



Università degli Studi  
di Udine

---

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI UDINE  
CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE E TECNOLOGIE CLINICHE  
CICLO XXV**

**Tesi di Dottorato di Ricerca**

**TERAPIA CON INIBITORI DEL SEGNALE DI PROLIFERAZIONE (PSI)  
NEL TRAPIANTO DE NOVO DI FEGATO: UNO STUDIO  
MULTICENTRICO RANDOMIZZATO**

**Relatore:**

**Chiar.mo Prof. Saverio AMBESI IMPIOMBATO**

**Dottorando:**

**Dott. Dario LORENZIN**

**Correlatore:**

**Prof. Vittorio BRESADOLA**

Anno Accademico 2012/2013

# INDICE

CAPITOLO 1 - BACKGROUND E RAZIONALE DELLO STUDIO	2
CAPITOLO 2 – LO STUDIO	7
2.1 <i>Obiettivi</i>	7
2.2 <i>Materiali e metodi</i>	8
CAPITOLO 3- RISULTATI	23
CAPITOLO 4- DISCUSSIONE E REVISIONE DELLA LETTERATURA	25
4.1 <i>Evidenze scientifiche e raccomandazioni pratiche per l'uso di everolimus come farmaco di prima scelta nel trapianto di fegato</i>	26
4.2 <i>Gestione degli eventi avversi</i>	33
4.3 <i>Monitoraggio dei livelli ematici di everolimus</i>	38
CAPITOLO 5 - CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE	39
BIBLIOGRAFIA	41
FIGURE E TABELLE	45

# CAPITOLO 1

## BACKGROUND E RAZIONALE DELLO STUDIO

Nell'ambito del trapianto d'organo, uno dei maggiori elementi di dibattito rimane tuttora lo sviluppo di nuovi regimi di immunosoppressione che permettano, da un lato, buoni risultati in termini di *patient e graft survival* e, dall'altro, una riduzione degli effetti collaterali normalmente associati all'uso di farmaci immunomodulatori.

In particolare, l'uso degli inibitori della calcineurina (CNI) – attualmente considerati lo standard nella terapia immunosoppressiva del trapianto d'organo solido - è associato ad un ridotto rischio di rigetto ma ad una significativa frequenza di effetti collaterali <sup>1</sup>.

I CNI possono determinare riduzione della funzionalità renale <sup>2</sup>, neurotossicità <sup>3</sup>, aumentato rischio cardiovascolare e sviluppo di diabete mellito post-trapianto <sup>5</sup>. La completa eliminazione di tale gruppo di farmaci [ciclosporina (CsA) o tacrolimus (TAC)], soprattutto nel periodo precoce post-trapianto, non è stato ancora possibile fino ad oggi se non aumentando il rischio di rigetto acuto dell'organo stesso <sup>6,8</sup>.

A differenza dei precedenti immunosoppressori, invece, l'Everolimus (EVL) appartiene ad una nuova classe di farmaci antirigetto, i cosiddetti inibitori del segnale di proliferazione (PSI).

Questi agenti (di cui il primo ad essere sintetizzato è noto con il nome di Rapamicina, da cui i suoi derivati, Sirolimus ed Everolimus - semisintetico) sembrano essere ben tollerati specialmente se utilizzati a bassi dosaggi; soprattutto, si distinguono per un profilo cosiddetto *renal sparing* che li rende una valida alternativa ai CNI nella immunosoppressione del trapianto

di organo solido.

Le prime esperienze d'uso di PSI come immunosoppressori nel trapianto di fegato si sono principalmente focalizzate nel Sirolimus (SRL) in pazienti già affetti da *impairment* renale; in questi casi il farmaco è stato prevalentemente associato all'uso di CNI<sup>9-13</sup>.

Questi studi hanno valutato la relazione tra l'incidenza di rigetti acuti ed i livelli ematici di entrambi i farmaci (ciclosporina ed SRL); su tale scorta è emerso che il rischio di rigetto acuto era aumentato in presenza di bassi livelli di SRL, in particolare di livelli inferiori a 3 ng/ml. L'analisi ha inoltre evidenziato che, con livelli di SRL superiori a 3 ng/ml, i livelli ematici di ciclosporina non avevano alcuna correlazione con il rischio di rigetto acuto, ma avevano viceversa una correlazione diretta e significativa con il rischio di nefrotossicità, indipendentemente dai livelli raggiunti di SRL;<sup>14</sup> questi dati sono stati evidenziati, in particolare, in pazienti con concomitanti patologie renali non direttamente correlati a CNI e con particolare riferimento all'intervallo di tempo post-trapianto<sup>15,25</sup>.

Peraltro due studi monocentrici, prospettici e randomizzati, sulla conversione a SRL in monoterapia vs CNI nei pazienti con disfunzione renale, hanno confermato recentemente che la sospensione dei CNI è effettivamente associata ad un incremento significativo della *clearance* della creatinina a 3 mesi dopo lo *switch*, ma non a 12 mesi, suggerendo che la minimizzazione precoce di CNI costituisca il miglior *timing* e possa effettivamente rappresentare la soluzione per la prevenzione del deterioramento della funzionalità renale post-trapianto<sup>16</sup>.

Tra i PSI, Everolimus (EVL) rappresenta un metabolita attivo (*40-O-(2-ideossietil)*) derivato semisintetico della rapamicina, un antibiotico macrolide ottenuto da *Streptomyces hygroscopicus*; è un inibitore del segnale ed ha come *target* di azione i meccanismi di proliferazione delle cellule T; peraltro è in grado di aumentare l'effetto dei CNI nella modulazione dei fattori di crescita dei

linfociti T.

In particolare, il meccanismo di azione di EVL è di bloccare i processi del ciclo cellulare (linfociti B e T e cellule non ematopoietiche) mediati dalle interleuchine 2 e 15, agendo attraverso la inibizione dell'enzima *Kinasi p70S6*, coinvolto nei processi di trasduzione del segnale. Tale evento determina il blocco del ciclo cellulare in fase G1 prevenendo pertanto la progressione in fase S e, dunque, i successivi processi proliferativi <sup>17-20</sup>.

L'uso *in vitro* e gli studi clinici hanno dimostrato, inoltre, che EVL è in grado di implementare il regime d'immunosoppressione nei trapianti se associato a terapia standard con ciclosporina A (CsA) <sup>21,22</sup>. Il razionale per lo sviluppo di un nuovo immunosoppressore quale everolimus si basa dunque sul meccanismo di azione innovativo che presenta numerosi potenziali vantaggi: da un lato la profilassi del rigetto acuto, dall'altra l'inibizione della proliferazione delle cellule muscolari lisce vascolari, che potrebbe consentire anche nel trapianto di fegato una riduzione della incidenza e della gravità del rigetto cronico.

L'efficacia e la tollerabilità di everolimus, (in associazione a ciclosporina) sono state ampiamente valutate in numerosi studi clinici di fase II e III.

Tra gli studi eseguiti sulla *safety* di questa nuova molecola, segnaliamo:

- un trial di fase I nel trapianto di fegato (LT) ha evidenziato che la combinazione di EVL, microemulsione di CsA (Csa-ME) e steroidi (S) non è associata a cambiamenti rilevanti dei parametri clinici o ad un aumentato rischio di incidenza di infezioni <sup>23</sup>
- uno studio precedente di Fase II (RAD B158, Novartis)<sup>24</sup>, che ha previsto l'arruolamento e la randomizzazione di 119 pazienti sottoposti a trapianto di fegato *de novo* in 1 dei 4 possibili bracci di studio [dose giornaliera di Everolimus gruppo a) 1 mg/die, b) 2 mg/die,

or c) 4 mg/die] o nel gruppo placebo in associazione a una dose standard di ciclosporina A, ha confermato la *safety* di EVL nel trapianto de novo di fegato.

Questi risultati confermano i dati già ottenuti precedentemente da *trials* sul trapianto di rene e di cuore, definendo inoltre come *range* di concentrazione ematica di EVL valori variabili da 3 a 8 ng/mL (ovvero concentrazioni <3ng/mL rappresentano il livello di EVL statisticamente associato ad un rischio significativo di rigetto acuto del graft).

Sulla scorta di questi dati, è possibile speculare che un'ulteriore riduzione o la totale eliminazione di un inibitore delle calcineurine in una fase precoce dovrebbe essere in grado di evitare o minimizzare il rischio di disfunzione renale, consentendo contestualmente un'adeguata prevenzione del rigetto acuto in pazienti sottoposti a trapianto di fegato.

Uno studio recente di fase II in cui è stata utilizzata una dose fissa di EVL e CsA-ME nei trapianti *de novo* di fegato ha confermato e supportato, peraltro, l'efficacia e la sicurezza di EVL in questa categoria di pazienti <sup>25</sup>.

A tale riferimento, i risultati derivanti dallo studio RAD H2401 Novartis eseguito su 144 pazienti sottoposti a terapia antirigetto di mantenimento, ha dimostrato che il monitoraggio continuo del *range* terapeutico di EVL permette la completa eliminazione di CNI senza tuttavia che vi sia un aumentato rischio di rigetto acuto; sulla base di un *trial* clinico italiano, inoltre, la conversione da CNI ad EVL è fattibile nel 75% dei casi ( $p < 0.0001$ ) ed è associata ad un miglioramento significativo nella funzionalità renale nei pazienti con iniziale alterata *clearance* della creatinina<sup>25</sup>.

L'evidenza degli studi *in vitro* ed *in vivo* che EVL inibisca la crescita cellulare e la proliferazione attraverso il blocco dei classici recettori della rapamicina, ha determinato

peraltro un vivo interesse nell'uso di questo farmaco per il suo potenziale ruolo nel trattamento e nella prevenzione delle neoplasie post-trapianto.

La patologia neoplastica, infatti, è diventata un problema rilevante dopo trapianto di organo solido, correlata principalmente ad un aumento della sopravvivenza dei pazienti immunodepressi<sup>26-29</sup>.

L'azione potenzialmente antineoplastica del recettore per la rapamicina (mTOR) si basa principalmente sul fatto che mTOR è coinvolto nel meccanismo di controllo del ciclo cellulare; esso infatti promuove, quando venga attivato, progressione del ciclo, attivazione e proliferazione del linfociti T e B, formazione di anticorpi, produzione e proliferazione di cellule non immunitarie<sup>30</sup>.

Attraverso la sua inibizione, infatti, vengono bloccati importanti meccanismi che partecipano alla formazione di fattori di crescita che mediano anche la proliferazione tumorale; inoltre gli inibitori di mTOR provvedono a ridurre la espressione del VEGF e TGF, normalmente riconosciuti come agenti che favoriscono la neoangiogenesi tumorale.

Su tale scorta è nostra intenzione valutare la fattibilità e l'efficacia dell'uso di Everolimus (EVL) nella minimizzazione ed eventuale sospensione di CNI nei pazienti adulti trapiantati di fegato. Lo studio terrà conto di un gruppo di controllo (terapia immunosoppressiva standard con tacrolimus e steroidi).

## **CAPITOLO 2**

### **LO STUDIO**

#### **2.1 OBIETTIVI DELLO STUDIO**

L'obiettivo dello studio è stato valutare la fattibilità e l'efficacia dell'uso di PSI, in particolare Everolimus (EVL) nella minimizzazione ed eventuale sospensione di CNI nei pazienti adulti trapiantati di fegato.

##### **2.1.1 END-POINTS PRIMARI**

Gli *end-points* primari dello studio erano quelli di misurare:

- a. la proporzione di pazienti liberi da episodi di rigetto (*biopsy-proven* - BPAR) con necessità di terapia corticosteroidea fino al terzo mese dal trapianto;
- b. l'incidenza di perdita del *graft* o morte del paziente nei primi 3 mesi dal trapianto;
- c. l'incidenza dei pazienti in monoterapia (EVL) a 30 giorni dal trapianto.

##### **2.1.2 END-POINTS SECONDARI**

Gli *end-points* secondari dello studio erano quelli di misurare:

- a. la funzionalità renale a 1, 3, 6, 12, e 24 mesi attraverso lo studio della *clearance* della creatinina in accordo con il *Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) Study equation* (80-20 mL/min);
- b. il ricorso a trattamenti dialitici;
- c. gli eventi avversi, in particolare guarigione delle ferite, depressione midollare, iperlipidemia, proteinuria, diabete mellito, diagnosi di ipertensione, infezioni, livelli del virus HCV.

## **2.2 MATERIALI E METODI**

### **2.2.1 DISEGNO DELLO STUDIO**

È stato condotto uno studio prospettico, multicentrico, controllato, randomizzato (gruppo di studio *vs* gruppo di controllo), *investigator-driven* di FASE II su pazienti adulti sottoposti a trapianto *de novo* di fegato. Il *Recruitment* allo studio nei diversi centri partecipanti è competitivo.

### **2.2.2 DURATA DELLO STUDIO**

Per questo studio prospettico è stato previsto un periodo di arruolamento di 12 mesi ed un *follow-up* minimo per i pazienti arruolati di 24 mesi. La durata massima dello studio è stata quindi di 36 mesi. Inoltre è stata prevista un'analisi *ad interim* a 15 mesi (12 mesi di arruolamento + 3 mesi di *follow-up*).

Lo studio si è svolto da gennaio 2010 a gennaio 2013. La data fissata per iniziare l'arruolamento dei pazienti era il 20 Gennaio 2010, mentre l'ultimo arruolamento era possibile fino al 20 Gennaio 2011.

### **2.2.3 CAMPIONAMENTO**

Per lo studio sono stati inclusi pazienti consecutivi sottoposti a trapianto di fegato che hanno dato il loro consenso informato scritto a partecipare allo studio.

#### **2.2.3.1 Criteri di inclusione**

Sono stati inclusi nello studio i pazienti, di sesso maschile o femminile, di ogni razza, con età uguale o compresa tra 18 e 70 anni, che soddisfavano i seguenti criteri:

- essere sottoposti a trapianto di fegato *de novo* da donatore cadavere con fegato intero o emifegato (*split liver*) e con trapianto vitale al momento della randomizzazione;
- in grado di comunicare adeguatamente, di capire e di rispondere alle esigenze del protocollo;
- consenso scritto;
- tempo di ischemia fredda <12 ore;
- sottoposti al seguente schema immunosoppressivo al momento del trapianto e fino al momento dell'arruolamento (giorno 7):
  - steroidi: 500 mg ev. (periodo intraoperatorio, alla riperfusione) seguiti da 20 mg/die dalla prima giornata post-operatoria;

- anticorpi monoclonali anti-IL2R (Basiliximab 20 mg): prima dose (giorno 0) al termine dell'intervento, seconda dose in 4° giornata post-operatoria;
- tacrolimus con inizio della terapia tra le 48 e le 72 ore dalla riperfusione dell'organo, mantenendo livelli target tra 8 e 12 ng/ml.

### **2.2.3.2 Criteri di esclusione**

Sono stati esclusi dallo studio i pazienti che incontravano le seguenti caratteristiche o sottoposti ai seguenti trattamenti e /o terapie:

- alterazioni fisiche o di laboratorio o disturbi psichici riferibili entro 2 settimane prima della randomizzazione tali che, nell'opinione dello sperimentatore, possano interferire con la partecipazione allo studio;
- donne in gravidanza (test positivo all' $\beta$ -HCG con valori >5mUI/ml) o in allattamento;
- donne potenzialmente fertili, con le seguenti eccezioni:
  - donne in stato menopausale (amenorrea spontanea da almeno 12 mesi, amenorrea spontanea da almeno 6 mesi con livelli FSH >40 mIU/ml, ooforectomia bilaterale chirurgica da almeno 6 settimane con o senza isterectomia);
  - donne che fanno uso di uno o più metodi contraccettivi affidabili ed approvati per tutta la durata dello studio e per i tre mesi successivi all'interruzione del trattamento in studio.
- trapianto multiviscerale o trapianto di *insulae* pancreatiche, o che siano stati precedentemente sottoposti a trapianto d'organo o di tessuto;

- trapianto combinato fegato-rene;
- trapianto di fegato da donatore vivente;
- trapianto di fegato AB0-incompatibile;
- trapianto da donatori positivi per gli antigeni di superficie HBV;
- storia di patologia neoplastica in qualsiasi sede nei 3 anni precedenti all'arruolamento, indipendentemente che vi sia evidenza o meno di recidiva o metastasi (ad eccezione di neoplasie cutanee non metastatiche, come basalioma o carcinoma squamoso della cute, o epatocarcinoma);
- altri farmaci sperimentali entro 4 settimane prima del tempo basale o che siano attualmente arruolati in altri *trials* clinici;
- ipersensibilità al farmaco (o a farmaci simili ad EVL – ex macrolidi) o alla classe farmaceutica o ad eccipienti e franche controindicazioni alla assunzione dello stesso;
- anamnesi di coagulopatia o presenza di qualsiasi condizione medica che richieda una terapia anticoagulante a lungo termine dopo trapianto (è ammesso il trattamento con ASA a basso dosaggio);
- conta piastrinica  $\leq 40.000/\text{mm}^3$  o WBC *count*  $\leq 2000/\text{mm}^3$  o emoglobina  $\leq 7$  g/dL al momento della randomizzazione;
- severe infezioni sistemiche;
- ipercolesterolemia  $> 350\text{mg/dl}$  o ipertrigliceridemia grave  $> 500\text{mg/dL}$  al momento della randomizzazione. Sono stati inclusi anche pazienti con iperlipidemia compensata;

- epatite fulminante.

Ad ogni paziente eleggibile, durante la fase di valutazione per trapianto di fegato, è stato chiesto di partecipare allo studio dopo valutazione dei criteri di inclusione ed esclusione. Tutti i pazienti che hanno acconsentito di parteciparvi, hanno dato il loro consenso scritto per il trattamento dei loro dati personali in accordo con la normativa vigente. Al momento del ricovero per il trapianto di fegato è stato nuovamente chiesto al paziente se conferma il consenso a partecipare al presente studio.

In settima giornata post-trapianto, tutti i pazienti che abbiano precedentemente sottoscritto il consenso informato, sono stati sottoposti a visita basale.

Sono stati arruolati e randomizzati tutti i pazienti con trapianto vitale che, in base ai criteri di inclusione e di esclusione, sono risultati eleggibili al momento della visita al giorno 7, dopo aver ricevuto un protocollo immunosoppressivo identico nei primi 7 giorni post-trapianto.

#### **2.2.4 RANDOMIZZAZIONE**

L'arruolamento del paziente nello studio è stato effettuato in 7° giornata post-trapianto di fegato.

Il giorno dell'arruolamento corrisponde al giorno di inizio dello studio.

L'assegnazione definitiva dei pazienti ad uno dei bracci di randomizzazione è avvenuta sulla scorta dei criteri di inclusione e di esclusione e dopo aver verificato la vitalità del trapianto, con rapporto di allocazione 2:1 (gruppo studio vs gruppo controllo).

La procedura di randomizzazione è stata compiuta utilizzando una modalità centralizzata (*software* specifico) ed è stata assegnata per via telefonica dal centro coordinatore (Padova).

Qualsiasi deviazione del protocollo ha comportato l'esclusione del paziente dall'arruolamento nello studio. Lo sperimentatore ha garantito per tutto il periodo il rispetto dei criteri di inclusione/esclusione e del protocollo.

*Records* dei dati sono stati archiviati insieme alla documentazione dello studio.

La randomizzazione ha tenuto conto dell'eventuale proteinuria alla visita di *baseline*.

#### **2.2.4.1 Gruppo studio (gruppo A)**

L'assegnazione al Gruppo A ha previsto la somministrazione di EVL entro 24 ore dal momento della randomizzazione (giorno 7 dal momento del trapianto) in associazione alla somministrazione di tacrolimus e steroidi. Il primo dosaggio del *trough level* è stato eseguito al 7° giorno dall'inizio della terapia.

Dopo il raggiungimento del *trough level* di EVL >5 ng/mL (*target* definitivo 6-12 ng/ml), si è proceduto a progressivo *weaning* di tacrolimus (portando i livelli ematici di TAC <5 ng/mL) con definitiva sospensione di TAC entro 30 giorni dal trapianto quando possibile.

Per questo gruppo di pazienti, lo sperimentatore ha avuto la facoltà di:

- sospendere la somministrazione di EVL, fino ad un massimo di 7 giorni consecutivi, in presenza di significativi eventi avversi da EVL. Nel caso di sospensione definitiva o di un periodo superiore a 7 giorni è stata prevista l'uscita definitiva del paziente dallo studio, considerandolo come un *drop-out*;
- modulare la somministrazione di EVL mantenendo TAC in associazione a basso dosaggio (*trough level* <5 ng/ml), in caso di evidente insufficiente copertura immunosoppressiva (rigetto acuto BPAR) resistente a terapia steroidea o quando non si

raggiunga il *trough level* di 8 ng/dl entro 20 giorni dal trapianto) o, ancora, in caso di eventi avversi che suggeriscano la necessità di mantenere bassi livelli di EVL.

I pazienti in duplice terapia a 30 giorni dal trapianto (EVL-TAC a basso livello, *trough level* <5 ng/ml) hanno continuato lo studio e sono stati considerati in un sottogruppo di analisi stratificata.

#### **2.2.4.2 Gruppo controllo (gruppo B)**

I pazienti randomizzati nel gruppo B hanno proseguito con lo schema immunosoppressivo standard con tacrolimus mantenendo valori di *trough level* compresi tra 6 e 12 ng/mL nel primo mese, in associazione alla somministrazione di steroidi (20 mg/die con successivo *weaning* entro 3 mesi dal trapianto).

#### **2.2.4.3 Schema immunosoppressivo**

##### ***Everolimus***

Il trattamento immunosoppressivo sperimentale con everolimus è stato fornito sotto forma di compresse per somministrazione orale (o attraverso sondino naso-gastrico) da 0.25, 0.5 e 0.75 mg o sospensione orale.

Everolimus è stato somministrato alla dose iniziale di 3 mg/die, in due somministrazioni giornaliere (1,5+1,5mg) da iniziare entro 24 ore dalla 7<sup>o</sup> giornata post-operatoria dopo la randomizzazione. Il primo controllo del *trough level* è stato eseguito a distanza di 7 giorni dalla prima somministrazione.

Per ciascun paziente in trattamento con il farmaco è stato possibile richiedere un aggiustamento della dose in relazione ai livelli ematici, alla tollerabilità, alla risposta individuale, al cambiamento dei farmaci somministrati in associazione al quadro clinico; in particolare è stato

possibile ridurre la dose di everolimus in caso di trombocitopenia, bassi livelli di emoglobina o leucociti, ipercolesterolemia o ipertrigliceridemia. Gli aggiustamenti della dose sono stati eseguiti a intervalli variabili, al fine di ottenere un adeguato *trough level* compreso tra 6 e 12 ng/mL nei pazienti che hanno raggiunto la monoterapia. Nel caso in cui di necessità (adeguamento del *trough level*, tossicità midollare, insufficiente copertura immunosoppressiva, rigetto acuto – BPAR - resistente a terapia steroidea) è stato possibile:

- sospendere la somministrazione di EVL per un massimo di 7 giorni consecutivi; la sospensione oltre tale periodo invece è stata considerata *protocol deviation* ed il paziente è uscito dallo studio (drop-out)
- continuare la somministrazione di EVL con minori livelli di EVL in associazione di TAC a basso dosaggio (*trough level* <5 ng/ml)

### ***Tacrolimus***

Primi sette giorni dopo il trapianto:

Iniziale dosaggio di 0.03 mg/Kg/die a partire da 48-72 ore dopo la ri-perfusione e target levels di 6-12 ng/mL nella prima settimana post-operatoria.

#### **2.2.4.4 Dopo la randomizzazione**

##### ***Gruppo studio (gruppo A)***

Per i pazienti che hanno ricevuto tacrolimus in associazione ad EVL il dosaggio di tacrolimus è stato ridotto e/o aggiustato (rispetto alla somministrazione dei giorni precedenti) fino al raggiungimento di *trough level* compreso tra 2-5 ng/mL non appena il livello ematico di EVL è risultato superiore a 5 ng/mL. Successivamente è stato possibile procedere ad una progressiva ulteriore riduzione e sospensione di Tacrolimus non appena EVL ha raggiunto valori in *range* (6-12 ng/mL). Il passaggio a monoterapia è stato ottenuto preferibilmente entro il giorno 30 post-operatorio.

##### ***Gruppo controllo (gruppo B)***

Dopo i primi 7 giorni in cui tutti i pazienti hanno ricevuto lo stesso protocollo immunosoppressivo, i pazienti randomizzati nel gruppo di controllo ricevuto tacrolimus in associazione a terapia steroidea. Il dosaggio di TAC, suddiviso in due dosi/die, è stato aggiustato per ottenere un *trough level* compreso tra 6-12 ng/mL nel primo mese post-trapianto e di 4-8 ng/mL successivamente.

##### ***Corticosteroidi***

Lo studio ha previsto (criteri di inclusione), la somministrazione di steroidi secondo le seguenti modalità:

- 500mg e.v. intra-operatorio;
- 20mg/die (e.v./per os) dal giorno 1 post-operatorio;
- successivo *weaning* degli steroidi entro 3 mesi dal trapianto.

La somministrazione di corticosteroidi al di fuori delle suddette indicazioni è stato considerato deviazione del protocollo con eccezione del trattamento classico del rigetto acuto con boli steroidei di 1 grammo per 3 volte/die. Nel caso di rigetto steroideo-resistente il paziente è uscito dallo studio ed è stato successivamente trattato secondo i protocolli del Centro.

#### ***Profilassi anti-cytomegalovirus (cmv)***

La profilassi del CMV è stata resa obbligatoria in tutti i casi in cui il donatore risultava positivo per il CMV e il ricevente negativo. È stato ammesso il trattamento con ganciclovir, globulina iperimmune o valganciclovir, secondo la prassi del centro trapianti. Tutti gli altri casi hanno ricevuto una profilassi in base al protocollo terapeutico previsto dal centro trapianti. La profilassi anti-CMV era raccomandata durante ogni trattamento degli episodi di rigetto acuto con anticorpi.

#### ***Profilassi della polmonite da pneumocystis carinii (pcp)***

Tutti i pazienti hanno ricevuto un trattamento profilattico della PCP, a seconda della politica di Centro.

#### ***Altre terapie concomitanti***

L'impiego di una terapia ipolipemizzante, preferibilmente una statina, era consigliata nei pazienti con iperlipemia. La terapia ipolipemizzante doveva risultare ottimizzata prima di ridurre il dosaggio di everolimus a causa di iperlipemia.

Non devovano essere somministrati altri farmaci oltre a quelli previsti dal protocollo e la terapia normalmente assunta dal paziente, fatta eccezione il trattamento di infezioni, episodi di rigetto ed eventi avversi.

Non è stata permessa la somministrazione di altri immunosoppressori oltre a quelli specificati dal protocollo.

I farmaci induttori del CYP3A4 (ad esempio rifampicina, carbamazepina, fenitoina, barbiturici) possono condizionare il metabolismo di everolimus. In caso di utilizzo di questi farmaci, le dosi di everolimus potrebbero richiedere un aumento. Farmaci come ketoconazolo, itraconazolo, fluconazolo, terfenadina, astemizolo e cisapride erano proibiti mentre il paziente ha ricevuto il trattamento in studio.

Pazienti HBV-positivi (anticorpo-antiCore) hanno ricevuto profilassi passiva con immunoglobuline specifiche anti-HB secondo politica di centro

## **2.2.5 DEVIAZIONI DAL PROTOCOLLO**

### **2.2.5.1 Farmaci non ammessi**

Non era ammesso l'uso di mofetil micofenolato durante lo studio clinico. Il loro utilizzo è stato considerato *protocol deviation* ed il paziente è uscito dallo studio.

### **2.2.5.2 Deviazioni del protocollo ammesse**

A discrezione dello sperimentatore ed in caso di necessità clinica (raggiungimento del *trough level*, tossicità midollare, BPAR, etc.) sono state ammesse le seguenti deviazioni dal protocollo:

- sospensione di EVL fino ad un massimo di 7 giorni consecutivi. Oltre tale periodo il paziente veniva considerato *drop-out*;
- continuazione associazione con TAC a basse dosi.

## **2.2.6 PLANNIG VISITE**

### **2.2.6.1 Visite paziente**

I pazienti arruolati sono stati visitati. Le visite dello studio erano previste ai giorni: giorno -1, settimana 1-2-3-4 e mese 3-6-12-24 (Tabella 1)

### **2.2.6.2 Biopsie**

Sono state eseguite biopsie epatiche come da protocollo di centro con le seguenti eccezioni (obbligatorie):

- per tutti i pazienti HCV a 12 mesi dopo trapianto, per comparare il gruppo di studio con il gruppo di controllo sotto il profilo di *staging* infiammatorio e *grading* fibrotico;
- qualora vi sia sospetto di rigetto acuto, a conferma del sospetto clinico.

Il grado di rigetto è stato classificato sulla scorta della classificazione di Banff (*RAI scoring system*).

### **2.2.6.3 Farmaco**

- Certican<sup>®</sup> (EVL), prodotto da Novartis;
- Dose: 3 mg/die suddiviso in due somministrazioni (1,5+1,5mg);
- Formulazione: compresse per via orale da: 0,25 mg, 0,5 mg e 0,75 mg, in blister da 10 compresse. Una scatola di farmaco contiene 8 blister.

## 2.2.7 ANALISI STATISTICA

### 2.2.7.1 Dimensione del gruppo di studio

Il *trial* è designato come un classico studio di fase II con le seguenti assunzioni:

- il *cut-off* di non efficacia del trattamento è stato stabilito essere  $\leq$  al 60%,
- il *cut-off* di efficacia è invece stabilito ad una risposta  $\geq$  75%.

Quindi le ipotesi di interesse sono  $H_0: r \leq 60\%$  versus  $H_A: r \geq 75\%$ , dove  $r$  è la proporzione di pazienti che sono liberi da episodi di rigetto *biopsy-proven* (BPAR) con necessità di terapia corticosteroidica fino al terzo mese dal trapianto.

L'errore di I tipo ( $\alpha$ , probabilità di accettare un trattamento non efficace: falso positivo) è fissato al 5%. L'errore di II tipo ( $\beta$ , probabilità di escludere un trattamento efficace: falso negativo) è fissato al 20%.

In base a queste assunzioni, sono stati considerati necessari 78 pazienti per il gruppo di studio (A). La valutazione dell'efficacia del trattamento è basata sul numero di pazienti liberi da rigetto BPAR con necessità di terapia corticosteroidica a 3 mesi dall'inizio dello studio: se questo numero è:

- $< 62$ , dimostra che il trattamento non è efficace;
- $\geq 62$ , dimostra che il trattamento è sufficientemente efficace.

I pazienti persi al *follow-up* entro i primi 3 mesi dall'inizio dello studio sono stati rimpiazzati in modo da raggiungere un numero minimo di 78 pazienti valutabili a 3 mesi per il braccio di studio.

### **2.2.7.2 Dimensione del gruppo di controllo**

La dimensione del gruppo di controllo è stata equivalente alla metà del gruppo di studio e quindi composto da 39 pazienti. Con tale numerosità è stato possibile stimare un *cut-off* di efficacia stabilito ad una risposta  $\geq 75\%$  con una precisione di  $\pm 14\%$ . Il gruppo di controllo non ha rivestito alcun ruolo nella determinazione dell'efficacia del trattamento nel gruppo di studio. Esso è risultato utile esclusivamente come gruppo di riferimento.

### **2.2.7.3 Piano di analisi dei dati**

Le caratteristiche basali dei pazienti (gruppo di studio e controlli) sono state espresse mediante media  $\pm$  deviazione standard (DS) o mediana (*range*) a seconda delle esigenze descrittive per le variabili continue, e come frequenze (%) per le variabili categoriche - nominali. Il test del chi-quadrato ( $\chi^2$ ), il test esatto di Fisher (ove richiesto dalla scarsa numerosità) e la regressione logistica sono stati utilizzati dove appropriato per i confronti tra gruppi.

I risultati ottenuti dal confronto tra i due gruppi (A vs. B) n in ogni caso non sono stati considerati conclusivi (visto che la numerosità campionaria è stata calcolata come per uno studio non randomizzato) ma suggestivi unicamente per il disegno di un eventuale studio di fase 3.

La durata del *follow – up* e la sopravvivenza sono stati espressi come mediana (*range*). Le curve di sopravvivenza del paziente e del *graft* sono stati costruite con il metodo di Kaplan-Meier e confrontate con il test Log rank. L'analisi univariata è stata realizzata utilizzando il modello dei rischi proporzionali di Cox. Le variabili risultate significative all'analisi univariata ( $p < 0,1$ ), sono state inserite in un modello multivariato di Cox. La significatività statistica è stata posta con

$p < 0,05$ . I calcoli statistici sono stati effettuati con il software JMP (1989-2003 SAS Institute Inc.).

## CAPITOLO 3

### RISULTATI

A partire da gennaio 2010 fino a ottobre 2012 sono stati arruolati nello studio 140 pazienti in sette Centri Trapianto sul territorio nazionale. Sessantasei pazienti sono stati arruolati nel gruppo di studio e i rimanenti 38 nel gruppo controllo. Al momento di quest'analisi *ad interim* dello studio, 63 pazienti (45%) hanno raggiunto l'*end-point* primario a 3 mesi. Le caratteristiche di questa popolazione al momento dell'arruolamento sono riportate nella Tabella 2 e non dimostrano significative differenze tra i due gruppi. In particolare la funzionalità renale, valutata come *Clearance* della creatinina con metodo MDRD, così come lo score MELD e i tempi di ischemia fredda erano paragonabili nei due gruppi al momento dell'arruolamento.

Allo stato attuale del *follow-up* il 17% e il 24% dei pazienti rispettivamente nel gruppo di studio e nel gruppo controllo ha terminato lo studio.

L'andamento dei livelli plasmatici di tacrolimus nei due gruppi è riportato nella Figura 1 e dimostra una sostanziale uguaglianza dei *trough levels* nei primi 14 giorni post-trapianto, mentre successivamente i livelli di tacrolimus risultano naturalmente più elevati nel gruppo controllo rispetto ai pazienti che facevano anche everolimus. All'*end-point* primario dei 90 giorni post-trapianto, il livello plasmatico di tacrolimus nel gruppo di studio era sub-terapeutico al di sotto di 5 ng/ml.

Per quello che riguarda invece i livelli plasmatici di everolimus, dopo la sua introduzione in terapia in 7 giornata post-trapianto, il livello terapeutico è stato comunque raggiunto all'*end-point* primario 3 mesi dopo il trapianto e mantenuto nel *follow-up* a 6 mesi (Figura 2).

All'*end-point* primario (90 giorni post-trapianto) si sono verificati 5 perdite del *graft* (2 nel gruppo di studio) e 4 decessi (2 nel gruppo di studio).

L'incidenza di rigetto acuto comprovato da biopsia epatica è stata del 15% nel gruppo di studio e dell'8% nel gruppo controllo risultando comunque inferiore al 25% entro i 3 mesi dal trapianto (Figura 3).

Undici pazienti sono usciti dalla studio prima dell'*end-point* primario a tre mesi. Le cause di uscita dei pazienti sono riportate nella Tabella 3.

Per quello che riguarda gli *end-points* secondari il *weaning* del tacrolimus nel gruppo di studio è stato possibile in 23 pazienti su 54 (43%) entro 1 mese dal trapianto. La *Clearance* della creatinina calcolata con il metodo MDRD è riportata nella Figura 4 che dimostra sostanzialmente una sovrapposizione di funzionalità renale tra i due gruppi con una tendenza al miglioramento nel gruppo di studio a partire dal 1 mese post-trapianto.

In totale 104 pazienti hanno avuto nel corso dello studio almeno un evento avverso segnalato; 44 (67%) nel gruppo di studio e 24 (23%) nel gruppo controllo ( $p=0.8309$ ); il numero medio di eventi avversi per paziente è riportato nella Figura 5 che non dimostra una differenza statisticamente significativa tra i due gruppi. I tipi di eventi avversi verificatesi nei due gruppi sono riportati nella Tabella 4 da cui si evince come dato significativo una maggior incidenza di infezioni nel gruppo controllo rispetto a quello di studio ( $p=0.0027$ ).

## CAPITOLO 4

### DISCUSSIONE E REVISIONE DELLA LETTERATURA

I PSI (sirolimus, everolimus) non sono approvati per l'uso clinico nel trapianto di fegato e, per quanto riguarda everolimus, gli studi clinici di fase III, per valutarne l'efficacia e la tollerabilità in confronto alla terapia *standard* a fini registrativi, sono ad oggi ancora in corso. Esistono, tuttavia, numerose evidenze scientifiche dell'efficacia e tollerabilità dei PSI nel trapianto di fegato che ne supportano l'impiego per le quali la Legge 648 ne ha esteso l'uso in questa indicazione.

Il profilo farmacologico e lo specifico meccanismo d'azione di everolimus che lo differenzia sia dai CNI (tacrolimus, ciclosporina) sia dagli inibitori della sintesi del DNA (acido micofenolico – MPA e azatioprina) risultano, infatti, essere particolarmente interessanti nel trapianto di fegato. In particolare, le proprietà antiproliferative di everolimus e la possibilità di ridurre drasticamente le dosi di CNI o addirittura di eliminarli, potrebbero consentire anche di allargare gli obiettivi terapeutici per gestire altre problematiche, oltre la prevenzione del rigetto acuto, quali: la recidiva di epatocarcinoma (HCC), le neoplasie, soprattutto cutanee (NMSC- Non Melanoma Skin Cancer), la tossicità da CNI (nefrotossicità). Everolimus consentirebbe perciò al clinico di ampliare la possibilità di personalizzare le terapie immunosoppressive, in considerazione degli obiettivi terapeutici sopraindicati.

In quest'ottica gli esperti hanno ipotizzato due principali strategie per lo studio e l'impiego di everolimus: la prima è rappresentata dall'impiego di everolimus come terapia immunosoppressiva di prima scelta da intraprendere nella fase precoce dopo trapianto di fegato

(0-3 mesi) per la prevenzione delle complicanze a lungo termine (disfunzione renale cronica – CRD, neoplasie, recidiva di HCC). La seconda è rappresentata dall'impiego di everolimus per gestire situazioni problematiche che insorgono durante la fase di mantenimento e presenti in una elevata proporzione di pazienti quali: le recidive di HCC, le neoplasie post-trapianto, l'insufficienza renale, prevedendo così una terapia di “salvataggio”. L'inibizione dell'mTOR è cruciale, infatti, per contrastare queste complicanze, soprattutto quelle causate da un uso prolungato di CNI come tossicità renale, neoplasie, disfunzioni metaboliche e neurotossicità.

#### **4.1 EVIDENZE SCIENTIFICHE E RACCOMANDAZIONI PRATICHE PER L'USO DI EVEROLIMUS COME FARMACO DI PRIMA SCELTA NEL TRAPIANTO DI FEGATO**

Il primo studio randomizzato controllato condotto su everolimus nel OLT de novo<sup>4</sup> ha valutato la sicurezza, la tollerabilità e l'efficacia di everolimus, somministrato entro 48 ore dalla riperfusione del *graft*. In questo studio di fase II, controllo vs placebo, per identificare la dose più efficace e sicura, everolimus veniva somministrato alle dosi di 1, 2 e 4 mg/die in associazione a CsA in microemulsione (Sandimmun ® Neoral®) a dose standard e corticosteroidi. L'efficacia del trattamento, valutata come prevenzione del rigetto confermato istologicamente (BPAR), era clinicamente evidente solo nei gruppi che avevano ricevuto 2 o 4 mg/die di everolimus, mentre, la percentuale di interruzioni del trattamento per eventi avversi aumentava in modo dose-dipendente (67% con la dose di 4mg/die). Per quanto riguarda la funzione renale anche in questo

studio, come quelli condotti nel trapianto di rene e di cuore, l'associazione everolimus-CsA a dosi standard ha determinato un'alterazione della funzione renale, per cui si conferma la necessità di ridurre drasticamente e il più precocemente possibile, i livelli ematici di CNI.

Per quanto riguarda la trombosi dell'arteria epatica, l'incidenza risultava identica nei due gruppi, a differenza di quanto si osservava in uno studio condotto con sirolimus, dove risultava aumentata nel gruppo con sirolimus rispetto al gruppo controllo, a causa della quale lo studio è stato interrotto<sup>25</sup>.

Un altro studio randomizzato controllato è stato condotto presso il Centro di trapianti di fegato di Modena in cui si è confrontato everolimus in monoterapia (gruppo attivo) vs CsA (gruppo controllo) in 78 riceventi di trapianto di fegato *de novo*. Tutti i pazienti del gruppo attivo hanno iniziato everolimus a partire dal 10° giorno post-trapianto, allo scopo di ridurre il rischio di complicanze della ferita chirurgica, in associazione a CsA, sospesa dal 30° giorno post-trapianto. Mentre nel gruppo di controllo il trattamento con CsA continua fino al 12° mese. Tutti i pazienti hanno ricevuto un'induzione con basiliximab e corticosteroidi che sono stati interrotti entro 5 settimane dal trapianto. Obiettivo primario dello studio era dimostrare una migliore funzionalità renale nel gruppo everolimus rispetto al gruppo CsA a 12 mesi.

La funzionalità renale (valutata in termini di GFR con formula MDRD) era significativamente migliore nel gruppo everolimus, sia a 6 (+29.6ml/min) che a 12 mesi (+27.7ml/min), e una percentuale significativamente inferiore di pazienti (15.4 vs 52.2;p=0.005) sviluppava una malattia renale cronica – CKD di grado  $\geq 3$  (corrispondente ad una GFR <60ml/min)<sup>21</sup>. La sopravvivenza del paziente a 12 mesi era sovrapponibile nei due gruppi (85.3 vs 82.4%), così come la probabilità di sviluppare un rigetto confermato istologicamente.

Nel gruppo everolimus si è osservato un'incidenza maggiore di problemi a livello di ferita, soprattutto di laparocele, anche tardivo (46.1 vs 26.9%), anche se non statisticamente significativa.

Questo è il primo studio nel trapianto di fegato che ha dimostrato da una parte che l'interruzione precoce di CNI consente un netto miglioramento della funzionalità renale, una riduzione del rischio di sviluppare un'insufficienza renale cronica, e dall'altra che everolimus in monoterapia a partire dal 30°giorno post-OLT fornisce una immunosoppressione adeguata e non inferiore a quella ottenibile con CsA. Per quanto riguarda le complicanze della ferita chirurgica, in attesa anche dei altri *trials* controllati, per poter identificare quale sia il momento ottimale per introdurre l'everolimus, gli esperti concordano che introdurre everolimus entro le prime due settimane dopo il trapianto possono esporre il paziente ad ulteriori complicanze, in particolare ad una non corretta cicatrizzazione della ferita, soprattutto nei pazienti con fattori predisponenti, quali elevato BMI, diabete grave, uso di corticosteroidi e età avanzata.

Le esperienze relative all'uso di everolimus (1,5-2 mg bid) nel trapianto *de novo* senza CNI e in associazione a MPA e steroidi ad oggi sono limitate a pazienti con neoplasie o controindicazioni assolute ai CNI. In un piccolo studio recentemente presentato come *abstract* su 12 pazienti, 8 pazienti (66.7%) hanno continuato la terapia con everolimus ed MPA, in questo caso MMF, fino a 4-20 mesi dal trapianto con concentrazioni ematiche di everolimus comprese tra 4.5 e 7.1ng/ml<sup>22</sup>.

In sintesi, gli studi in cui l'everolimus viene valutato come farmaco di prima scelta nell'ambito del protocollo iniziale di trattamento del paziente dopo trapianto, forniscono tre messaggi principali:

- Everolimus possiede una buona efficacia antirigetto;

- l'utilizzo del farmaco necessita dell'aggiustamento delle dosi in base al monitoraggio delle concentrazioni ematiche (TDM);
- l'interazione farmacocinetica e farmacodinamica con CsA rende assolutamente necessaria e nello stesso tempo vantaggiosa un'importante e precoce riduzione dei dosaggi dei CNI, tale da mantenere livelli C<sub>0</sub> pari a circa 50ng/ml per CsA e 3ng/ml per tacrolimus. Quest'ultima caratteristica potrebbe ridurre nel lungo termine gli effetti tossici dei CNI, in particolare sulla funzione renale.

In base ai dati di letteratura e alle esperienze personali si possono evidenziare, quindi, due modalità di impiego di everolimus subito dopo trapianto: in associazione a CNI a basse dosi o in monoterapia in associazione ad MPA, in pazienti selezionati.

#### **4.1.1 EVEROLIMUS IN CASO D'INSUFFICIENZA RENALE AL MOMENTO DEL TRAPIANTO**

In presenza di insufficienza renale moderata ( $30 < \text{GFR} < 60 \text{ml/min}$ ) o grave ( $15 < \text{GFR} < 30 \text{ml/min}$ )<sup>21</sup> durante l'impiego dei CNI, una strategia di minimizzazione o eliminazione dei CNI è una strada obbligata. Everolimus in questi casi può rappresentare una valida opzione in quanto è dotato di un'adeguata azione immunosoppressiva tale da consentire di controllare l'evento immunologico anche quando è associato a dosi minime dei CNI o, in casi selezionati, in un regime senza CNI. In questi casi è suggerito l'impiego di una terapia di induzione, soprattutto in casi di eliminazione del CNI. Everolimus è da preferirsi ad un MPA in quanto questi farmaci sono spesso mal tollerati agli alti dosaggi necessari nei primi mesi dopo trapianto, soprattutto nel caso in cui si debba implementare una strategia di

minimizzazione/eliminazione dei CNI precocemente, come in caso di pazienti con alterata funzione renale al trapianto o nell'immediato post-trapianto.

Bisogna però tener presente che, pur senza interferire direttamente con la formazione del filtrato glomerulare, i PSI possono indurre proteinuria, spesso transitoria e di lieve entità. In presenza di una normale funzione renale questo effetto non rappresenta un problema di rilevanza clinica mentre in casi di disfunzione renale moderata o grave con proteinuria già presente (>800mg/die) un eventuale ulteriore aumento della proteinuria indotto da un PSI potrebbe peggiorare la funzione renale. Un eccessivo riassorbimento di proteine nel tubulo prossimale causato da alti valori di proteinuria infatti, stimola il rilascio nell'interstizio di citochine e di fattori di accrescimento che attraggono ed attivano i fibroblasti con aumentata sintesi di matrice extracellulare e sviluppo di fibrosi interstiziale<sup>24</sup>. La proteinuria può in parte essere limitata dall'assunzione di ACE inibitori o di inibitori del sistema renina-angiotensina II. Questi ultimi potrebbero essere preferibili in considerazione del possibile rischio di angioedema segnalato in pazienti che assumono contemporaneamente ACE inibitori ed everolimus, soprattutto se non associati a steroidi<sup>25</sup>, nei pazienti trapiantati di cuore.

#### **4.1.2 PAZIENTI CON EPATOCARCINOMA (HCC) QUALE INDICAZIONE AL TRAPIANTO E PAZIENTI AD ELEVATO RISCHIO NEOPLASTICO POST-TRAPIANTO**

Il 44% dei trapiantati di fegato ha come indicazione l'HCC, ma si prevede che nei prossimi 10 anni questa percentuale sia destinata ad aumentare oltre il 50%, soprattutto per le epatopatie alcoliche che sono ad alto rischio di epatocarcinoma. Nei soggetti con HCC (soprattutto in quelli che non rientrano nei criteri di Milano), inoltre, la recidiva post-trapianto è frequente, in quanto

l'immunosoppressione necessaria per evitare il rigetto dell'organo trapiantato inibisce i meccanismi di difesa immunologica contro le cellule neoplastiche.

I destinatari di un trapianto d'organo, in generale, sono particolarmente esposti al rischio di sviluppare neoplasie, sia per la terapia immunosoppressive assunte sia per l'età sempre più avanzata del donatore e del ricevente. Esistono forti premesse per l'utilizzo di everolimus in questi pazienti in quanto i PSI sono dotati della capacità di inibire la trasduzione del segnale intracellulare coinvolta nella propagazione di stimoli proliferativi, nonché di ridurre l'angiogenesi attraverso l'inibizione del VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*). Everolimus in un regime a bassissime dosi di CNI o senza CNI potrebbe, perciò, essere una valida scelta terapeutica per la prevenzione delle neoplasie in pazienti a rischio o con storia di tumori. L'attività antineoplastica di everolimus è stata dimostrata in vitro in molte tipologie di neoplasie (carcinoma pancreatico, carcinoma prostatico, carcinoma mammario, leucemia mieloide cronica, tumori neuroendocrini)<sup>22-25</sup> per le quali è ora in fase di sviluppo in ambito oncologico dove everolimus è stato recentemente approvato per il trattamento del carcinoma renale avanzato con il nome di Afinitor®. Vi sono, inoltre, dati di studi nei pazienti trapiantati in cui si evidenzia che i PSI consentono la regressione del sarcoma di Kaposi<sup>12</sup>, delle neoplasie cutanee non melanoma (NMSC)<sup>20</sup>, a loro volta potenziali fattori di rischio per lo sviluppo di alcuni tumori solidi<sup>21</sup>, e che i PSI riducono l'incidenza delle malattie linfoproliferative post-trapianto (PTLD)<sup>12-13</sup>, alle stesse dosi necessarie per assicurare l'efficacia immunosoppressiva. Inoltre, considerando il ruolo riconosciuto dei CNI e degli antimetaboliti (in particolare l'azatioprina e l'MMF)<sup>24</sup> nel favorire, in generale lo sviluppo di neoplasie e, in particolare per la recidiva dell'epatocarcinoma, è giustificato l'impiego di everolimus per consentire un regime senza i CNI. Inoltre, in tutti i pazienti con neoplasie o ad alto rischio di svilupparle dopo il trapianto, quali fumatori, obesi,

alcolisti, soggetti con anamnesi neoplastica pregressa o familiarità neoplastica, everolimus dovrebbe essere considerato come terapia di elezione, in particolar modo nell'HCC, viste le caratteristiche farmacologiche e le prospettive terapeutiche che lo rendono un'opzione potenzialmente migliore rispetto a quelle attualmente disponibili. In questi casi anche se al momento attuale l'efficacia nella prevenzione delle recidive di HCC non è ancora documentata da adeguate evidenze scientifiche derivate da studi clinici controllati, la maggior parte dei partecipanti ritiene utile l'impiego dell'everolimus in questi pazienti, soprattutto in presenza di fattori di rischio (satellitosi, invasione micro vascolare, *grading* avanzato, aspetto multinodulare) anche se dovrebbero essere ben identificati e standardizzati.

In tutti i casi però, la gestione del paziente trapiantato neoplastico richiede una collaborazione integrata tra i diversi specialisti del trapianto, gli oncologi e i chirurghi generali per una scelta terapeutica ottimale.

#### **4.1.3 ALTRE POTENZIALI INDICAZIONI**

L'utilizzo di everolimus in un protocollo con minimizzazione o interruzione definitiva dei CNI potrebbe essere opportuno anche nei seguenti casi:

- pazienti potenzialmente a rischio di complicanze post-trapianto CNI- dipendenti (neurologiche, gastrointestinali, neoplastiche, cardiovascolari, in particolare ipertensione);
- pazienti HCV positivi in cui solitamente il danno renale è più precoce e di maggiore entità rispetto a quanto osservato nei soggetti non infetti. Va, tuttavia, sottolineato che se da un lato l'azione antifibrotica dei PSI potrebbe rallentare lo sviluppo di cirrosi dall'altra l'effetto di everolimus sulla replicazione del virus HCV e sullo sviluppo di cirrosi ad esso correlata non è ancora del tutto chiarito<sup>18,24</sup>;

- pazienti con policistosi epatorenale in cui everolimus potrebbe avere un ruolo essendo potenzialmente in grado di inibire la progressione delle cisti in caso di malattia policistica<sup>20</sup>. Questa indicazione va considerata ancora con cautela in quanto sono stati segnalati alcuni casi di ascite e di pleurite che hanno richiesto la sospensione del PSI.

## **4.2 GESTIONE DEGLI EVENTI AVVERSI**

Sia gli studi randomizzati e controllati che l'esperienza clinica hanno messo in luce alcuni effetti collaterali legati alla terapia con everolimus, caratteristici di questa classe di farmaci. Nel complesso la sicurezza del farmaco è paragonabile a quella degli altri immunosoppressori, ma è importante conoscere le caratteristiche farmacocinetiche e farmacodinamiche di everolimus per gestire appropriatamente questi eventi avversi ed evitare così di sospendere il farmaco, se non in quei casi in cui essi diventano particolarmente gravi e non responsivi agli appropriati interventi terapeutici.

### **4.2.1 ALTERAZIONE DELLA FUNZIONE RENALE**

Pur senza interferire direttamente con la formazione del filtrato glomerulare, i PSI possono indurre proteinuria. In presenza di una normale funzione renale questo effetto non rappresenta un problema di rilevanza clinica, mentre in casi di disfunzione renale soprattutto se grave ( $15 < \text{GFR} < 30 \text{ml/min}$ ) con proteinuria già presente, un eventuale ulteriore aumento della

proteinuria indotto da everolimus potrebbe peggiorare la funzione renale<sup>14</sup>. La proteinuria può in parte essere limitata dall'assunzione di ACE inibitori o di inibitori recettoriali dell'angiotensina<sup>15</sup>. È stato ampiamente riconosciuto che questo problema non è legato ad una nefrotossicità diretta di everolimus, ma ad un'amplificazione dell'effetto nefrotossico dei CNI, quando questi sono mantenuti a dosi piene.

#### **4.2.2 EDEMA PERIFERICO/EDEMI DECLIVI**

Sono stati osservati edema palpebrale bilaterale, edema degli arti inferiori e superiori, ad insorgenza anche tardiva, verosimilmente secondari a ridotto riassorbimento linfatico. L'entità e la tempistica di insorgenza degli edemi è estremamente variabile: da una lieve succulenza pretibiale nella maggior parte dei casi, fino ad alcuni casi di severo edema bilaterale che rende difficoltosa la deambulazione (5-10% di casi). Il fenomeno può insorgere anche dopo molto tempo dall'inizio di everolimus e in circa il 60% dei casi è spontaneamente reversibile. Alcuni partecipanti riferiscono che spesso gli edemi agli arti erano legati ad elevati livelli ematici di everolimus nel mantenimento. Quando la riduzione della dose di everolimus e/o la terapia diuretica non hanno effetto, il linfo-drenaggio e la ripresa del tono muscolare possono facilitare la regressione dell'edema. In rari casi è indispensabile la sospensione del trattamento con everolimus. Bisogna tener presente che l'insufficienza renale, così come gli ACE inibitori, i calcioantagonisti e i FANS, favoriscono l'edema declive degli arti inferiori. In questi casi il trattamento dell'edema può giovare della sospensione definitiva di questi farmaci.

#### **4.2.3. COMPLICANZE DELLA FERITA CHIRURGICA NEL POST-TRAPIANTO**

Questi eventi sono da ricondurre al meccanismo antiproliferativo dei PSI. La comparsa di questa complicanza sembra correlata ad una dose iniziale particolarmente elevata, come solitamente avviene con sirolimus che richiede una dose di carico<sup>18</sup>. Può essere opportuno, quindi, somministrare inizialmente una dose più bassa di everolimus, da aumentare gradualmente fino al raggiungimento dei livelli desiderati nell'ambito dei livelli *target*, nel caso si renda necessario usare everolimus sin dai primissimi giorni dopo trapianto. Alcune categorie di pazienti, inoltre, sono particolarmente esposti a queste complicanze, come i pazienti obesi, diabetici e/o anziani. La complicanza può essere evitata o ridotta, quindi, con un'attenta selezione dei pazienti, con l'utilizzo di adeguate tecniche chirurgiche (ad esempio prolungando il tempo di permanenza dei punti non riassorbibili oppure iniziando everolimus solo dopo che la ferita chirurgica è cicatrizzata e le suture cutanee sono state rimosse).

#### **4.2.4. CEFALIEE (ASSOCIATE A NAUSEA E VOMITO)**

Sono stati riportati vari casi di cefalee intense, spesso associate a nausea e/o vomito, non correlate a ipertensione arteriosa. Questi eventi si sono risolti con la sospensione temporanea di everolimus e la reintroduzione successiva a bassa dose con graduale aumento.

#### **4.2.5 LEUCOPENIE E PIASTRINOPENIE**

L'impatto dei PSI sulla crasi ematica (leucociti/piastrine) è modesta: un'eventuale diminuzione della conta leucocitaria può essere gestita nella maggior parte dei casi con riduzione della dose e solo raramente con l'interruzione del trattamento. Cautela va usata, invece, in caso di

associazione con MPA, farmaco con dimostrata azione leucopenizzante, e nei pazienti che presentino prima della conversione disturbi significativi della crasi ematica e nei pazienti con recidiva di epatite C in trattamento con ribavirina e interferone.

#### **4.2.6. IPERLIPIDEMIA**

È stato dimostrato che il trattamento con everolimus induce dislipidemia, in particolare ipertrigliceridemia che è dose-dipendente e correlata ai livelli plasmatici di everolimus, a differenza dell'ipercolesterolemia. L'effetto è più evidente nei primi mesi dall'inizio della terapia con everolimus e nella maggior parte dei casi si stabilizza intorno ai livelli basali<sup>23</sup>. La dislipidemia indotta da PSI sembra causata da un'aumentata secrezione epatica di VLDL e sintesi epatica di apoB100, accanto ad una riduzione del catabolismo epatico di LDL; inoltre, risulta ridotta l'attività dell'enzima lipoproteinlipasi e aumentata l'espressione delle apoC III e della lipasi del tessuto adiposo<sup>24</sup>.

Bisogna tener presente, inoltre, che le terapie concomitanti immunosoppressive (CsA, steroidi) hanno anch'esse un ruolo importante nello sviluppo delle iperlipidemie. È interessante a questo punto valutare l'effetto dislipidemico in rapporto all'effetto cardioprotettivo di everolimus che sembrerebbero in contraddizione. Lo studio B253<sup>25</sup> nel trapianto di cuore ha dimostrato infatti che con everolimus gli eventi cardiovascolari maggiori (MACE) sono significativamente inferiori rispetto al braccio di controllo a 4 anni dal trapianto. Diverse ipotesi possono essere formulate a tal proposito. Dati clinici mostrano che se il trattamento con everolimus determina un aumento della colesterolemia (da 190 a 240mg/dl), la maggior parte di questo aumento è dovuto ad un aumento dei valori di colesterolo HDL<sup>16</sup>.

Il trattamento con everolimus sembra quindi non influenzare negativamente il rapporto colesterolo totale/HDL che è un indice di protezione del rischio cardiovascolare<sup>17</sup>. Studi sperimentali forniscono ulteriori dati in grado di risolvere questa apparente contraddizione. Si è infatti osservato che in vitro everolimus può favorire la fuoriuscita di colesterolo dai macrofagi, responsabile dell'instabilità della placca aterosclerotica. Infine in un modello di coniglio iperlipidemico, il trattamento con everolimus non ha innalzato ulteriormente le concentrazioni plasmatiche di colesterolo ed è stato in grado di ridurre la progressione di iperplasia intimale carotidea e di provocare la quasi scomparsa dei macrofagi nella placca rispetto al gruppo di controllo<sup>15</sup>. Inoltre, l'effetto antiproliferativo di everolimus in colture di cellule muscolari lisce di ratto, è amplificato di 10-30 volte dalla aggiunta di statine al terreno di coltura<sup>14</sup>. Quindi l'effetto sui macrofagi, associato alle proprietà antiproliferative dirette, potrebbero bilanciare verso un meccanismo di protezione vascolare l'effetto dislipidemico di everolimus. Queste ipotesi dovranno tuttavia essere confermate da studi clinici.

Nei pazienti a rischio di malattie cardiovascolari, si suggerisce, unitamente alle prescrizioni dietetiche la somministrazione di una statina (fluvastatina o pravastatina in quanto non hanno interazioni farmacocinetiche con everolimus) e, nei casi non responsivi, ezetimibe, mentre gli acidi grassi Omega3 ad alte dosi potrebbero aumentare il controllo dei trigliceridi. Per quanto riguarda i fibrati è opportuno segnalare cautela in presenza di CNI e disfunzione renale in quanto potrebbero peggiorare la funzione renale.

### 4.3 MONITORAGGIO DEI LIVELLI EMATICI DI EVEROLIMUS

La misurazione dei livelli ematici di farmaco (TDM) è fondamentale per individuare la dose più efficace e/o per evitare effetti tossici. Il metodo di riferimento, con il quale è stato identificato il *range* terapeutico indicato in scheda tecnica, è la cromatografia liquida ad alta risoluzione (HPLC), abbinata alla spettrometria di massa (LC/MS), tuttavia, il metodo più utilizzato per il monitoraggio terapeutico di everolimus è di tipo immunoenzimatico e il più diffuso è il *kit* di monitoraggio a fluorescenza polarizzata (FPIA).

Il dosaggio ottimale di farmaco deve permettere di raggiungere livelli ematici pre-dose ( $C_0$ )  $\geq 3$  ng/ml, con metodo cromatografico (HPLC), corrispondenti a 5 ng/ml se il metodo impiegato è immunoenzimatico, in quanto questo metodo tende a sovrastimare di circa il 20% i valori rispetto all'HPLC, poiché vengono rilevati anche metaboliti dell'everolimus<sup>18-19</sup>.

La dose di everolimus può richiedere delle modifiche in base alla tollerabilità, alla risposta individuale, al quadro clinico e alle terapie concomitanti interferenti con il metabolismo di everolimus: ogni aggiustamento del dosaggio deve essere basato sui valori di  $C_0$  ottenuti 4-5 giorni dopo l'inizio della terapia o dopo il precedente cambiamento della dose, per permettere il raggiungimento dello stato stazionario. In assenza di variazioni delle condizioni iniziali o di alterazioni della funzione epatica moderata-grave, le misurazioni possono essere meno frequenti col passare del tempo poiché la cinetica del farmaco è stabile<sup>2</sup>.

## CAPITOLO 5

### CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

In base alla nostra esperienza, a quella dei partecipanti a questo studio multicentrico e alla revisione della letteratura disponibile, emerge che everolimus per la sua efficacia immunosoppressiva e per il suo peculiare meccanismo d'azione potrebbe rappresentare una valida opzione terapeutica per attuare strategie atte a superare la semplice “prevenzione del rigetto”. Secondo gli esperti, infatti, il rigetto acuto oggi non rappresenta più il problema rilevante nella gestione del paziente trapiantato di fegato, in quanto l'armamentario terapeutico a disposizione ne permette una gestione soddisfacente.

Vista l'aumentata sopravvivenza dei pazienti, diventa invece attualmente più rilevante per i centri avere a disposizione nuovi farmaci per affrontare altre problematiche che impattano negativamente sugli esiti a lungo termine del trapianto di fegato, quali le recidive di HCC, le malattie cardiovascolari, l'insorgenza di neoplasie post-trapianto, le alterazioni della funzione renale, le infezioni, per la gestione delle quali, everolimus potrebbe essere un farmaco potenzialmente utile, visti i benefici legati alla sua attività antiproliferativa, oltre che immunosoppressiva.

Everolimus permette, inoltre, di attuare strategie di minimizzazione/eliminazione dei CNI con vantaggi, non solo in termini di funzionalità renale, ma anche di problematiche dismetaboliche (ipertensione, diabete, iperlipidemia) e di neoplasie ad essi associate.

Sul versante della sicurezza gli effetti collaterali di everolimus sono ben noti e in gran parte facilmente gestibili. Partendo da una personalizzazione delle modalità di inizio della terapia in

base alle caratteristiche dei pazienti (BMI, patologie concomitanti, età, etc), con un accurato monitoraggio dei livelli plasmatici di everolimus ed un'attenta valutazione dell'interazione con la CsA e/o altri farmaci, è possibile ottimizzare l'uso di everolimus.

Inoltre, fattori limitanti l'uso dei PSI nel passato sono stati oggi superati con everolimus, grazie soprattutto ad un diverso profilo farmacocinetico che ne determina una maggiore maneggevolezza e una più facile gestione degli effetti collaterali rispetto a sirolimus.

In conclusione, sulla base dei risultati preliminari di questo studio multicentrico e sulla revisione della letteratura scientifica relativa ad everolimus nel trapianto di fegato, possiamo affermare che l'utilizzo di everolimus rappresenta una valida alternativa terapeutica ai tradizionali inibitori delle calcineurine sia in monoterapia che in associazione con essi, non solo nella prevenzione del rigetto acuto, ma anche e soprattutto nella gestione a lungo termine della terapia cronica del trapiantato e dei suoi molteplici effetti collaterali.

## **Ringraziamenti**

I risultati ad interim di questa tesi appartengono allo studio multicentrico Italiano denominato “EPOCAL” proposto dal Centro Trapianti di Fegato di Padova (Principal Investigator prof. Umberto Cillo). I Centri trapianto di fegato che hanno partecipato sono:

1. Padova
2. Udine
3. Roma Gemelli,
4. Torino,
5. Bergamo,
6. Milano Policlinico,
7. Milano Niguarda

Il centro di Udine nello specifico ha partecipato a questo studio arruolando 12 pazienti. I risultati ad interim qui presentati sono stati gentilmente concessi dal Principal Investigator con lo scopo specifico di stesura della presente tesi di Dottorato di Ricerca e non potranno essere pubblicati altrimenti se non dal Principal Investigator.

## BIBLIOGRAFIA

1. Calne RY. Immunosuppression in liver transplantation. *NEJM* 1994; 331: 1154.
2. Ojo A. Renal disease in recipients of nonrenal solid organ transplantation. *Semin Nephrol* 2007; 27: 498.
3. Bechstein WO. Neurotoxicity of calcineurin inhibitors: impact and clinical management. *Transpl Int* 2000; 13: 313.
4. Mells G, Neuberger J. Reducing the risk of cardiovascular disease in liver allograft recipients. *Transplantation* 2007; 83: 1141.
5. Marchetti P. New-onset diabetes mellitus after liver transplantation: from pathogenesis to management. *Liver Transpl* 2005; 11: 612.
6. Guerra G, Srinivas TR, Meier-Kriesche HU. Calcineurininhibitor free immunosuppression in kidney transplantation. *Transpl Int* 2005; 20: 813.
7. Hirose R, Vincenti F. Immunosuppression: today, tomorrow, and withdrawal. *Semin Liver Dis* 2006; 26: 201.
8. Hirose R, Roberts JP, Quan D, et al. Experience with daclizumab in liver transplantation: renal transplant dosing without calcineurin inhibitors is insufficient to prevent acute rejection in liver transplantation. *Transplantation* 2000; 69: 307.
9. Chang GJ, Mahanty HD, Quan D, et al. Experience with the use of sirolimus in liver transplantation-use in patients for whom calcineurin inhibitors are contraindicated. *Liver Transpl* 2000; 6: 734.
10. Cotterell AH, Fisher RA, King AL, et al. Calcineurin inhibitor- induced chronic

nephrotoxicity in liver transplant

patients is reversible using rapamycin as the primary immunosuppressive agent. *Clin Transplant* 2002; 16(Suppl. 7): 49.

11. Kniepeiss D, Iberer F, Grasser B, Schaffellner S, Tscheliessnig KH. Sirolimus and mycophenolate mofetil after liver transplantation. *Transpl Int* 2003; 16: 504.

12. Yang YJ, Li LX, He Q, et al. Sirolimus as primary immunosuppressant for calcineurin inhibitor-related insufficiency after liver transplantation. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2007; 6: 376.

13. Shenoy S, Hardinger KL, Crippin J, et al. Sirolimus conversion in liver transplant recipient with renal dysfunction: a prospective, randomized, single-center trial. *Transplantation* 2007; 83: 1389.

14. Morard I, Dumortier J, Spahr L, et al. Conversion to sirolimus-based immunosuppression in maintenance liver transplantation patients. *Liver Transpl* 2007; 13: 658.

15. Cejas N, Casciato P, Descalzi V, et al. Conversion from calcineurin inhibitors (CNIs) to sirolimus (SRL) immunosuppression is beneficial in liver transplant (LT) recipients with renal dysfunction (RD) [abstract]. *Liver Transpl* 2007; 13(Suppl. 1): 113.

16. Watson CJ, Gimson AE, Alexander GJ, et al. A randomized controlled trial of late conversion from calcineurin inhibitor (CNI)-based to sirolimus-based immunosuppression in liver transplant recipients with impaired renal function. *Liver Transpl* 2007; 13: 1694.

17. Neuhaus P, Klupp J, Langrehr JM. mTOR inhibitors: An overview. *Liver Transpl* 2001; 7: 473.

18. Schuler W, Sedrani R, Cottens S, et al. SDZ RAD, a new rapamycin derivative:

- Pharmacological properties in vitro and in vivo. *Transplantation* 1997; 64: 36.
19. Schuurman HJ, Cottens S, Fuchs S, et al. SDZ RAD, a new rapamycin derivative: Synergism with cyclosporine. *Transplantation* 1997; 64: 32.
  20. Bohler T, Waiser J, Budde K, et al. The in vivo effect of rapamycin derivative SDZ RAD on lymphocyte proliferation. *Transplant Proc* 1998; 30: 2195.
  21. Schuurman HJ, Cottens S, Fuchs S, et al. SDZ RAD, a new rapamycin derivative: synergism with cyclosporine. *Transplantation* 1997; 64: 32.
  22. Hausen B, Boeke K, Berry GJ, Segarra IT, Christians U, Morris RE. Suppression of acute rejection in allogenic rat transplantation: a study of the efficacy and pharmacokinetics of rapamycine derivative (SDZ RAD) used alone and in combination with a microemulsion formulation of cyslosporine. *J Heart Lung Transplant* 1999; 18: 150.
  23. Levy GA, Grant D, Paradis K, Campestrini J, Smith T, Kovarik JM. Pharmacokinetics and tolerability of 40-0[2- hydroxyethyl]rapamycin in de novo liver transplant recipients. *Transplantation* 2001; 71: 160.
  24. Levy G, Schmidli H, Punch J, et al. Safety, tolerability, and efficacy of everolimus in de novo liver transplant recipients: 12- and 36-month results. *Liver Transpl* 2006; 12: 1640
  25. Paolo De Simone, Paola Carrai, Arianna Precisi, et al. Conversion to everolimus monotherapy in maintenance liver transplantation: feasibility, safety, and impact on renal function *Transplant International* 22 (2009) 279–286
  26. Dantal J, Souillou JP. Immunosuppressive drugs and the risk of cancer after organ transplantation. *N Engl J Med* 2005; 352: 1371
  27. Hojo M, Morimoto T, Maluccio M, et al. Cyclosporine induces cancer progression by a cell-autonomous mechanism. *Nature* 1999; 397: 530.

28. Maluccio M, Sharma V, Lagman M, et al. Tacrolimus enhances transforming growth factor-B1 expression and promotes tumor progression. *Transplantation* 2003; 76: 597.
29. Jonas S, Bechstein WO, Rayes N, et al. Posttransplant malignancy and newer immunosuppressive protocols after liver transplantation. *Transplant Proc* 1996; 28: 3246.
30. Luan FL, Ding R, Sharma VK, et al. Rapamycin is an effective inhibitor of human renal cancer metastasis. *Kidney Int* 2003; 63: 917.

## FIGURE E TABELLE

	Screening (12 to 1 week prior to day -1)	Enrollment/ Randomizat ion (POD 7)	WK2 (X2)	WK3 (X2)	WK4 (X2)	M(3-6-12- 24)
Physical exam <sup>1</sup>	X	X	X	X	X	X
Blood and urine tests <sup>2</sup>	X	X	X	X	X	X
Microbiologic al samples <sup>3</sup>	X	X	X	X	X	Only CMV status
Biopsy		See below	See below	See below	See below	See below
Informed consent	X					

**Tabella 1. Plannig visite**

**Legenda:**

<sup>1</sup> Esame obiettivo completo, misurazione della pressione sanguigna omerale, frequenza cardiaca, temperatura corporea, peso, altezza.

<sup>2</sup>:WBC, RBC, Hb, Ht, PLTs, PCR, PT, PTT, glicemia, urea, creatinina, Na, K, Ca, Cl, Magnesio, AST, ALT, LAD, ALP, gGT, Bil T/D, amilasi, proteine totali, Clearance creatinina secondo *Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) Study equation*, esame urine con proteinuria ed emoglobina glicosilata, profilo lipidico (colesterolo, trigliceridi, HDL, LDL).

<sup>3</sup>:da sangue, urine, liquido di drenaggio (nel periodo post-operatorio), ferita (nel periodo post-operatorio), BAL (se intubato o con sospetto per infezione vie aeree), CMV.

<b>VARIABLES</b>	<b>Study group (N=66)</b>	<b>Control group (N=38)</b>
Age (years)	54 (21–67)	59 (40–69)
Sex (female)	17%	18%
Body Mass Index	26 (18-32)	26 (19/34)
Main indication to LT		
Viral	23%	22%
Alcohol	19%	22%
HCC	45%	44%
Other	6%	8%
HCV positive	46%	47%
HBV positive	21%	23%
Biochemistry		
Hb	108 (76-161)	113 (61-161)
Plt	71 (14-320)	69 (21-282)
glucose	103 (61-293)	106 (61-198)
creatinine	0.88 (0.44-2.08)	0.90 (0.59-1.83)
albumine	32 (18-45)	32 (25-44)
total bilirubin	2.8 (0.3-33.7)	3.0 (0.5-30.1)
INR	1.31(1.04-2.64)	1.47 (1.00-2.67)
MDRD	87.8 (34.4-213.1)	80.0 (47.4-140.6)
CPT score	8 (5–13)	8 (5–13)
MELD score	17 (6–38)	19 (8–43)
Donor Age (years)	49 (16–86)	59 (40–69)
Donor Sex (female)	43%	33%
Donor Traumatic cause of death	30%	21%
Donor Anti HBc positive	19%	12%
Cold ischemia time (minutes)	482 (220-753)	461 (352-600)

**Tabella 2. Caratteristiche del campione**

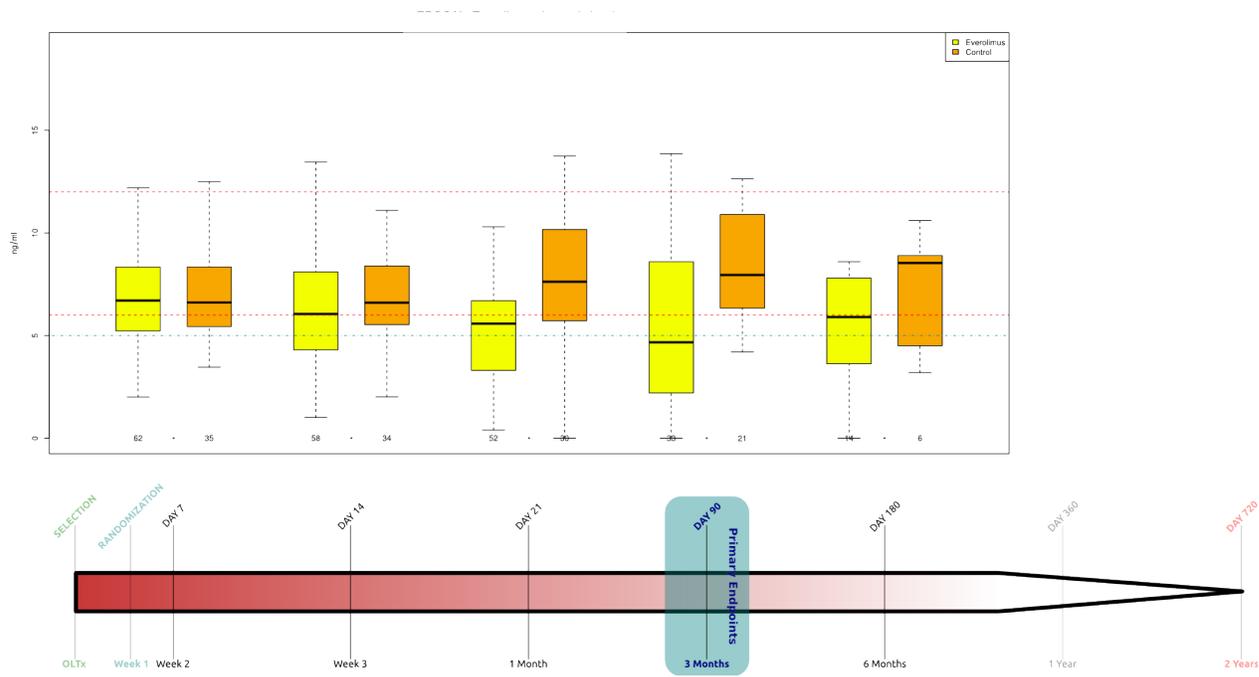
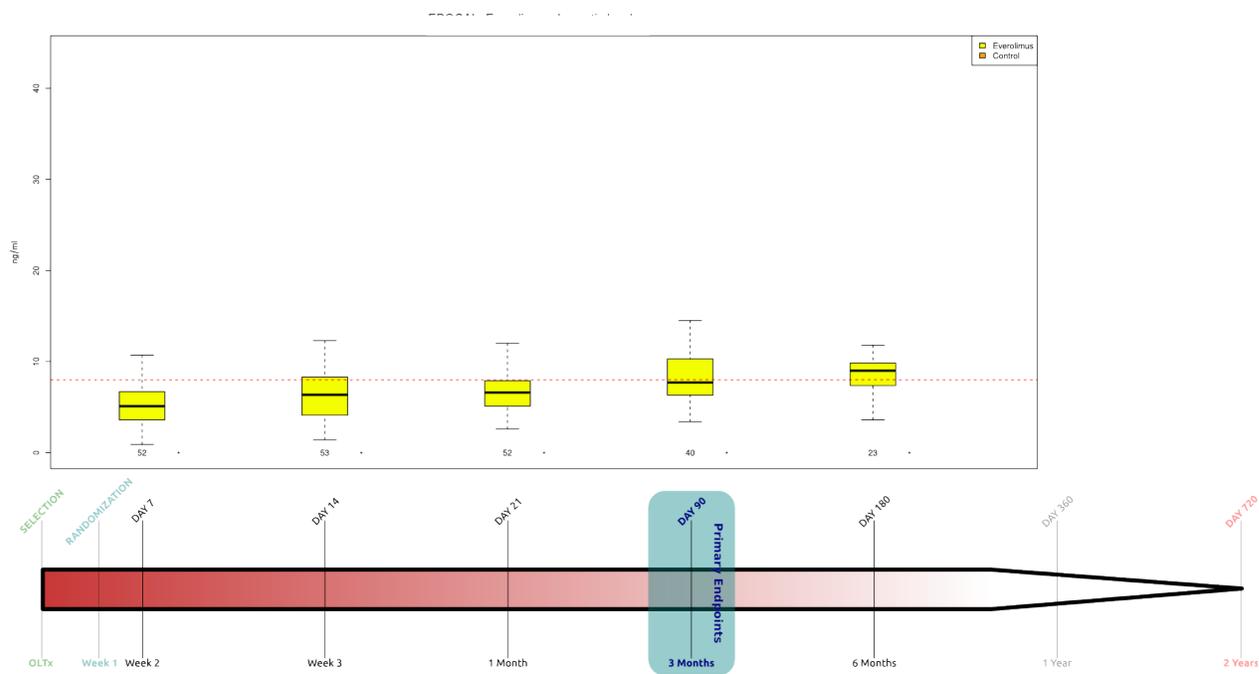
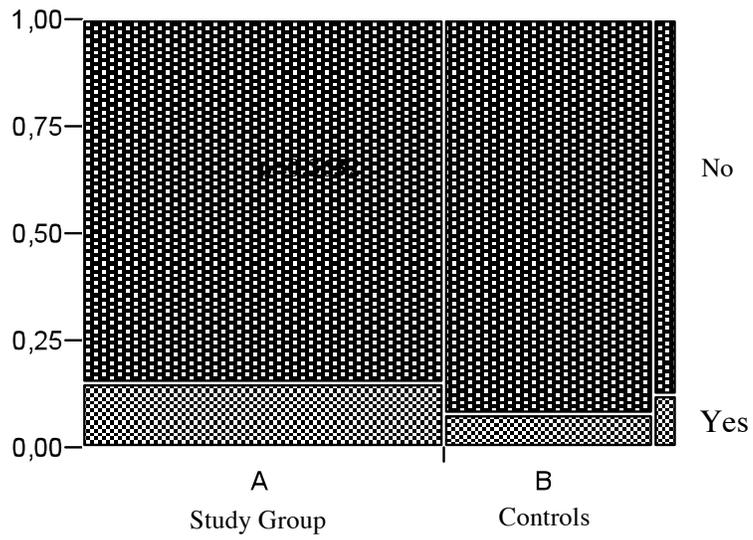


Figura 1. Livelli plasmatici di tacrolimus



**Figura 2. Livelli plasmatici di everolimus**



**Figura 3. Primary endpoint - Incidence of BPAR within 3 month**

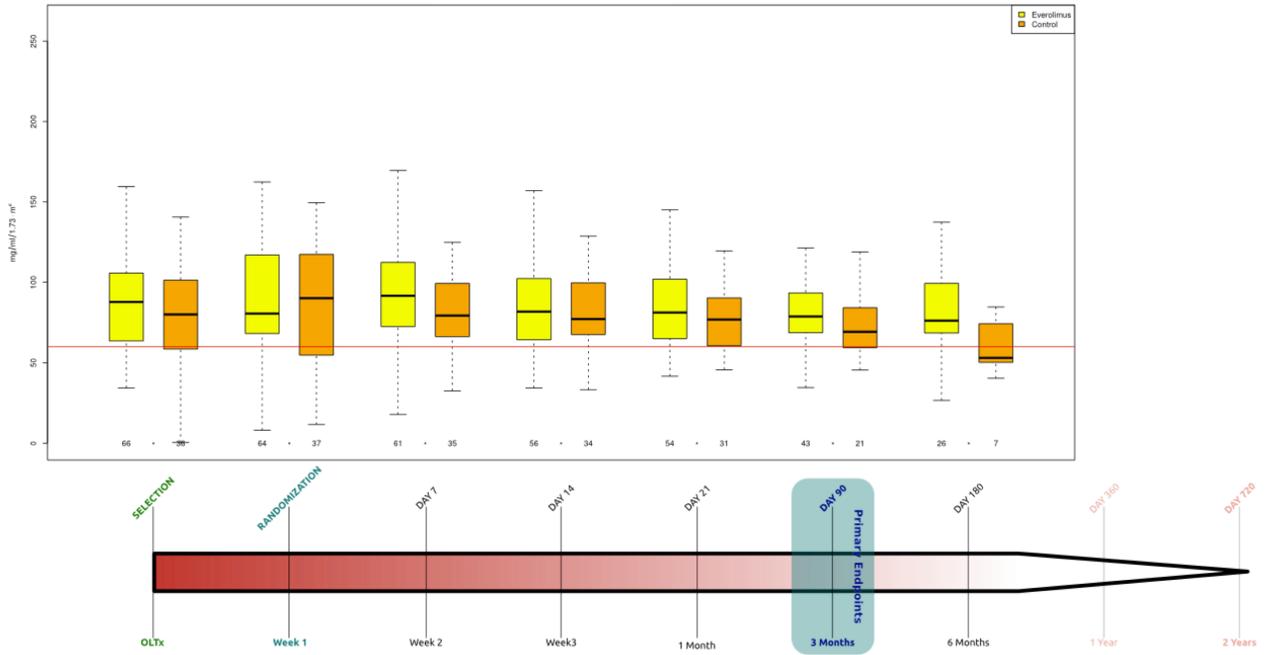
**Primary end-point reached:** <25% Biopsy proven rejections in the study arm within 3 months of OLTx.

Count (%)	Study group	Controls	
<b>No BPAR</b>	<b>56 (85%)</b>	<b>35 (92%)</b>	<b>91</b>
<b>BPAR</b>	<b>10 (15%)</b>	<b>3 (8%)</b>	<b>13</b>
	<b>66</b>	<b>38</b>	<b>104</b>

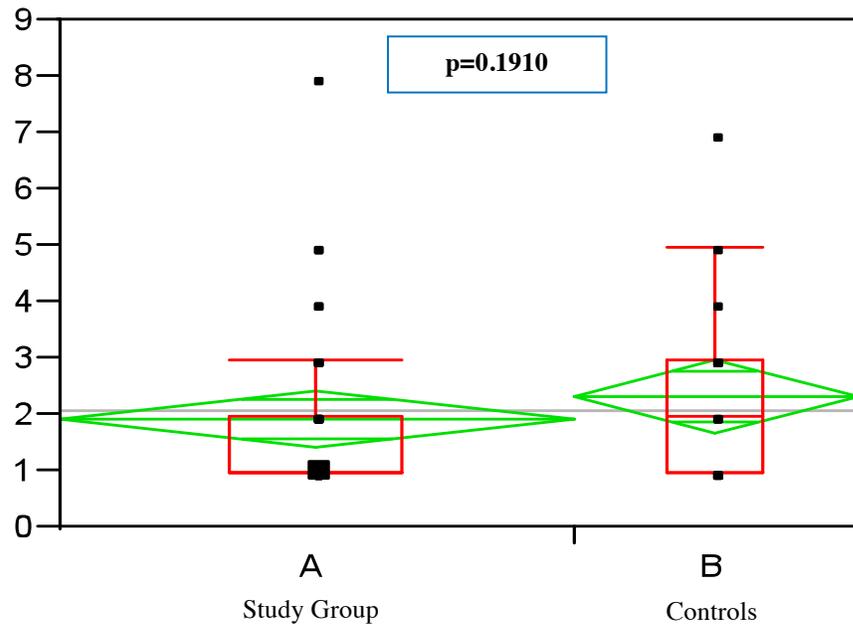
<b>Count</b>	<b>Study group</b>	<b>Controls</b>
No	55 (83%)	29 (76%)
Re-OLTx	1 (2%)	1 (3%)
Deaths	1 (2%)	2 (5%)
Laboratory	2 (3%)	1 (3%)
Other adverse events	5 (8%)	3 (8%)
Study protocol violation	2 (3%)	1 (3%)
Lost to follow-up	0	1 (3%)
	66	38

**Tabella 3. Cause di End of Study**

**Tacrolimus weaning in 23/53 (43%) patients within 1 month from OLTx**



**Figure 3. Secondary endpoint Creatinine Clearance (MDRD)**



**Figura 4. Secondary endpoint. No AEs per patient**

Count	Study group	Controls	Total	p
Death	1 (2%)	2 (5%)	3	>0.05
Re-OLTx	1 (2%)	1 (3%)	2	>0.05
Rejection	11 (17%)	3 (8%)	14	0.2475
Wound complications	8 (12%)	4 (11%)	12	>0.05
Neurologic	10 (15%)	5 (8%)	15	>0.05
HCV recidivism	3 (6%)	2 (5%)	5	>0.05
Hypertension	5 (8%)	6 (16%)	11	>0.05
Diabetes	8 (12%)	4 (11%)	12	>0.05
Dislipidemia	6 (9%)	2 (5%)	8	>0.05
Vascular-biliary complications	7 (11%)	5 (8%)	12	>0.05
Other	15 (23%)	7 (18%)	22	>0.05
Renal failure	6 (9%)	4 (11%)	10	>0.05
Haematologic	1 (2%)	0	1	NA
Proteinuria $\geq$ 1gr	6 (9%)	3 (8%)	9	>0.05
Infections	1 (2%)	8 (21%)	9	0.0027

**Tabella 4. Secondary endpoint- adverse events**