

45°

**Convegno Nazionale  
di Studi di Medicina Trasfusionale**

Rimini | 29-31 maggio 2024



**Malattia emolitica autoimmune da  
anticorpi freddi: aspetti classificativi  
e novità fisiopatologiche**

*Gianluca Ubezio*

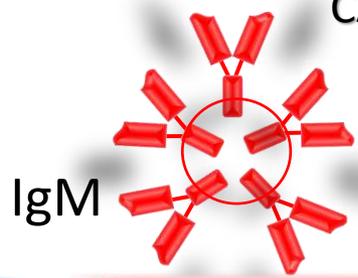
*U.O. Medicina Trasfusionale – Ospedale Policlinico San Martino di Genova*

Il sottoscritto **Gianluca Ubezio**, in qualità di Relatore  
dichiara che

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

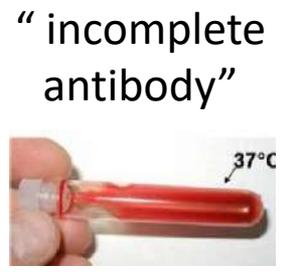
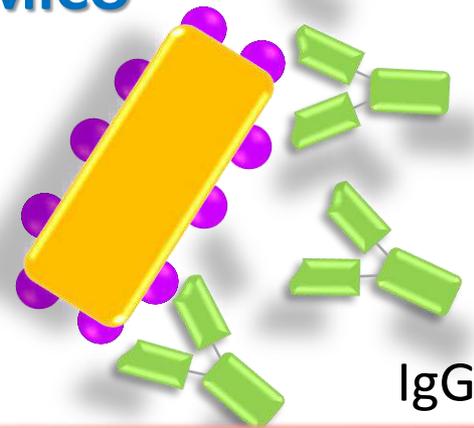


# REATTIVITA' ANTICORPALE E RANGE TERMICO



ANTIGENE CARBOIDRATO

ANTIGENE PROTEICO



Principalmente mediata da **IgM** (raramente IgA o IgG)

- Temperatura ottimale di legame compresa tra 0 e 4°C
- Frequente rilievo casuale a **basso titolo** in soggetti sani

Aumento del titolo in corso di patologia:

1. **oligoclonale**: infezioni
2. **monoclonale**: (para)-neoplastico

## FATTORI CONDIZIONANTI LA GRAVITA' DELL'EMOLISI

- policlonalità vs oligo/monoclonalità
- estensione del range termico
- titolo (il titolo è influenzato dalla temperatura in cui si effettua la valutazione)

Specificità / Emazie test	Adulto I	Cordone i	Enzima (papaina)
<b>Anti-I</b>	+++	+/-	+++
<b>Anti-i</b>	+/-	+++	+++
<b>Anti-Pr</b>	+++	+++	-

# ELEMENTI CLASSIFICATIVI

## Cold Agglutinin Disease (previously, "Primary CAD")

- Malattia linfoproliferativa B a basso grado, evidenziabile nel sangue periferico o nel midollo
- Mancanza di segni evidenti di altre neoplasie

## Cold Agglutinin Syndrome (previously, "Secondary CAD")

- Patologia secondaria a:
- Malattia linfoproliferativa B, con segni di presenza radiologica e sintomatologia
  - Infezione acuta, più frequentemente da Mycoplasma pneumoniae o EBV o SARS-Cov-2
  - Malattie autoimmunitarie (per es. LES)

# TEMPERATURA AMBIENTALE E RISCHIO DI MALATTIA

## COLD AGGLUTININ DISEASE REVISITED; A MULTINATIONAL, OBSERVATIONAL STUDY OF 232 PATIENTS

	Population, 10 <sup>6</sup>	Prevalence, cases/10 <sup>6</sup> inhabitants	Incidence, cases/10 <sup>6</sup> inhabitants/y	Outdoor temperature, °C, yearly-average
Norway	5.32	▶ 20.5	▶ 1.9	6.0*
Lombardy, Italy	7.0†	▶ 5.0	▶ 0.48	13.1

Calculation of prevalence was based on the number of patients still alive at the end of the study period. The yearly number of newly diagnosed cases was approximately constant from 2007 and was used to estimate incidence.

\*Heterogeneous. Estimate based on yearly-average in Oslo, Bergen, and Trondheim.

†Refers to the relevant part of the region.

# ANEMIE EMOLITICHE AUTOIMMUNI da anticorpi FREDDI (IgM)

## MALATTIA DA CRIOAGGLUTININE

### FISIOPATOLOGIA

- Emolisi principalmente **extravascolare** (intravascolare nelle fasi acute di malattia)
- Colpisce più frequentemente **sogetti anziani** e meno frequentemente l'età pediatrica
- **Anemizzazione cronica**, soprattutto nelle forme primarie

*Le crioagglutinine che mantengono la loro reattività fino a 25-30°C sono in grado di determinare attivazione del complemento in vivo e distruzione eritrocitaria.*

*Alti titoli a range termico inferiore possono comunque causare microagglutinazione intravascolare dei capillari periferici.*

### LABORATORIO

- Positività per **frazione C3d** (negatività per IgG e **controllo negativo NEGATIVO**)
- Ipocomplementemia da consumo (C3, C4)
- Il titolo è patologico se superiore a 1:**64** a 4°C / Emolisi normalmente per titoli >1:512
- L'evidenza di anemia emolitica non è necessaria per fare diagnosi, perchè possono prevalere gli aspetti ischemici.

## MALATTIA EMOLITICA AUTOIMMUNE DA ANTICORPI MISTI

*Mixed warm antibody–mediated and cold antibody–mediated AIHA is defined by the presence of warm IgG autoantibodies combined with **high-titer cold agglutinins**.*

*The mixed form of AIHA is often characterized by lower hemoglobin levels and a worse prognosis than warm AIHA, and two or more lines of therapy are frequently needed.*

Berentsen S, Barcellini W. Autoimmune Hemolytic Anemias. N Engl J Med 385;15: 1407-19

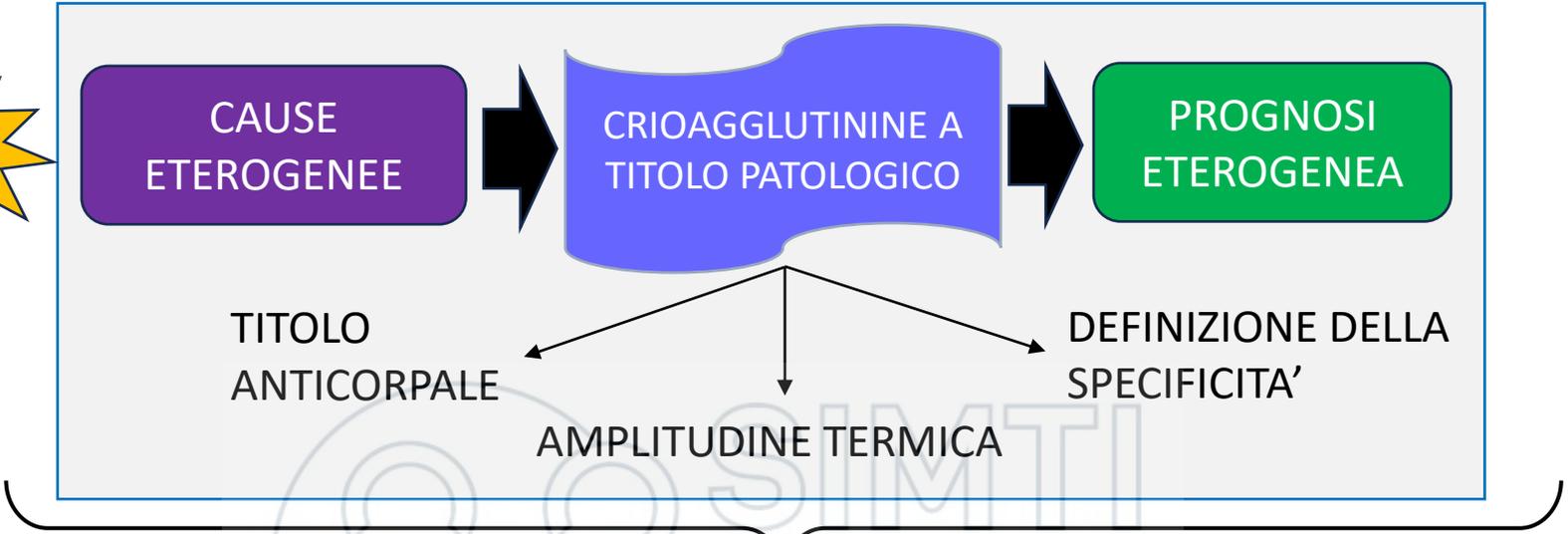
Nelle MEA miste sono coinvolti autoanticorpi di classe diversa (**IgM – IgG**) con differente range termico. Rispetto alle altre forme classiche di MEA, indipendentemente dalla eventuale malattia di base, l'esordio dello stato anemico è maggiormente grave e la variabilità di risposta ai trattamenti è Maggiore.

A differenza delle MEA da anticorpi caldi con compresenza di crioagglutinine, le MEA miste presentano una **crioagglutinina** che, quando titolata, risulta **superiore a 64 a 4°C**, spesso con ampio range termico di azione, potendo essere valutata fino a 30°C.

Alcuni dati presenti in letteratura correlano l'amplitudine del range termico di reazione con la gravità della presentazione clinica.



# MODELLO FISIOPATOLOGICO



## MECCANISMI EFFETTORI



# SISTEMA DEL COMPLEMENTO

## MECCANISMI DI ATTIVAZIONE

### 1. VIA CLASSICA

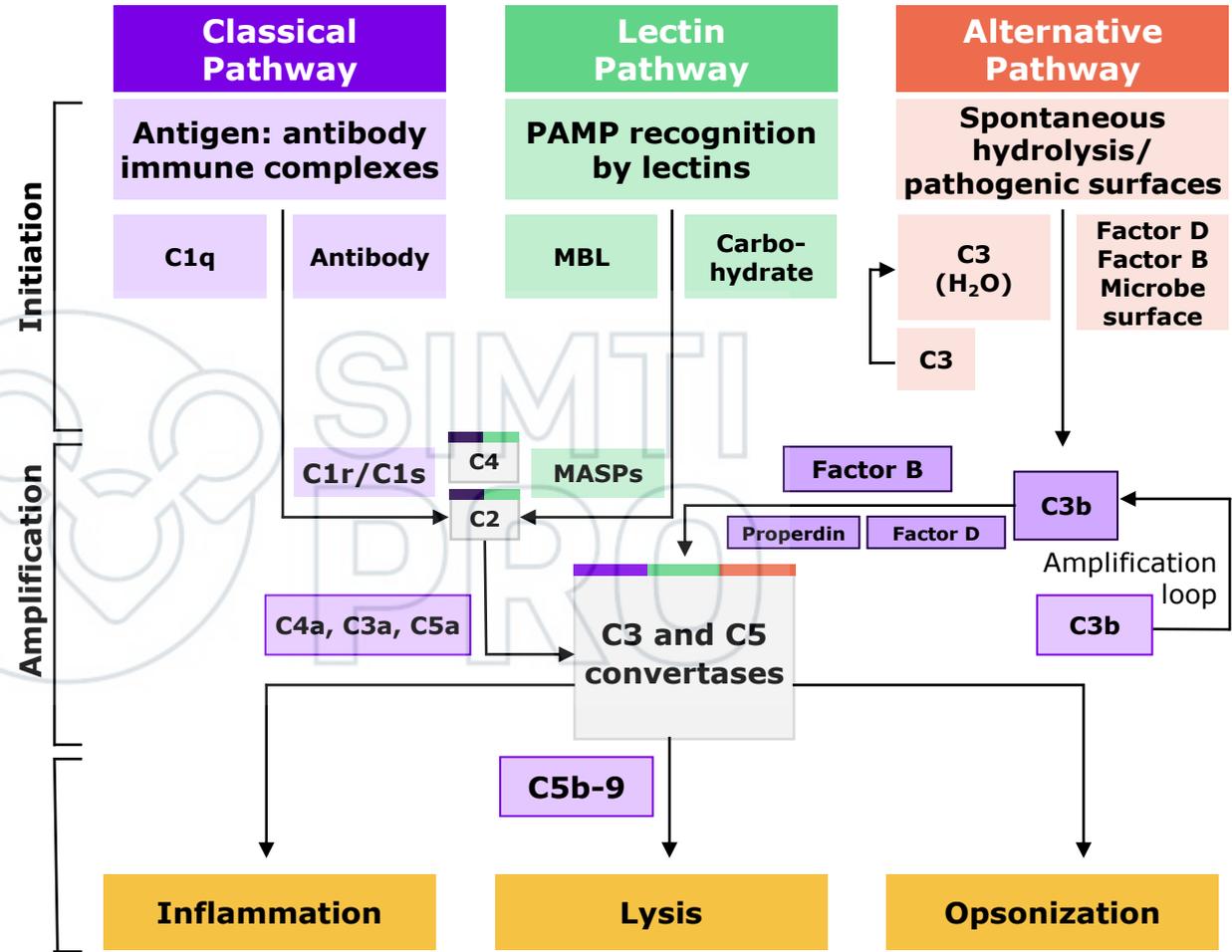
Attivazione mediate dal legame tra Ag-Ab e attivazione di C1

### 2. VIA LECTINICA

Le MBL legano residui di mannosio, presenti sulla superficie dei patogeni

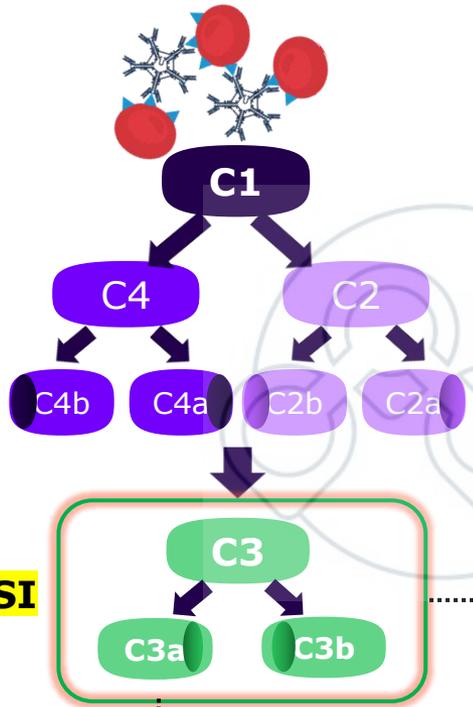
### 3. VIA ALTERNATIVA

Derivata dal fenomeno di attivazione spontanea (*tick-over*), in presenza di H<sub>2</sub>O, indipendentemente dalla presenza di anticorpi



# SISTEMA DEL COMPLEMENTO

## VIA CLASSICA



**C3  
CONVERTASI**

**C3a** espleta una azione pro-infiammatoria, mentre **C3b** si deposita sulle emazie e rappresenta in segnale necessario ad indurre emolisi extra-vascolare.

In alcuni casi, l'attività di C3 convertasi è tale da indurre l'attivazione della fase terminale del complemento (**MAC** - emolisi intra-vascolare).

**Emolisi extravascolare**  
(predominante in CAD)



**Emolisi intravascolare**



**CITOLISI &  
OPSONIZZAZIONE**

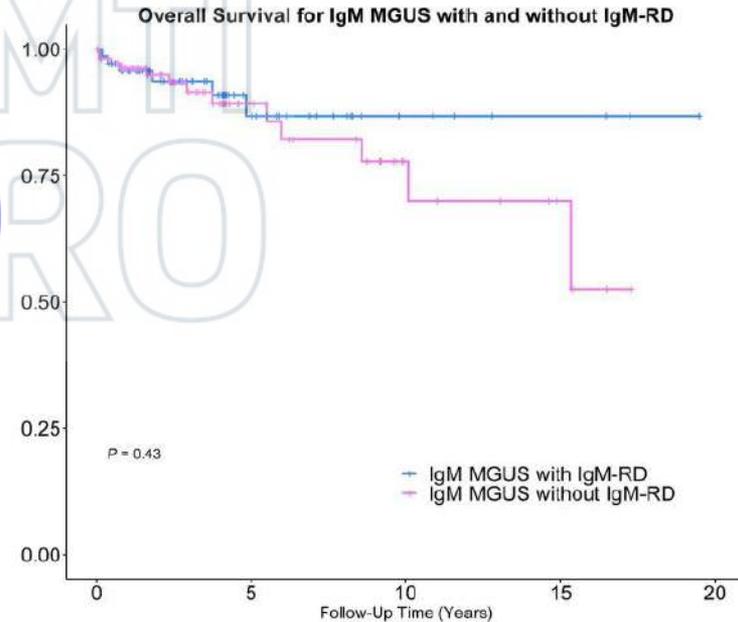
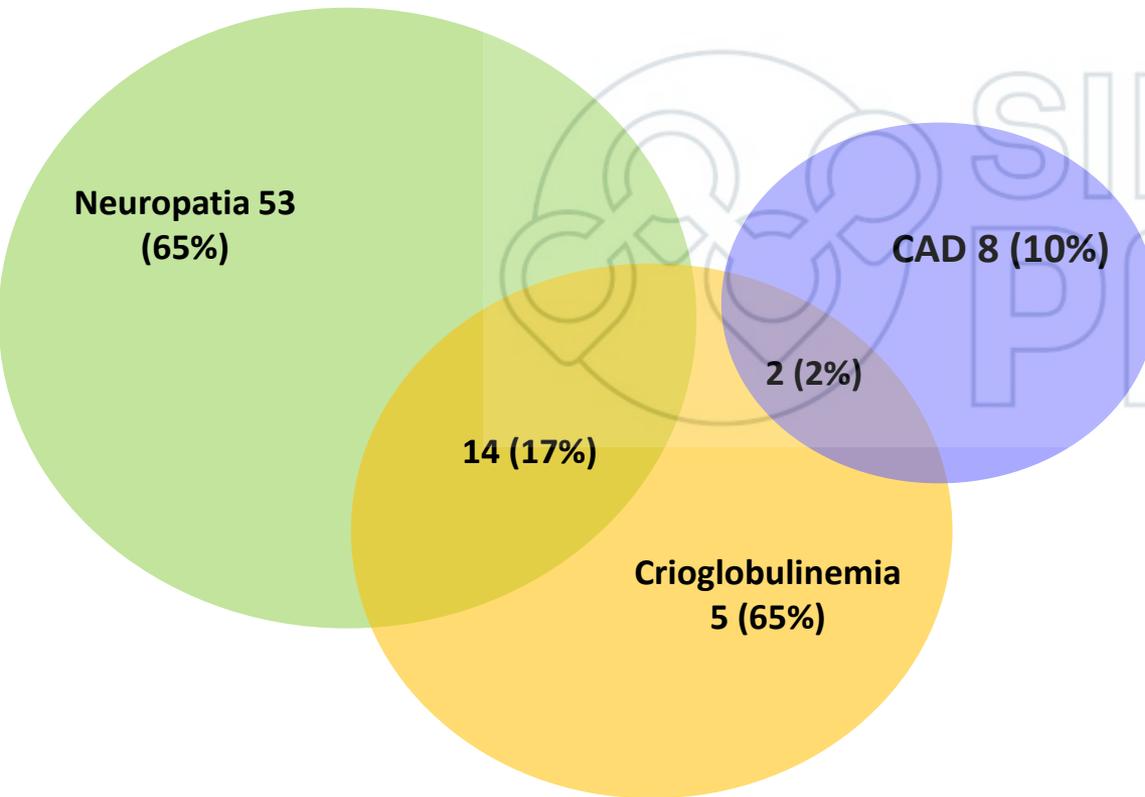
**INFIAMMAZIONE**

# CAD vs MGUS IgM

Recentemente, sono state descritte caratteristiche genetiche ricorrenti in CAD che permettono di distinguerla da LPL/IgM MGUS. Tra queste, l'assenza di mutazione **MYD88 L265P** ed il frequente riscontro di trisomy 3, 12 e 18.

In una coorte di 191 soggetti con IgM MGUS, solo 10 (5%) avevano CAD.

Rispetto ai soggetti che presentano mutazione MYD88 L265P, i soggetti con CAD hanno evidenziato anemia di maggiore gravità ( $p$  0.007).

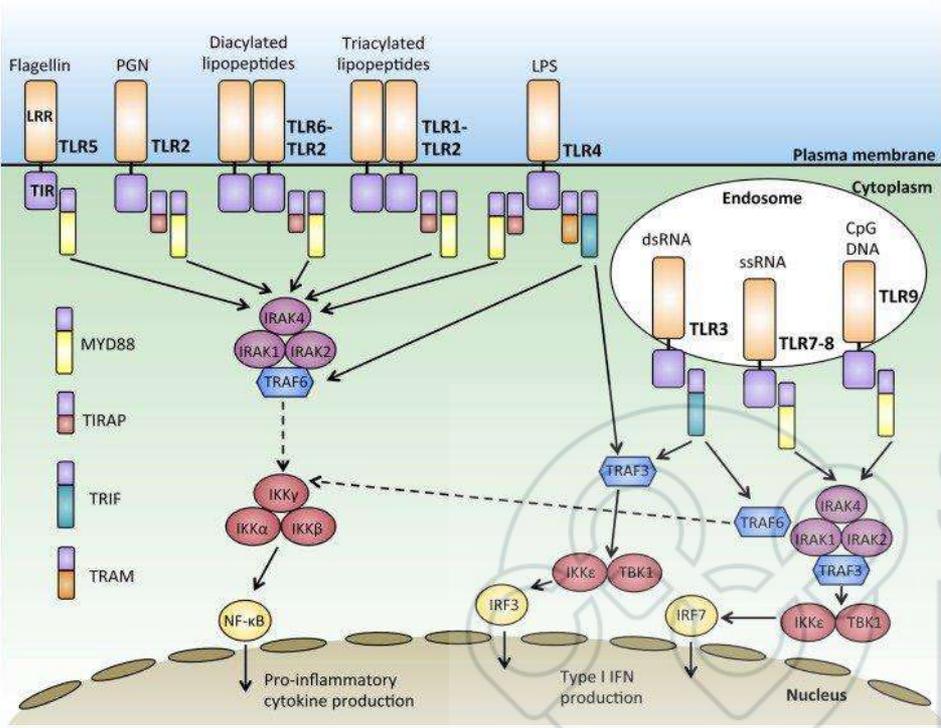


# CAD vs MGUS IgM

		All IgM MGUS	IgM MGUS w/o CAD	IgM MGUS with CAD	P
Total, N (%)		191 (100)	181 (95)	10 (5)	-
Sex, N (%)	Male	115 (60)	109 (60.2)	6 (60)	1.000
	Female	76 (40)	72 (39.8)	4 (40)	
Age at Bmbx in years, mean (median, SD)		69.6 (70.4-9.8)	69.6 (70.3-9.8)	69.6 (72.5-9.9)	0.992
IgM mg/dL mean (median, SD)		469 (452-614)	661 (444-627)	437 (497-264)	0.034
Light chain restriction by IFE, N (%)	κ	117 (61)	112 (61.9)	5 (50)	0.412
	λ	45 (24)	42 (23.2)	3 (30)	
	Multiple bands	12 (6)	12 (6.6)	0 (0)	
	PD bands	17 (9)	15 (8.3)	2 (20)	
Hgb g/dL, mean (median, SD)		12.6 (13.0-2.2)	12.7 (13.1-2.1)	10.3 (10.8-2.2)	0.007
Lymphs % in aspirate, mean (median, SD)		12.4 (11.0-7.1)	12.5 (11.0-7.0)	11.5 (8.0-9.2)	0.75
PC % in aspirate, mean (median, SD)		1.7 (1.0-2.2)	1.7 (1-1.4)	1.9 (1-1.8)	0.747
Clonal PC by IHC N=171, N (%)		41 (24)	38/163 (23.3)	3/8 (37.5)	0.400
Clonal B cells by FC N=157, N (%)		43 (27)	39/148 (26.4)	4/9 (44.4)	0.259
Lymphoid aggregates, N (%)		61 (32)	55 (30.4)	6 (60)	0.077
Abnormal karyotype N=173, N (%)		22 (13)	21/163 (12.9)	1/10 (10)	1.000
MYD88 L265P N=56, N (%)		35 (63)	35/53 (66.0)	0/3 (0)	0.048
Anti-MAG antibodies N=31, N (%)		16 (52%)	16/31 (51.6)	0/0 (0)	1.000

<https://doi.org/10.3324/haematol.2022.282389>

# CAD E MUTAZIONE DI MYD88 p. Leu265Pro



**MYD88** rappresenta un trasduttore intracellulare di segnali derivati da eterodimeri di Toll-like Receptors. Il segnale intracellulare, attraverso l'attivazione di fattori trascrizionali come **NFκB** ed **IRFs**, induce l'espressione di citochine pro-infiammatorie e IFN tipo 1.

La **mutazione somatica in posizione 265**, che porta al cambio da Leucina a Prolina, è stata descritta in molto DLBCL e macroglobulinemia di Waldenström, essendo una «gain-of-function driver mutation»

*“The histopathological picture has often been interpreted as several types of low-grade non-Hodgkin’s lymphoma, such as lymphoplasma - cytic or marginal-zone lymphoma, but a relatively uniform disease, cold agglutinin-associated lymphoproliferative bone marrow disorder, is now thought to be the underlying condition.*”

*The **MYD88 L265P mutation**, present in nearly all cases of lymphoplasmacytic lymphoma (the bone marrow disorder seen in Waldenström’s macroglobulinemia), is usually not found in cold agglutinin disease.»*

Berentsen S, Barcellini W. Autoimmune Hemolytic Anemias. N Engl J Med 385;15: 1407-19

# INFIAMMAZIONE E RUOLO DELLE CITOCINE

L'attivazione del complemento causa l'aumento della produzione di mRNA di una serie di citochine pro-infiammatorie.

In CAD che CAS, le anafilotossine C3a e C5a sono il frutto della attivazione del complemento per **via classica**.

Nei casi attivi di CAD si osserva un **consumo di C4** (> 70%).

Essendo **proteine di fase acuta**, l'attivazione del complemento può essere esacerbata da infezioni, traumi o chirurgia.

	Genotype	All AIHA (N=123)	wAIHA (N=77)	CAD (N=46)	Control cohort 1 Poli et al. (N=363) (23)	Control cohort 2 Uboldi et al. (N=140) (24)
▶ TNF-α -308 G/A	GG	79 (64) **,§	45 (58) **,§	34 (74)	277 (77)	118 (84)
	GA	42 (34)	30 (39)	12 (26)	79 (22)	19 (14)
	AA	2 (2)	2 (3)	0 (0)	3 (1)	3 (2)
▶ TGF-β C/G codon 25	CC	0 (0)	0 (0)	0 (0)	ND	4 (3)
	CG	28 (23)	16 (21)	12 (26)	ND	14 (10)
	GG	95 (77)*	61 (79)	34 (74)*	ND	122 (87)

Values are expressed as N(%). \* = p<0.05 vs Uboldi et al ; \*\*= p<0.001 vs Uboldi et al; § = p<0.05 vs Poli et al. ND=not determined

**TNF-α** e **TGF-β** sono risultate condizionare la gravità della malattia emolitica autoimmune, in base alla genetica di rispettivi SNPs.

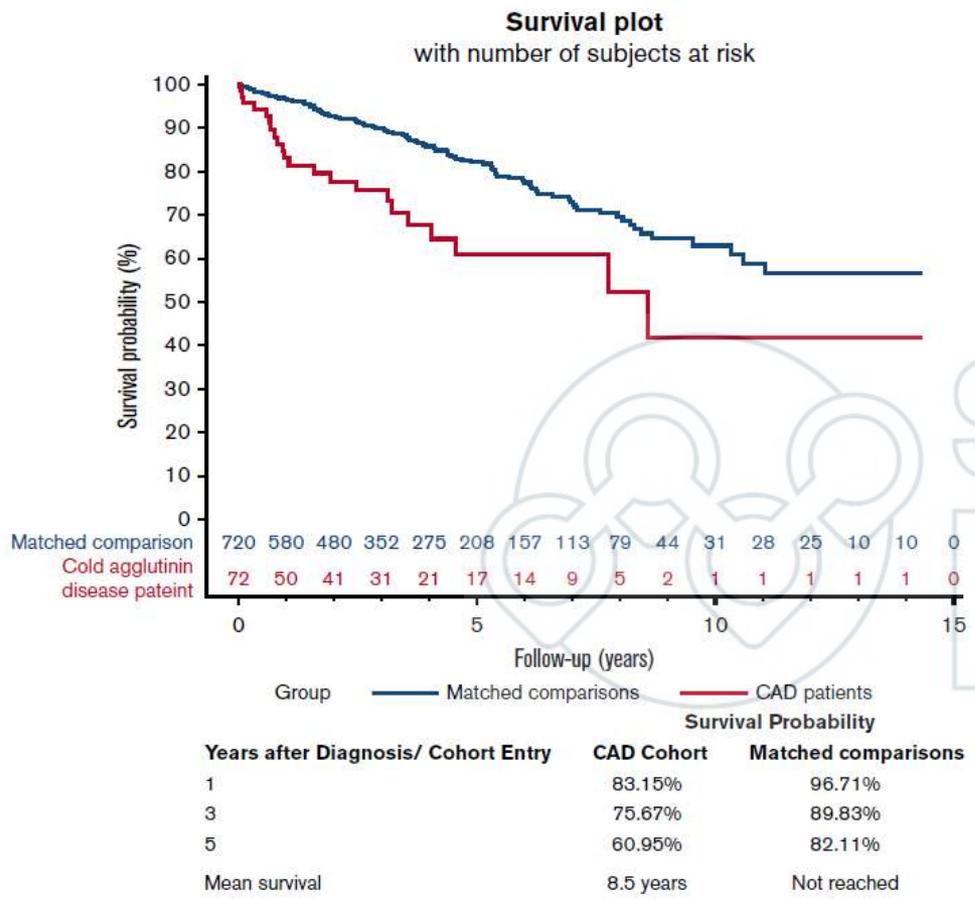
SNP-**308GG TNF-α** si correla ad aumentato rischio di sviluppo di MEA e maggiore gravità di presentazione clinica.

In fase acuta di malattia, TGF-β aumenta la sua produzione, inducendo sviluppo di autoanticorpi.

SNPs **+25GG TGF-β** si associa a maggiori livelli di TGF-β, a sua volta associato a refrattarietà alla terapia.



# CAD E RISCHIO TROMBOEMBOLICO



Il rischio tromboembolico nei pazienti affetti da CAD è aumentato.

Rispetto alla popolazione di controllo, è osservato un RR:

- 1 anno (7.2% vs 1.9% del controllo),
- 3 anni (9.0% vs 5.3%),
- 5 anni (11.5% vs 7.8%).

**aHR stimato a 1.65** (95% CI, 0.69-3.95; P 5 .257).

DOI 10.1182/bloodadvances.2019000476.

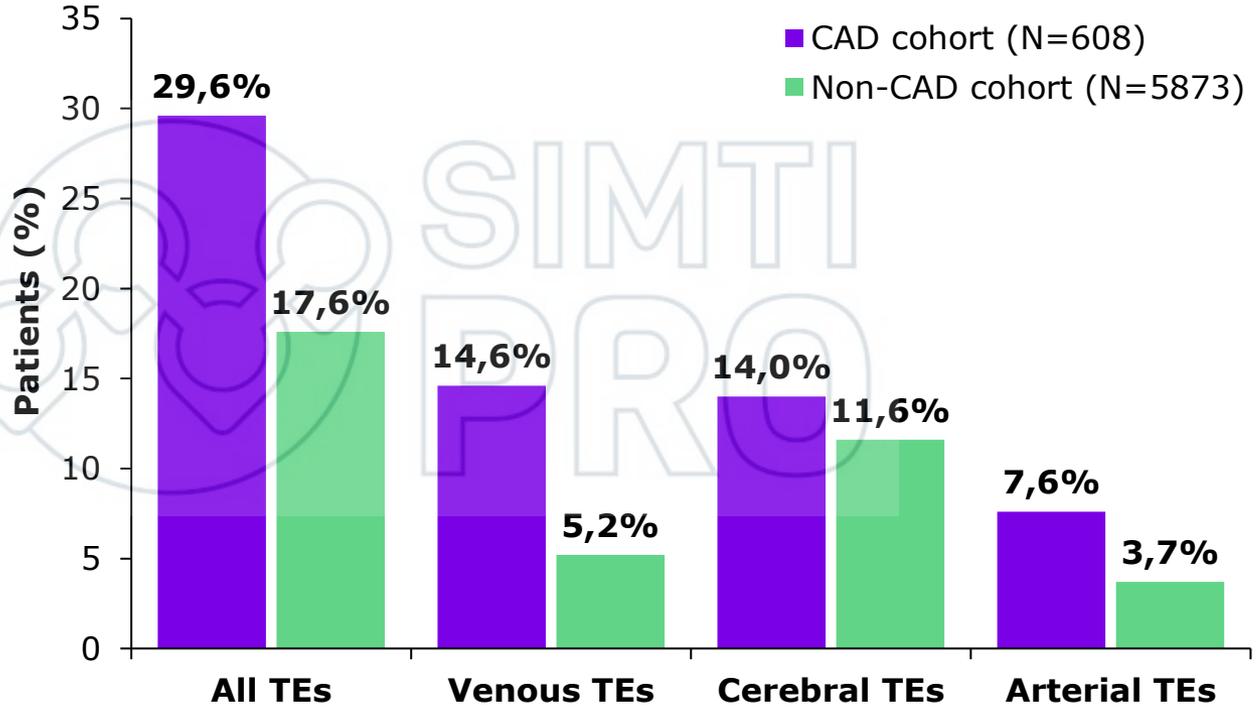
# CAD E RISCHIO TROMBOEMBOLICO

## ANALISI RETROSPETTIVA DI US Optum Database

### Overall rates of arterial, venous, and cerebral TEs<sup>a</sup>

608 pazienti con CAD, comparati con 5873 pazienti *matched-paired* (2006 – 2016)

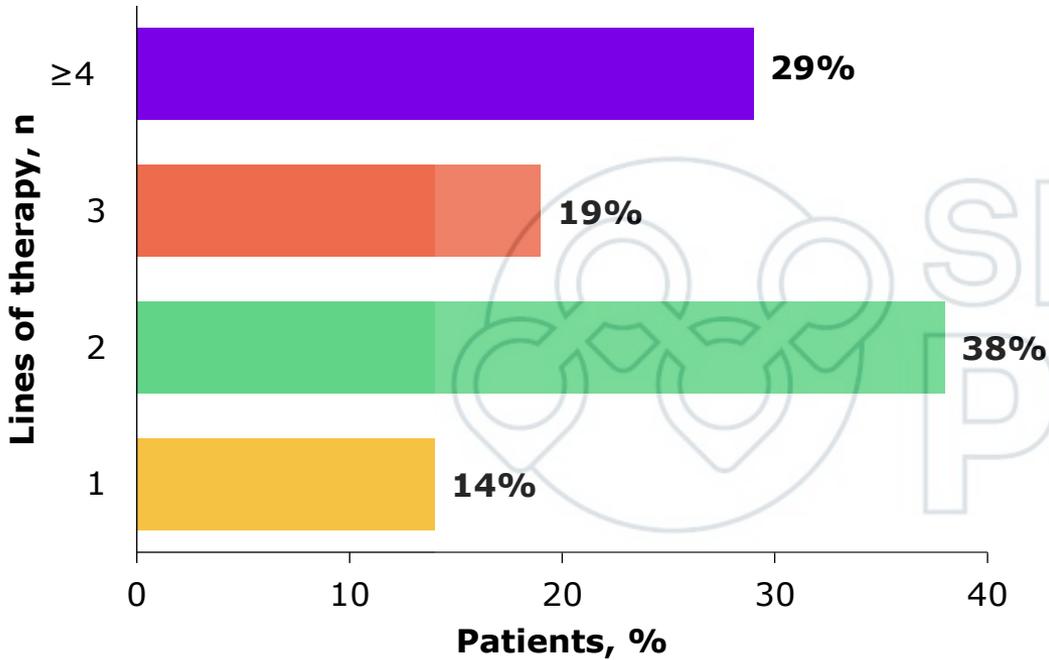
Conferma del maggiore rischio TE nei pazienti con CAD (adjusted hazard ratio: **1.94**;  $p < 0.0001$ )



# STANDARD TERAPEUTICO

## Stanford Healthcare Study

### Patients with CAD receiving treatment (n=21)



3.5

Linee di terapia che in media affronta un paziente con CAD

86%

I pazienti che hanno  $\geq 2$  linee di terapia (29% sperimenta  $\geq 4$  linee)

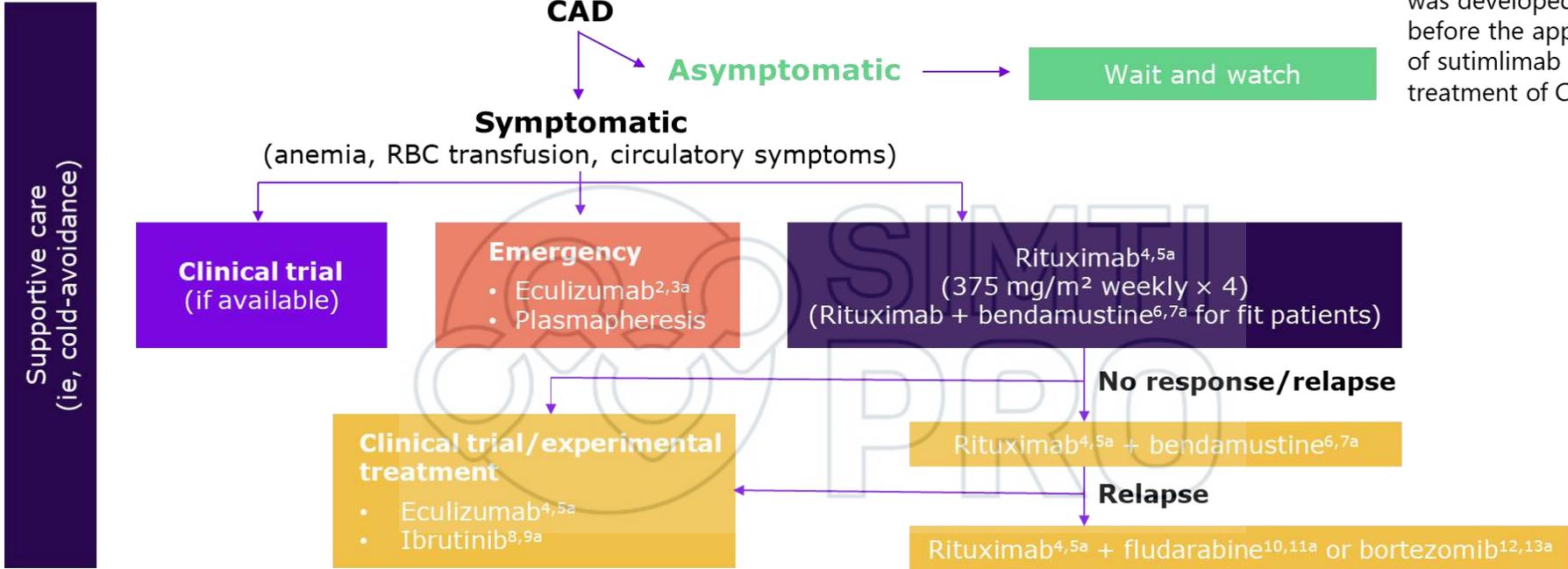
67%

I pazienti che sviluppano anemia grave all'esordio

# STANDARD TERAPEUTICO

## Recommendations From the First International Consensus Meeting (2020): Treatment Algorithm for CAD<sup>1</sup>

**Note:** This algorithm was developed before the approval of sutimlimab for the treatment of CAD

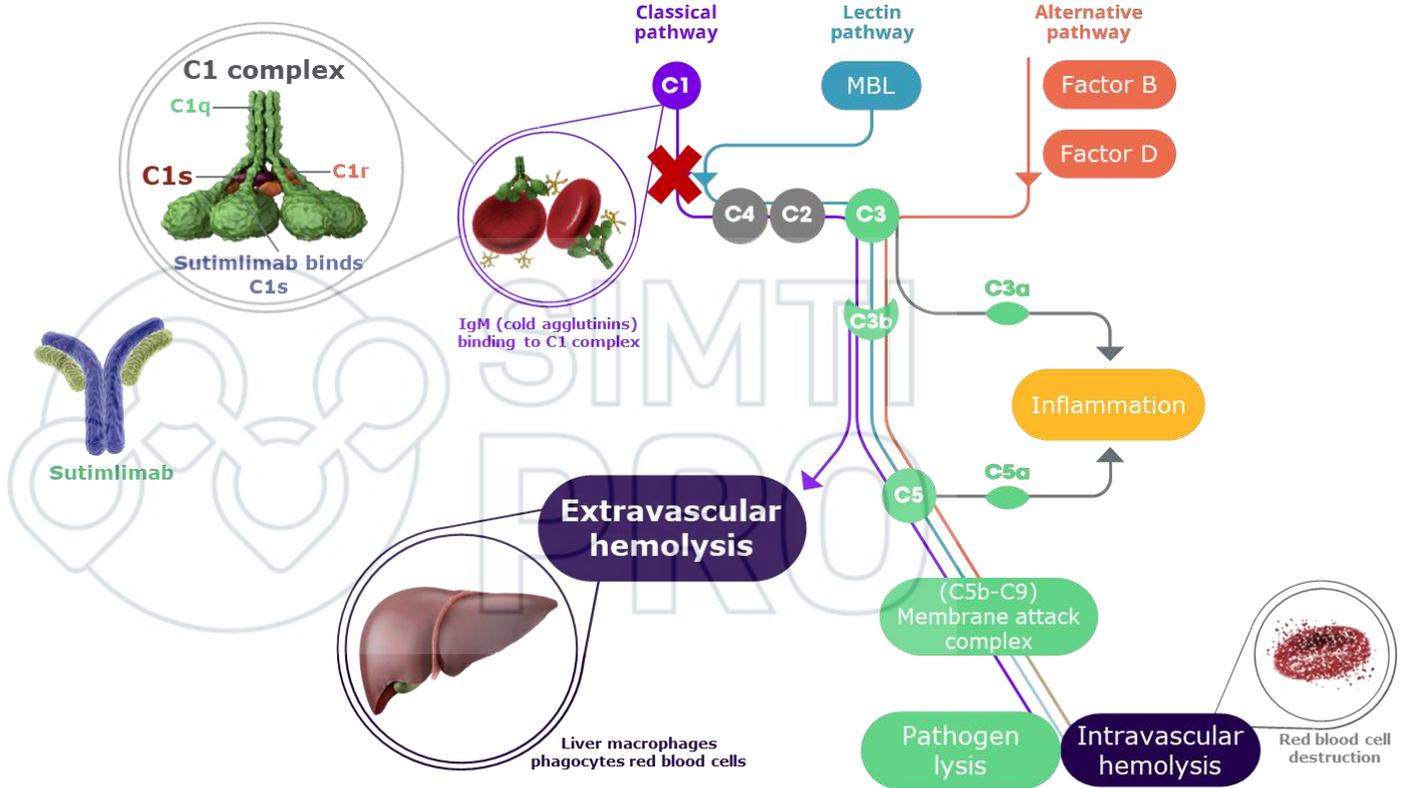


CAD, cold agglutinin disease; RBC, red blood cell. Figure adapted with permission of Elsevier. <sup>a</sup>off-label use<sup>2-13</sup>.  
 1. Jäger U, et al. *Blood Rev.* 2020;41:100648; 2. Eculizumab, FDA label. [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2019/125166s4311bl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2019/125166s4311bl.pdf) [Last accessed March 2023]; 3. Eculizumab, EMA label. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/soliris-epar-product-information\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/soliris-epar-product-information_en.pdf) [Last accessed March 2023]; 4. Rituximab, FDA label. [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2010/103705s5311bl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2010/103705s5311bl.pdf) [Last accessed March 2023]; 5. Rituximab, EMA label. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/mabthera-epar-product-information\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/mabthera-epar-product-information_en.pdf) [Last accessed March 2023]; 6. Bendamustine, FDA label. [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2017/208194s0051bl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/208194s0051bl.pdf) [Last accessed March 2023]; 7. Bendamustine, EMA label. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/levact-article-29-referral-annex-i-ii-iii-iv\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/levact-article-29-referral-annex-i-ii-iii-iv_en.pdf) [Last accessed March 2023]; 8. Ibrutinib, FDA label. [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2018/210563s0001bl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/210563s0001bl.pdf) [Last accessed March 2023]; 9. Ibrutinib, EMA label. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/imbruvica-epar-product-information\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/imbruvica-epar-product-information_en.pdf) [Last accessed March 2023]; 10. Fludarabine, FDA label. [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2009/020038s0321bl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/020038s0321bl.pdf) [Last accessed March 2022]; 11. Fludarabine, EMA label. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/artzerra-epar-product-information\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/artzerra-epar-product-information_en.pdf) [Last accessed March 2023]; 12. Bortezomib, FDA label. [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2014/021602s0401bl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2014/021602s0401bl.pdf) [Last accessed March 2023]; 13. Bortezomib, EMA label. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/velcade-epar-product-information\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/velcade-epar-product-information_en.pdf) [Last accessed March 2023].

# NUOVI APPROCCI TERAPEUTICI FISIOPATOLOGICI

Sutimlimab selettivamente inibisce C1s, interattore centrale della via classica di attivazione del complemento

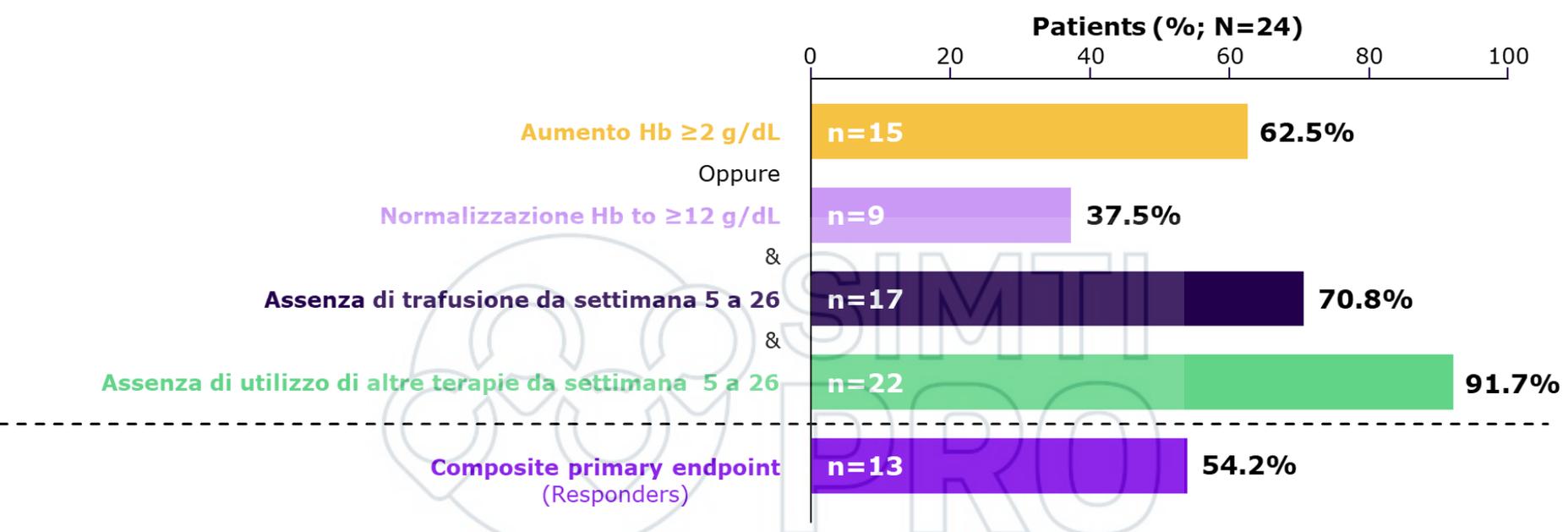
<b>Sutimlimab</b> (formerly B1VV009) <sup>3</sup>
Humanized monoclonal Ab
IgG <sub>4</sub> (S241P; L248E)
Designed to <b>inhibit the classical complement pathway</b>
Designed to leave the lectin and alternative pathways intact



Ab, antibody; C, complement protein; Ig, immunoglobulin; MAC, membrane attack complex; MBL, mannose-binding lectin.  
 Jäger U, et al. *Blood*. 2019; 133(9):893-901. Figure adapted with permission of the American Society of Hematology.  
 1. Murphy K. *Janeway's Immunobiology*. 8th ed. New York, NY: Garland Science; 2012; 2. Jäger U, et al. *Blood*. 2019; 133(9):893-901;  
 3. Bartko J, et al. *Clin Pharmacol Ther*. 2018;104(4):655-63.

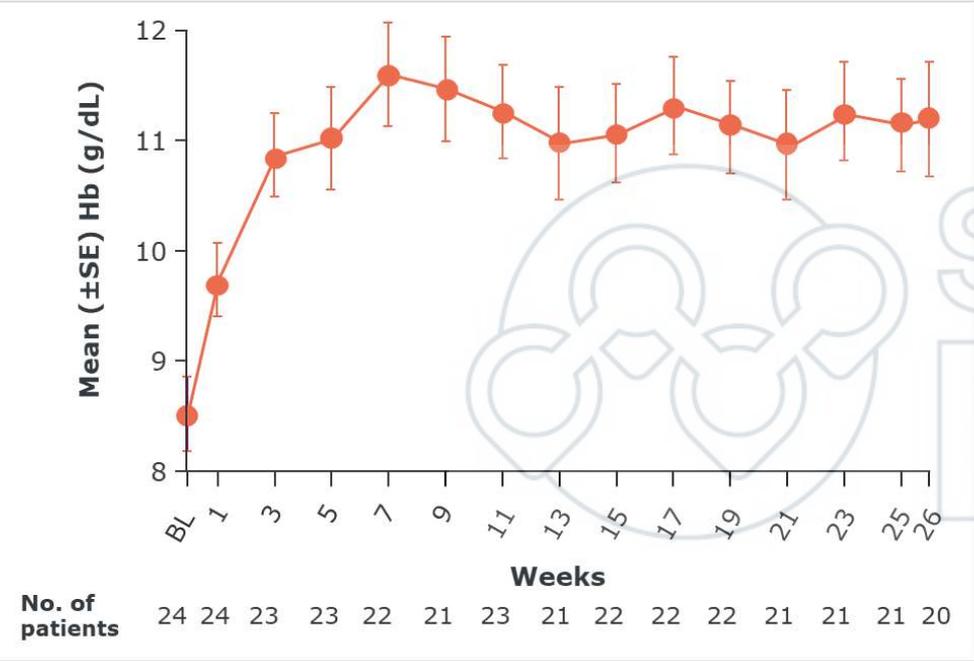
# NUOVI APPROCCI TERAPEUTICI FISIOPATOLOGICI

## VALUTAZIONE DI EFFICACIA DELLA INIBIZIONE DELLA VIA CLASSICA DEL COMPLEMENTO IN CAD



# NUOVI APPROCCI TERAPEUTICI FISIOPATOLOGICI

## Phase 3 CARDINAL Results: rapido aumento del valore di emoglobina



### Rapido incremento dell'emoglobina

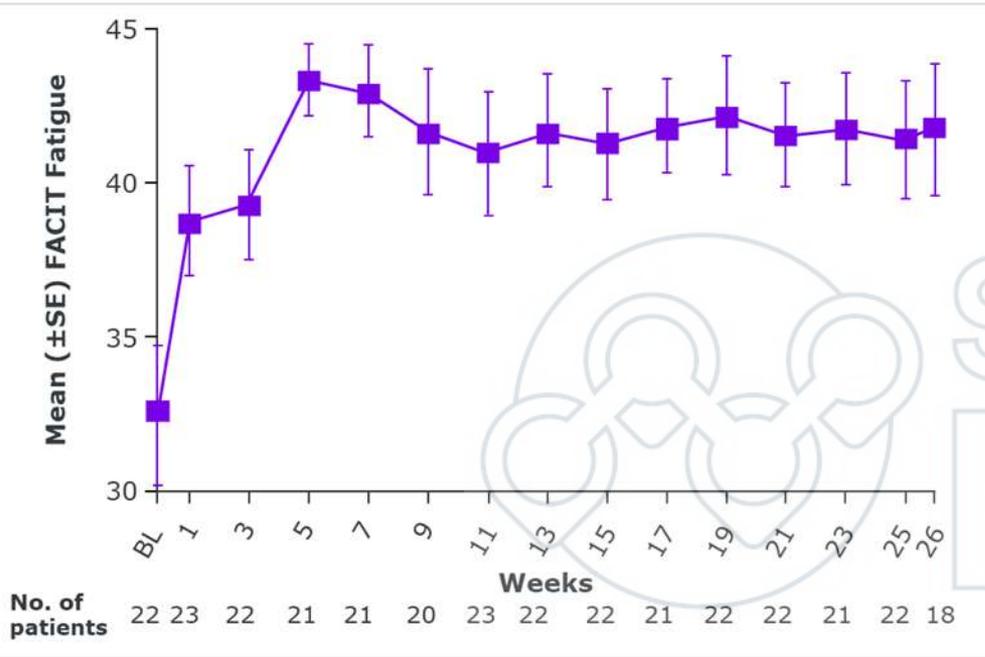
- Aumento medio di Hb >1 g/dL nella 1° settimana
- Aumento medio di Hb >2 g/dL nella 3° settimana
- Mantenimento del valore di Hb >11g/dL, durante il trattamento con sutimlimab

### Sutimlimab aumenta in maniera significativa il valore di Hb

Results presented from Part A of the Cardinal study. BL (Week 0) is defined as the last non-missing value prior to the first administration of sutimlimab.  
\*The treatment assessment timepoint is defined as the average of the values from the Week 23, 25, and 26 visits.  
BL, baseline; Hb, hemoglobin, SE, standard error.  
1. Röth A, et al. *N Engl J Med.* 2021;384:1323-34; 2. Röth A, et al. *Blood.* 2019;134(Suppl 2):LBA-2; 3. Data on file. CARDINAL Clinical Study Report, Sanofi Genzyme.

# NUOVI APPROCCI TERAPEUTICI FISIOPATOLOGICI

## Phase 3 CARDINAL: rapido miglioramento della QoL



**Si assiste ad un significativo e stabile miglioramento del QoL (FACIT-Fatigue)**

● Miglioramento medio dello score di 7 punti nella 1° settimana

### Sutimlimab migliora lo score di valutazione del QoL

Results presented from Part A of the Cardinal study. BL (Week 0) is defined as the last non-missing value prior to the first administration of sutimlimab. BL, baseline; EQ-5D-5L, EuroQol 5-dimensional questionnaire; FACIT-F, Functional Assessment of Chronic Illness Therapy-Fatigue; MID, minimally important difference; PGIC, Patient's Global Impression of Change; PGIS, Patient's Global Impression of (fatigue) Severity; PRO, patient-reported outcome; QOL, quality of life; SE, standard error; SF-12, 12-item Short Form Survey; TAT, treatment assessment time point. 1. Röth A, et al. *N Engl J Med.* 2021;384:1323-34; 2. Röth A, et al. *Blood.* 2019;134(Suppl 2):LBA-2; 3. Data on file. CARDINAL Clinical Study Report, Sanofi Genzyme; 4. Lai J, et al. *J Rheumatol.* 2011;38(4):672-79; 5. Reddy S, et al. *J Palliat Med.* 2007;10(5):1068-75.

# NUOVE SFIDE

1. Necessità di standardizzazione della **ricerca** e **titolazione** di crioagglutinine, certificando l'esito rispetto a fenomeni di autoagglutinazione nella fase di rilevazione iniziale,
2. caratterizzazione standardizzata della **estensione termica** (variabile continua) e della **titolazione** (variabile discreta) delle crioagglutinine,
3. cooperazione alla determinazione del significato clinico della **specificità autoanticorpale**, in corso di CAD,
4. cooperazione al supporto per la creazione di una **banca dati e biologica** di soggetti con titolo patologico di crioagglutinine.