alcune esperienze cliniche che evidenziano una maggiore insorgenza di effetti avversi, spesso associati alle alte dosi [43,44].

Le più frequenti reazioni avverse indotte dagli mTOR-I sono:

Tossicità renale: E' stato osservato che gli mTOR-I sono in grado di incrementare la nefrotossicità da CNI nell'immediato post-trapianto aggravando il danno da ischemia-riperfusion e ritardando la risposta adattativa/riparativa parenchimale al danno post-ischemico [45]. Inoltre, come dimostrato da Stallone e coll., [46], possono causare una desertificazione dose-correlata di alcuni elementi strutturali chiave dello slit diaphragm della barriera di filtrazione glomerulare (come nefrina, podocina) con genesi di proteinuria [47]. In aggiunta, soprattutto se somministrati in associazione con i CNI, possono attivare la cascata coagulativa e l'aggregazione piastrinica nel graft con sviluppo di microangiopatia trombotica [48].

Tossicità ematologica: Sono state descritte neutropenia e trombocitopenia da soppressione midollare (con una frequenza, rispettivamente, di circa il 20% e il 40% dei pazienti trattati). Tale effetto mielosoppressivo è più evidente se tali farmaci sono associati a citostatici come Micofenolato Mofetile (MMF) e acido micofenolico [49]. Inoltre, è stata riportata anemia microcitica nel 30-40% dei pazienti trattati con EVE. Il meccanismo sembra essere legato all'effetto antiproliferativo sulle cellule progenitrici del midollo osseo e ad un diretto effetto sull'omeostasi del ferro. In aggiunta, sembra esserci una forte correlazione tra lo stato di infiammazione cronica e l'anemia correlata agli mTOR-I [50].

Tossicità muco-cutanea: L'incidenza di eruzioni acneiformi e follicoliti nei pazienti con trapianto renale in trattamento con mTOR-I varia dal 13 al 46% [51-53]. Tali effetti avversi sembrano maggiormente prevalenti nel sesso maschile. In una percentuale estremamente variabile (dal 3 al 68%) sono stati descritti esantemi transitori [53]. Inoltre, in pazienti trattati cronicamente con questa categoria di farmaci è stata descritta una dermatite esfoliativa dose-indipendente che richiede l'interruzione rapida del trattamento [54]. Dal 30% al 60% dei pazienti trattati con alte dosi di mTOR-I, utilizzati da soli o in associazione con citostatici, è stata riportata l'insorgenza di stomatite aftosa della durata di qualche settimana. Tali effetti possono essere modulati attraverso la modifica dello schema terapeutico o con l'utilizzo di terapia steroidea topica. Raramente sono state descritte vasculiti leucocitoclastiche SRL-associate.

Disordini metabolici: Sono di comune riscontro in corso di terapia con mTOR-I un lieve innalzamento della glicemia ed un'alterazione dell'assetto lipidico ematico [6]. In particolare la dislipidemia, ampiamente associata all'utilizzo di mTOR-I, costituisce il maggior fattore di rischio per eventi cardiovascolari post-trapianto [55,56]. In una percentuale variabile tra il 40 e il 75% dei pazienti trattati con questa categoria farmacologica si registra un aumento delle lipoproteine ad alta densità (HDL), lipoproteine a bassa densità (LDL), colesterolo e trigliceridi [57,58]. Morrisett e coll. hanno registrato l'aumento dei livelli di colesterolo e trigliceridi dopo 2-4 settimane dall'inizio della terapia e un ritorno ai livelli di normalità entro 8 settimane dall'interruzione del trattamento [59]. Gli inibitori della 3-idrossi-3-metilglutaril Coenzima A (HMG-CoA) reductasi (statine) da sole o in combinazione con un farmaco di seconda linea resta la principale opzione terapeutica per l'iperlipidemia indotta dal trattamento con mTOR-I [60].

Infertilità: L'utilizzo di mTOR-I è stato associato allo sviluppo di infertilità e sterilità primariamente dovuta al loro effetto antiproliferativo. Inoltre, nei pazienti trattati con SRL sono stati rilevati ridotti livelli di testosterone e un aumento degli ormoni gonadotropici (FSH e LH) [61-63].

Ritardata guarigione delle ferite: Nei pazienti trattati con mTOR-I è stata riscontrata una ridotta attività dei fibroblasti e un'alterazione nelle concentrazioni ed efficacia di alcune citochine [64], meccanismi che potrebbero spiegare una ritardata guarigione delle lesioni in questi pazienti [65,66]. Tali fenomeni sono dipendenti dall'interferenza che gli mTOR-I hanno su molteplici vie di trasduzione del segnale.

Tossicità polmonare: Si tratta di una frequente reazione avversa che si manifesta con una incidenza compresa tra il 5 e l'11%, con un esordio dei sintomi tra 1 e 51 mesi dopo l'inizio della terapia [67-70]. Tale condizione ha manifestazioni cliniche eterogenee e la diagnosi all'esordio può risultare difficile a causa della non specificità dei segni e sintomi iniziali. Il paziente, infatti, può presentare febbre, affaticabilità, tosse e dispnea. Dal punto di vista istologico sono state descritte varie forme di danno polmonare, tra cui la pneumopatia interstiziale linfocitaria, l'alveolite linfocitaria, la bronchiolite obliterante in corso di pneumopatia organizzativa e la fibrosi polmonare focale [71,72]. Queste tre entità possono sovrapporsi e presentarsi simultaneamente. Sono stati, inoltre, riportati episodi di emorragia alveolare diffusa in seguito all'utilizzo di questi farmaci [73,74]. Generalmente, la biopsia polmonare è in grado di discriminare i vari aspetti istologici tipici come granulomi epitelioidi intralveolari non necrotizzanti, infiltrazione linfocitica dell'interstizio ed un pattern focale di polmonite organizzata [75]. Il meccanismo patogenetico della tossicità polmonare associata all'utilizzo di mTOR-I non è ancora stato pienamente compreso. È stata suggerita sia una tossicità diretta, dose dipendente, che una tossicità secondaria ad una risposta autoimmunitaria o ad una reazione da ipersensibilità di tipo ritardato scatenata dall'esposizione agli mTOR-I in presenza o meno di antigeni polmonari criptici [68,76]. Infine, alte dosi di mTOR-I inducono EMT delle cellule epiteliali bronchiali verso un fenotipo simil-fibroblastico [77,78]. Il trattamento di queste affezioni polmonari è complesso e richiede un approccio multidisciplinare (pneumologi, infettivologi, nefrologi). Generalmente questo tipo di pneumopatia regredisce dopo la sospensione o riduzione del farmaco.

Nuovi agenti terapeutici

Negli ultimi anni sono stati introdotti nuovi farmaci immunosoppressori tra cui sembrano essere promettenti quelli che agiscono sulle molecole di costimolazione.

In particolare, la ricerca clinica trapiantologica si è soffermata sul ruolo del belatacept, una proteina di fusione solubile ricombinante costituita dall'associazione della porzione extra-cellulare della molecola recettoriale CTLA-4 con la componente Fc di una IgG1 modificata in modo tale da non

fissare il complemento. Questo farmaco agisce bloccando la costimolazione del segnale necessaria per completare l'attivazione antigene-specifica del linfocita T naive [79].

Il belatacept ha mostrato, in una serie di trial clinici (in particolare, BENEFIT, BENEFIT-EXT) [80,81], un miglior impatto sul graft e sul profilo cardiovascolare (pressione arteriosa, diabete e dislipidemia) rispetto alla standard care con i CNI. Si evidenziava, però, una maggiore incidenza di rigetti acuti che hanno richiesto adeguato trattamento e una maggiore incidenza di PTLD nel primo anno dopo il trapianto, soprattutto in riceventi Epstein-Barr virus (EBV) neg e/o trattati con timoglobuline (ATG) [79]. Lo stato sieronegativo di EBV era il più forte fattore di rischio associato alla PTLD (aumento di nove volte del rischio). Pertanto, la Food and Drug Administration (FDA) aveva rapidamente emanato un warning contro l'uso del belatacept nei pazienti sieronegativi per l'EBV (controindicato) e sottolineava che, nei primi anni, questo farmaco può aumentare il rischio di malattie infettive tra cui la TBC e il CMV. Inoltre, vari studi avevano osservato un rischio maggiore di trombosi del graft. Tuttavia, nel follow-up di sette anni, era stato osservato solo un caso di PTLD dopo i primi 24 mesi di terapia nel gruppo Belatacept [80].

Pertanto, in USA, dopo i risultati del BENEFIT, il belatacept è stato utilizzato (e raccomandato) solo nei pazienti trapiantati a basso rischio immunologico (e non come prima scelta) [81].

A mio avviso, il belatacept dovrebbe essere introdotto nei pazienti a rischio basso/standard con sierologia EBV positiva attivando, se possibile, un programma di valutazione bioptica protocollare e con una attenta misurazione dei livelli di anticorpi anti-HLA donatore-specifici (DSA) e un adeguato follow-up laboratoristico-strumentale atto a misurare il rischio infettivologico.

Un'altra novità della terapia immunosoppressiva è l'iscalimab (CFZ533-Novartis), un nuovo anticorpo monoclonale completamente umano che si lega con altissima affinità al CD40 e impedisce il signaling/attivazione della pathway (CD40-CD40L) attivata da questa proteina di costimolazione espressa sulle cellule presentanti l'antigene con conseguente impatto sull'immunità innata (e successivamente su quella adattativa) [82,83].

Sia su modelli animali sia in pazienti portatori di trapianto renale, l'iscalimab ha mostrato importanti effetti positivi sulla funzione renale e una inibizione dello sviluppo della nefropatia cronica del trapianto e il profilo degli eventi avversi (sicurezza) dei pazienti in trattamento con iscalimab era simile a quello del gruppo di pazienti trattati con TAC+MMF [84,85].

Inoltre, l'iscalimab, come il belatacept, essendo somministrato in vena, rappresenta una importante arma contro la mancanza di aderenza terapeutica.

In futuro potrebbero essere disponibili nuovi agenti immunosoppressori (tra cui IdeS, Alefacept, Efalizumab) altamente efficaci nel prevenire il danno acuto immuno-mediato e lo sviluppo di alterazioni croniche indotte dalla infiammazione tissutale.

Conclusione

Al momento, vista la carenza di ricerca farmacologica e di trial clinici (soprattutto in Italia), non possiamo ritenere superata l'era CNI [86] nel trapianto renale, ma appare chiara la necessità, in un'ottica terapeutica moderna e paziente-centrica, di ridurre le dosi per minimizzare il rischio di tossicità e sviluppo di comorbidità. Per ottenere questo obiettivo è opportuno combinare questi farmaci con gli altri agenti terapeutici presenti in commercio (primi fra tutti gli mTOR-I).

BIBLIOGRAFIA

1. Caletti C, Manuel Ferraro P, Corvo A, Tessari G, Sandrini S, Capelli I, Minetti E, Gesualdo L, Girolomoni G, Boschiero L, Lupo A, Zaza G. Impact of 3 Major Maintenance Immunosuppressive Protocols on Long-term Clinical Outcomes: Result of a Large Multicenter Italian Cohort Study Including 5635 Renal Transplant Recipients. *Transplant Proc.* 2019 Jan-Feb;51(1):136-139.
2. Mannon RB, Matas AJ, Grande J, Leduc R, Connett J, Kasiske B, Cecka JM, Gaston RS, Cosio F, Gourishankar S, Halloran PF, Hunsicker L, Rush D; DeKAF Investigators. Inflammation in areas of tubular atrophy in kidney allograft biopsies: a potent predictor of allograft failure. *Am J Transplant.* 2010 Sep;10(9):2066-73
3. Vleut R, Abramowicz D, Hellemans R. Frailty: a new comorbidity in kidney transplant candidates? *Nephrol Dial Transplant.* 2020 Jul 1;35(7):1085-1087.
4. Wu C, Evans I, Joseph R, Shapiro R, Tan H, Basu A, Smetanka C, Khan A, McCauley J, Unruh M. Comorbid conditions in kidney transplantation: association with graft and patient survival. *J Am Soc Nephrol.* 2005 Nov;16(11):3437-44.
5. Zaza G, Granata S, Tomei P, Masola V, Gambaro G, Lupo A. mTOR inhibitors and renal allograft: Yin and Yang. *J Nephrol.* 2014 Oct;27(5):495-506
6. Zaza G, Tomei P, Ria P, Granata S, Boschiero L, Lupo A. Systemic and nonrenal adverse effects occurring in renal transplant patients treated with mTOR inhibitors. *Clin Dev Immunol.* 2013;2013:403280.
7. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci.* 2009;122(Pt 20):3589-94
8. Chapman JR, Valantine H, Albanell J, Arns WA, Campistol JM, Eisen H, Frigerio M, Lehmkuhl H, Marcen R, Morris R, Nashan B, Pascual J, Pohanka E, Segovia J, Zuckermann A. Proliferation signal inhibitors in transplantation: questions at the cutting edge of everolimus therapy. *Transplant Proceedings* 2007; 39:2937-2950.
9. Granata S, Dalla Gassa A, Carraro A, Brunelli M, Stallone G, Lupo A, Zaza G. Sirolimus and Everolimus Pathway: Reviewing Candidate Genes Influencing Their Intracellular Effects. *Int J Mol Sci.* 2016 May 14;17(5):735
10. Zaza G, Granata S, Caletti C, Signorini L, Stallone G, Lupo A. mTOR Inhibition Role in Cellular Mechanisms. *Transplantation.* 2018 Feb;102(2S Suppl 1):S3-S16.
11. Benjamin D, Colombi M, Moroni C, Hall MN. Rapamycin passes the torch: a new generation of mTOR inhibitors. *Nat Rev Drug Discov.* 2011;10(11):868-80
12. Schreiber KH, Ortiz D, Academia EC, Anies AC, Liao CY, Kennedy BK. Rapamycin-mediated mTORC2 inhibition is determined by the relative expression of FK506-binding proteins. *Aging Cell.* 2015;14(2):265-73
13. Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, Ruegg MA, Hall A, Hall MN. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol.* 2004;6(11):1122-8.
14. Zhou H, Huang S. Role of mTOR signaling in tumor cell motility, invasion and metastasis. *Curr Protein Pept Sci.* 2011;12(1):30-42
15. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science.* 2005 Feb 18;307(5712):1098-101.
16. García-Martínez JM, Alessi DR. mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1). *Biochem J.* 2008;416(3):375-85.
17. Ikenoue T, Inoki K, Yang Q, Zhou X, Guan KL. Essential function of TORC2 in PKC and Akt turn motif phosphorylation, maturation and signalling. *EMBO J.* 2008;27(14):1919-31.
18. Huang J, Manning BD. A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes. *Biochem Soc Trans.* 2009 Feb;37(Pt 1):217-22
19. Julien LA, Carriere A, Moreau J, Roux PP. mTORC1-activated S6K1 phosphorylates Rictor on threonine 1135 and regulates mTORC2 signaling. *Mol Cell Biol.* 2010;30:908-921.
20. Karimi Roshan M, Soltani A, Soleimani A, Rezaie Kahkhaie K, Afshari AR, Soukhtanloo M. Role of AKT and mTOR signaling pathways in the induction of epithelial-mesenchymal transition (EMT) process. *Biochimie.* 2019 Oct;165:229-234.
21. Sheng L, Zhuang S. New Insights Into the Role and Mechanism of Partial Epithelial-Mesenchymal Transition in Kidney Fibrosis. *Front Physiol.* 2020 Sep 15;11:569322.
22. Li X, Zhuang S. Recent advances in renal interstitial fibrosis and tubular atrophy after kidney transplantation. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2014 Oct 2;7:15
23. Schena FP, Pascoe MD, Alberu J, del Carmen Rial M, Oberbauer R, Brennan DC, Campistol JM, Racusen L, Polinsky MS, Goldberg-Alberts R, Li H, Scarola J, Neylan JF; Sirolimus CONVERT Trial Study Group. Conversion from calcineurin inhibitors to sirolimus maintenance therapy in renal allograft recipients: 24-month efficacy and safety results from the CONVERT trial. *Transplantation.* 2009;87(2):233-42
24. Budde K, Becker T, Arns W, Sommerer C, Reinke P, Eisenberger U, Kramer S, Fischer

- W, Gschaidmeier H, Pietruck F; ZEUS Study Investigators. Everolimus-based, calcineurin-inhibitor-free regimen in recipients of de-novo kidney transplants: an open-label, randomised, controlled trial. *Lancet*. 2011;377(9768):837-47
25. Lebranchu Y, Thierry A, Toupance O, Westeel PF, Etienne I, Thervet E, Moulin B, Frouget T, Le Meur Y, Glotz D, Heng AE, Onno C, Buchler M, Girardot-Seguín S, Hurault de Ligny B. Efficacy on renal function of early conversion from cyclosporine to sirolimus 3 months after renal transplantation: concept study. *Am J Transplant*. 2009;9(5):1115-23
 26. Budde K, Lehner F, Sommerer C, Arns W, Reinke P, Eisenberger U, Wüthrich RP, Scheidl S, May C, Paulus EM, Mühlfeld A, Wolters HH, Pressmar K, Stahl R, Witzke O; ZEUS Study Investigators. Conversion from cyclosporine to everolimus at 4.5 months posttransplant: 3-year results from the randomized ZEUS study. *Am J Transplant*. 2012;12(6):1528-40.
 27. Watson CJ, Firth J, Williams PF, Bradley JR, Pritchard N, Chaudhry A, Smith JC, Palmer CR, Bradley JA. A randomized controlled trial of late conversion from CNI-based to sirolimus-based immunosuppression following renal transplantation. *Am J Transplant*. 2005;5(10):2496-503.
 28. Stallone G, Infante B, Schena A, Battaglia M, Ditunno P, Loverre A, Gesualdo L, Schena FP, Grandaliano G. Rapamycin for treatment of chronic allograft nephropathy in renal transplant patients. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16(12):3755-62
 29. Flechner SM, Glyda M, Cockfield S, Grinyó J, Legendre Ch, Russ G, Steinberg S, Wissing KM, Tai SS. The ORION study: comparison of two sirolimus-based regimens versus tacrolimus and mycophenolate mofetil in renal allograft recipients. *Am J Transplant*. 2011 Aug;11(8):1633-44.
 30. Budde K, Becker T, Arns W, Sommerer C, Reinke P, Eisenberger U, Kramer S, Fischer W, Gschaidmeier H, Pietruck F; ZEUS Study Investigators. Everolimus-based, calcineurin-inhibitor-free regimen in recipients of de-novo kidney transplants: an open-label, randomised, controlled trial. *Lancet*. 2011;377(9768):837-47
 31. Kauffman HM, Cherikh WS, Cheng Y, Hanto DW, Kahan BD. Maintenance immunosuppression with target-of-rapamycin inhibitors is associated with a reduced incidence of de novo malignancies. *Transplantation*. 2005;80(7):883-9.
 32. Mathew T, Kreis H, Friend P. Two-year incidence of malignancy in sirolimus-treated renal transplant recipients: results from five multicenter studies. *Clin Transplant*. 2004;18(4):446-9.
 33. Engels EA, Pfeiffer RM, Fraumeni JF Jr, Kasiske BL, Israni AK, Snyder JJ, Wolfe RA, Goodrich NP, Bayakly AR, Clarke CA, Copeland G, Finch JL, Fleissner ML, Goodman MT, Kahn A, Koch L, Lynch CF, Madeleine MM, Pawlish K, Rao C, Williams MA, Castenson D, Curry M, Parsons R, Fant G, Lin M. Spectrum of cancer risk among US solid organ transplant recipients. *JAMA*. 2011;306(17):1891-901.
 34. Sprangers B, Nair V, Launay-Vacher V, Riella LV, Jhaveri KD. Risk factors associated with post-kidney transplant malignancies: an article from the Cancer-Kidney International Network. *Clin Kidney J*. 2018;11(3):315-329
 35. Fortun J, Martin-Davila P, Pascual J, Cervera C, Moreno A, Gavalda J, Aguado JM, Pereira P, Gurguí M, Carratala J, Fogueda M, Montejo M, Blasco F, Bou G, Torre-Cisneros J; RESITRA Transplant Network. Immunosuppressive therapy and infection after kidney transplantation. *Transpl Infect Dis*. 2010;12(5):397-405
 36. Snyder JJ, Israni AK, Peng Y, Zhang L, Simon TA, Kasiske BL. Rates of first infection following kidney transplant in the United States. *Kidney Int*. 2009;75(3):317-26
 37. Berger SP, Sommerer C, Witzke O, Tedesco H, Chadban S, Mulgaonkar S, Qazi Y, de Fijter JW, Oppenheimer F, Cruzado JM, Watarai Y, Massari P, Legendre C, Citterio F, Henry M, Srinivas TR, Vincenti F, Gutierrez MPH, Marti AM, Bernhardt P, Pascual J; TRANSFORM investigators. Two-year outcomes in de novo renal transplant recipients receiving everolimus-facilitated calcineurin inhibitor reduction regimen from the TRANSFORM study. *Am J Transplant*. 2019;19(11):3018-3034.
 38. Liacini A, Seamone ME, Muruve DA, Tibbles LA. Anti-BK virus mechanisms of sirolimus and leflunomide alone and in combination: toward a new therapy for BK virus infection. *Transplantation*. 2010 Dec 27;90(12):1450-7.
 39. Polanco N, González Monte E, Folgueira MD, Morales E, Gutiérrez Martínez E, Bengoa I, Hernández A, Morales JM, Praga M, Andrés A. Everolimus-based immunosuppression therapy for BK virus nephropathy. *Transplant Proc*. 2015 Jan-Feb;47(1):57-61
 40. Bussalino E, Marsano L, Parodi A, Russo R, Massarino F, Ravera M, Gaggero G, Fontana I, Garibotto G, Zaza G, Stallone G, Paoletti E. Everolimus for BKV nephropathy in kidney transplant recipients: a prospective, controlled study. *J Nephrol*. 2020 Jun 12.
 41. Morales JM. Influence of the new immunosuppressive combinations on arterial hypertension after renal transplantation. *Kidney Int Suppl*. 2002;(82):S81-7
 42. Paoletti E, Marsano L, Bellino D, Cassottana P, Cannella G. Effect of everolimus on left ventricular hypertrophy of de novo kidney transplant recipients: a 1 year, randomized, controlled trial. *Transplantation*. 2012;93(5):503-8

43. Zaza G, Granata S, Tomei P, Masola V, Gambaro G, Lupo A. mTOR inhibitors and renal allograft: Yin and Yang. *J Nephrol.* 2014;27(5):495-506
44. Zaza G, Tomei P, Ria P, Granata S, Boschiero L, Lupo A. Systemic and nonrenal adverse effects occurring in renal transplant patients treated with mTOR inhibitors. *Clin Dev Immunol.* 2013;2013:403280.
45. Fuller TF, Freise CE, Serkova N, Niemann CU, Olson JL, Feng S. Sirolimus delays recovery of rat kidney transplants after ischemia-reperfusion injury. *Transplantation.* 2003;76:1594-1599.
46. Stallone G, Infante B, Pontrelli P, Gigante M, Montemurno E, Loverre A, Rossini M, Schena FP, Grandaliano G, Gesualdo L. Sirolimus and proteinuria in renal transplant patients: evidence for a dose-dependent effect on slit diaphragm-associated proteins. *Transplantation.* 2011 May 15;91(9):997-1004.
47. Diekmann F, Andrés A, Oppenheimer F. mTOR inhibitor-associated proteinuria in kidney transplant recipients. *Transplant Rev (Orlando).* 2012 Jan;26(1):27-9.
48. Nava F, Cappelli G, Mori G, Granito M, Magnoni G, Botta C, Solazzo A, Fontana F, Baisi A, Bonucchi D. Everolimus, cyclosporine, and thrombotic microangiopathy: clinical role and preventive tools in renal transplantation. *Transplant Proc.* 2014 Sep;46(7):2263-8
49. Jacobson PA, Schladt D, Oetting WS, Leduc R, Guan W, Matas AJ, Lamba V, Mannon RB, Julian BA, Israni A; DeKAF investigators. Genetic determinants of mycophenolate-related anemia and leukopenia after transplantation. *Transplantation.* 2011 Feb 15;91(3):309-16
50. Sánchez Fructuoso A, Calvo N, Moreno MA, Giorgi M, Barrientos A. Study of anemia after late introduction of everolimus in the immunosuppressive treatment of renal transplant patients. *Transplant Proc.* 2007 Sep;39(7):2242-4.
51. Kahan BD. Efficacy of sirolimus compared with azathioprine for reduction of acute renal allograft rejection: a randomised multicentre study. The Rapamune US Study Group. *Lancet.* 2000 Jul 15;356(9225):194-202.
52. Reitamo S, Spuls P, Sassolas B, Lahfa M, Claudy A, Griffiths CE; Sirolimus European Psoriasis Study Group. Efficacy of sirolimus (rapamycin) administered concomitantly with a subtherapeutic dose of cyclosporin in the treatment of severe psoriasis: a randomized controlled trial. *Br J Dermatol.* 2001 Sep;145(3):438-45.
53. Mahé E, Morelon E, Lechaton S, Sang KH, Mansouri R, Ducasse MF, Mamzer-Bruneel MF, de Prost Y, Kreis H, Bodemer C. Cutaneous adverse events in renal transplant recipients receiving sirolimus-based therapy. *Transplantation.* 2005 Feb 27;79(4):476-82.
54. van Gelder T, ter Meulen CG, Hené R, Weimar W, Hoitsma A. Oral ulcers in kidney transplant recipients treated with sirolimus and mycophenolate mofetil. *Transplantation.* 2003 Mar 27;75(6):788-91.
55. Holdaas H, Potena L, Saliba F. mTOR inhibitors and dyslipidemia in transplant recipients: a cause for concern? *Transplant Rev (Orlando).* 2015;29(2):93-102.
56. Blum CB. Effects of sirolimus on lipids in renal allograft recipients: an analysis using the Framingham risk model. *Am J Transplant.* 2002;2(6):551-9
57. Tedesco Silva H Jr, Cibrik D, Johnston T, Lackova E, Mange K, Panis C, Walker R, Wang Z, Zibari G, Kim YS. Everolimus plus reduced-exposure CsA versus mycophenolic acid plus standard-exposure CsA in renal-transplant recipients. *Am J Transplant.* 2010;10(6):1401-13
58. Pascual J, Berger SP, Witzke O, Tedesco H, Mulgaonkar S, Qazi Y, Chadban S, Oppenheimer F, Sommerer C, Oberbauer R, Watarai Y, Legendre C, Citterio F, Henry M, Srinivas TR, Luo WL, Marti A, Bernhardt P, Vincenti F; TRANSFORM Investigators. Everolimus with Reduced Calcineurin Inhibitor Exposure in Renal Transplantation. *J Am Soc Nephrol.* 2018;29(7):1979-1991.
59. Morrisett JD; Abdel-Fattah G; Hoogeveen et al. Effects of Sirolimus on plasma lipid, lipoprotein levels, and fatty acid metabolism in renal transplant patients. *J Lipid Res.* 2002; 43:1170-1180.
60. Ponticelli C, Arnaboldi L, Moroni G, Corsini A. Treatment of dyslipidemia in kidney transplantation. *Expert Opin Drug Saf.* 2020 Mar;19(3):257-267
61. Fritsche L, Budde K, Dragun D, Einecke G, Diekmann F, Neumayer HH. Testosterone concentrations and sirolimus in male renal transplant patients. *Am J Transplant.* 2004;4(1):130-1
62. Lee S, Coco M, Greenstein SM, Schechner RS, Tellis VA, Glicklich DG. The effect of sirolimus on sex hormone levels of male renal transplant recipients. *Clin Transplant.* 2005 Apr;19(2):162-7
63. Zuber J, Anglicheau D, Elie C, Bererhi L, Timsit MO, Mamzer-Bruneel MF, Ciroidi M, Martinez F, Snanoudj R, Hiesse C, Kreis H, Eustache F, Laborde K, Thervet E, Legendre C. Sirolimus may reduce fertility in male renal transplant recipients. *Am J Transplant.* 2008 Jul;8(7):1471-9
64. Nashan B, Citterio F. Wound healing complications and the use of mammalian target of rapamycin inhibitors in kidney transplantation: a critical review of the literature. *Transplantation.* 2012;94(6):547-61.
65. Flechner SM, Zhou L, Derweesh I, Mastroianni B, Savas K, Goldfarb D, Modlin CS, Krishnamurthi V, Novick A. The impact of

- sirolimus, mycophenolate mofetil, cyclosporine, azathioprine, and steroids on wound healing in 513 kidney-transplant recipients. *Transplantation*. 2003;76(12):1729-34
66. Tiong HY, Flechner SM, Zhou L, Wee A, Mastroianni B, Savas K, Goldfarb D, Derweesh I, Modlin C. A systematic approach to minimizing wound problems for de novo sirolimus-treated kidney transplant recipients. *Transplantation*. 2009;87(2):296-302
 67. Morelon E, Stern M, Israel-Biet, Kreis H, Correas JM, Danel C, Mamzer-Bruneel MF, Peraldi MN, Kreis H. Characteristics of sirolimus associated interstitial pneumonitis in renal transplant patient. *Transplantation* 2001; 72:787-790.
 68. Errasti P, Izquierdo D, Martín P, Errasti M, Slon F, Romero A, Lavilla FJ. Pneumonitis associated with mammalian target of rapamycin inhibitors in renal transplant recipients: a single-center experience. *Transplant Proc*. 2010; 42(8):3053-3054.
 69. Rodríguez-Moreno A, Ridao N, García-Ledesma P, Calvo N, Pérez-Flores I, Marques M, Barrientos A, Sánchez-Fructuoso AI. Sirolimus and everolimus induced pneumonitis in adult renal allograft recipients: experience in a center. *Transplant Proc*. 2009; 41(6):2163-2165.
 70. Alexandru S, Ortiz A, Baldovi S, Milicua JM, Ruíz-Escribano E, Egido J, Plaza JJ. Severe everolimus-associated pneumonitis in a renal transplant recipient. *Nephrol Dial Transplant*. 2008; 23(10):3353-3355.
 71. Champion L, Stern M, Israël-Biet D, Mamzer-Bruneel MF, Peraldi MN, Kreis H, Porcher R, Morelon E. Brief communication: sirolimus-associated pneumonitis: 24 cases in renal transplant recipients. *Ann Intern Med*. 2006;144(7):505-509.
 72. Pham PT, Pham PC, Danovitch GM, Ross DJ, Gritsch HA, Kendrick EA, Singer J, Shah T, Wilkinson AH. Sirolimus-associated pulmonary toxicity. *Transplantation*. 2004;77(8):1215-1220.
 73. Vandewiele B, Vandecasteele SJ, Vanwalleghem L, De Vriese AS. Diffuse alveolar hemorrhage induced by everolimus. *Chest*. 2010;137(2):456-459
 74. Junpaparp P, Sharma B, Samiappan A, Rhee JH, Young KR. Everolimus-induced severe pulmonary toxicity with diffuse alveolar hemorrhage. *Ann Am Thorac Soc*. 2013 Dec;10(6):727-9
 75. Kirby S, Satoskar A, Brodsky S, Pope-Harman A, Nunley D, Hitchcock C, Pelletier R, Ross P, Nadasdy T, Shilo K. Histological spectrum of pulmonary manifestations in kidney transplant recipients on sirolimus inclusive immunosuppressive regimens. *Diagn Pathol*. 2012; 7:25.
 76. Ussavarungsi K, Elsanjak A, Laski M, Raj R, Nugent K. Sirolimus induced granulomatous interstitial pneumonitis. *Respiratory Medicine Case Reports* 2012;vol 7:8-11.
 77. Tomei P, Masola V, Granata S, Bellin G, Carratù P, Ficial M, Ventura VA, Onisto M, Resta O, Gambaro G, Chilosi M, Lupo A, Zaza G. Everolimus-induced epithelial to mesenchymal transition (EMT) in bronchial/pulmonary cells: when the dosage does matter in transplantation. *J Nephrol*. 2016;29(6):881-891
 78. Granata S, Santoro G, Masola V, Tomei P, Sallustio F, Pontrelli P, Accetturo M, Antonucci N, Carratù P, Lupo A, Zaza G. In Vitro Identification of New Transcriptomic and miRNomic Profiles Associated with Pulmonary Fibrosis Induced by High Doses Everolimus: Looking for New Pathogenetic Markers and Therapeutic Targets. *Int J Mol Sci*. 2018;19(4):1250
 79. Kumar D, LeCorchick S, Gupta G. Belatacept As an Alternative to Calcineurin Inhibitors in Patients with Solid Organ Transplants. *Front Med (Lausanne)*. 2017 May 19;4:60.
 80. Vincenti F, Rostaing L, Grinyo J, Rice K, Steinberg S, Gaité L, Moal MC, Mondragon-Ramirez GA, Kothari J, Polinsky MS, Meier-Kriesche HU, Munier S, Larsen CP. Belatacept and Long-Term Outcomes in Kidney Transplantation. *N Engl J Med*. 2016;374(4):333-43
 81. Charpentier B, Medina Pestana JO, Del C Rial M, Rostaing L, Grinyó J, Vanrenterghem Y, Matas A, Zhang R, Mühlbacher F, Pupim L, Florman S. Long-term exposure to belatacept in recipients of extended criteria donor kidneys. *Am J Transplant*. 2013 Nov;13(11):2884-91
 82. Voora S, Adey DB. Management of Kidney Transplant Recipients by General Nephrologists: Core Curriculum 2019. *Am J Kidney Dis*. 2019;73(6):866-879
 83. Mathur RK, Awasthi A, Saha B. The conundrum of CD40 function: host protection or disease promotion? *Trends Parasitol*. 2006;22(3):117-22
 84. van Kooten C, Banchereau J. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol*. 2000;67(1):2-17.
 85. Cordoba F, Wiczorek G, Audet M, Roth L, Schneider MA, et al. A novel, blocking, Fc-silent anti-CD40 monoclonal antibody prolongs nonhuman primate renal allograft survival in the absence of B cell depletion. *Am J Transplant*. 2015;15(11):2825-36
 86. Farkash E, Naik A, Tedesco-Silva H, Nashan B, et al. CNI-Free Therapy with Iscalimab (anti-CD40 mAb) Preserves Allograft Histology Compared to Standard of Care after Kidney Transplantation [abstract]. *Am J Transplant*. 2019; 19 (suppl 3).