PROTOCOLLO DELLO STUDIO CLIgAN

Titolo

Somministrazione precoce dei Corticosteroidi versus terapia standard (RASB seguita da corticosteroidi) nei pazienti con nefropatia da Immunoglobulina A (IgAN) con lesioni renali attive osservate alla biopsia renale. Somministrazione di RASB terapia seguita dalla combinazione inibitore del cotrasportatore sodio – glucosio2 e RASB versus RASB terapia seguita da corticosteroidi combinati con RASB nei pazienti IgAN con lesioni renali croniche identificate dalla biopsia renale. UN PROGETTO PER DUE STUDI CLINICI MULTICENTRICI, PROSPETTICI, RANDOMIZZATI, APERTI, PER VALUTARE L'EFFETTO DELLA TERAPIA PRSONALIZZATA IN BASE ALLA BIOPSIA RENALE NEI PAZIENTI CON IgAN (studio CLIgAN).

Titolo in breve

"Un progetto per due studi clinici multicentrici, prospettici, randomizzati, aperti, per valutare l'effetto della terapia personalizzata sulla base dei risultati della biopsia renale nei pazienti con IgA (studio CLIgAN).

Registrazione dello Studio

ClinicalTrials.gov NCT 04662723

Versione del protocollo e data della versione

4.0 – 14 Settembre 2022

Finanziamento

Ministero dell'Università (PON RI N. ARS01_00876)
Periodo 2020-2023

Ruoli e Responsabilità: *Nome, affiliazione e ruolo dei partner nel protocollo*

Schena Francesco Paolo, Prof. Emerito di Nefrologia nell'Università di Bari, Presidente Fondazione Schena. Primo autore nello scrivere il protocollo e responsabile dello studio clinico. Responsabile della gestione, analisi e interpretazione dei dati. Responsabile dei report scritti e delle decisioni per sottomettere i report alla pubblicazione

Manno Carlo, Professore Associato di Nefrologia nell'Università di Bari. Ha collaborato nella stesura del protocollo.

Strippoli Giovanni, Professore Ordinario di Nefrologia nell'Università di Bari. Ha collaborato nella stesura del protocollo.

Rossini Michele, Dirigente Medico, Unità Operativa Complessa di Nefrologia, Policlinico Bari. Esperto di patologia renale nella lettura della biopsia renale.

Abbrescia Daniela PhD, Fondazione Schena. Raccolta e conservazione del materiale biologico.

Tripepi Giovanni, PhD, Ricercatore del CNR-IFC, Istituto di Patologia Clinica, Reggio Calabria, Esperto di statistica medica.

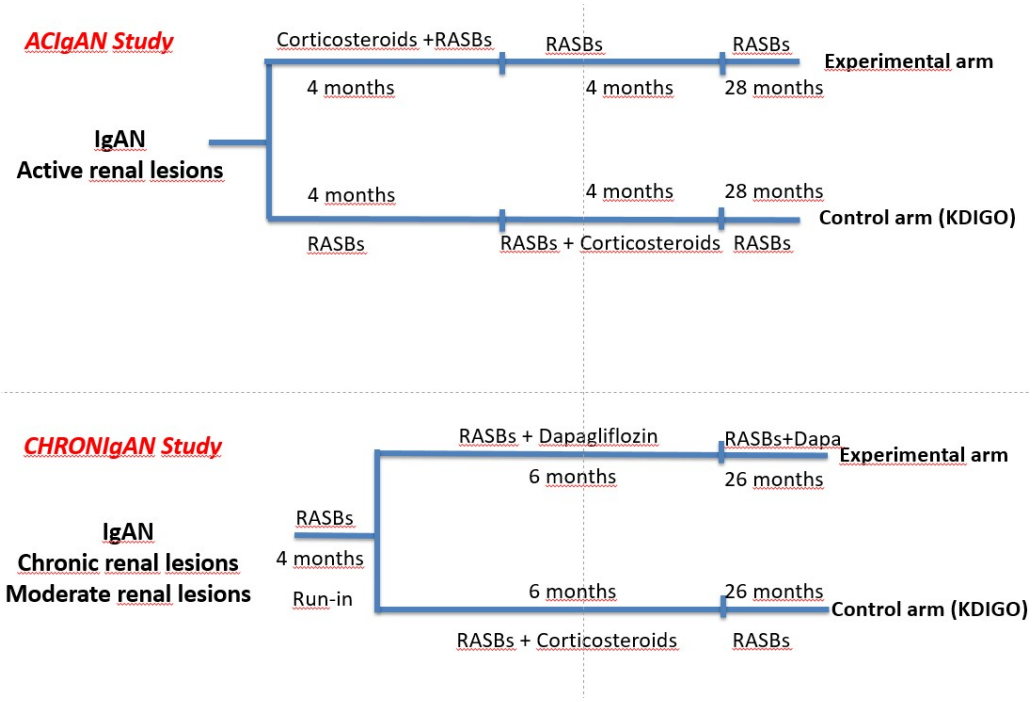
Pistoia M, Titolare dell'Azienda eResult, Cesena Italia. Sviluppo della cartella clinica e del report elettronico.

Di Bari D., ReCaS, Università di Bari, Italy. Archiviazione dei dati clinici e di laboratorio.
Donvito G., ReCaS, Università di Bari, Italia. Archiviazione dei dati clinici e di laboratorio.
Nicolucci A, Titolare dell'Azienda Coreserach, Pescara. Responsabile dell'analisi statistica.
Di Noia Tommaso, Professore di Ingegneria nel Dipartimento di Ingegneria Elettronica ed Informatica, Politecnico, Bari. Esperto di Intelligenza artificiale (AI) .
Fedelucio Narducci, Professore Associato di Informatica nel Dipartimento di Ingegneria Elettronica ed Informatica. Politecnico di Bari. Esperto di intelligenza artificiale.
Anelli Vito Walter, PhD, Ricercatore del Dipartimento di Ingegneria Elettronica ed Informatica. Esperto per lo sviluppo di tool basati sull'intelligenza artificiale.
Responsabile delle informazioni e contatti: Prof. F.P. Schena, Tel. +39 3336771291
Sponsor dello Studio CLIgAN: Fondazione Schena, Via delle Murge n. 59/A – 70124 Bari, Italia
Il Comitato Coordinatore sarà composto dai Direttori delle Unità Operative di Nefrologia.

CONFIDENZIALE

Questo documento contiene informazioni confidenziali appartenenti allo Sponsor. Salvo quanto diversamente concordato per iscritto, accettando o rivedendo questi materiali, l'utente accetta di mantenere riservate tali informazioni e non divulgarle ad altri (tranne ove richiesto dalla legge applicabile), di non utilizzarle per scopi non autorizzati.

SINOSSI DELLO STUDIO

Titolo	Trattamento precoce con corticosteroidi e RASB rispetto alla terapia standard (RASB seguiti da corticosteroidi) nei pazienti con nefropatia da Immunoglobulina A (IgAN) che presentano lesioni renali attive alla biopsia renale. Trattamento con l'inibitore del cotrasportatore sodio-glucosio di tipo 2 associato a RASB rispetto alla associazione cortisone e RASBs nei pazienti IgAN che presentano lesioni renali croniche alla biopsia renale. PROGETTO PER DUE STUDI CLINICI PROSPETTICI MULTICENTRICI RANDOMIZZATI IN APERTO PER VALUTARE L'EFFETTO DELLA TERAPIA PERSONALIZZATA IN PAZIENTI IgAN IN BASE AI RISULTATI DELLA BIOPSIA RENALE (CLIgAN).
Codice Protocollo	CLIgAN
Fase	III
Disegno dello Studio	Lo *study design* di questo progetto comprendente due studi clinici prospettici, multicentrici, randomizzati, in aperto, su pazienti IgAN (CLIgAN), basati sui risultati ottenuti dalla biopsia renale, è illustrato nella figura: 
Pazienti Target	Pazienti adulti con età tra 18 e 75 anni, che hanno ricevuto una diagnosi di nefropatia da IgA mediante biopsia renale saranno arruolati nel progetto CLIgAN
Background e Razionale	La nefropatia idiopatica da immunoglobulina A è la forma più frequente al mondo di glomerulonefrite. Tale malattia è più frequente in Asia rispetto all'Europa e all'America. Si stima che in Europa ci siano più di 500.000 pazienti

affetti da IgAN e che questa sia la principale forma di nefrite diagnosticata nei pazienti sottoposti a biopsia renale. Approssimativamente il 40% di questi pazienti arriva all'insufficienza renale cronica allo stadio terminale (ESKD) dopo 20 anni dalla biopsia renale. L'elevata prevalenza di ESKD dimostra che l'IgAN ha un elevato *impatto economico*, in quanto la terapia renale sostituiva risulta costosa, e *sociale* perché la malattia insorge nella seconda e terza decade di vita, quando i pazienti sono pienamente attivi dal punto di vista lavorativo. Questo aspetto rappresenta un motivo in più per passare da una terapia generalizzata per tutti i pazienti IgAN ad una terapia personalizzata.

La prima edizione delle linee guida KDIGO (*Kidney Disease Improving Global Outcomes*), pubblicate nel 2012, suggeriva differenti trattamenti terapeutici in base al quadro clinico che il paziente IgAN presenta.

Sono stati individuati tre tipologie di pazienti:

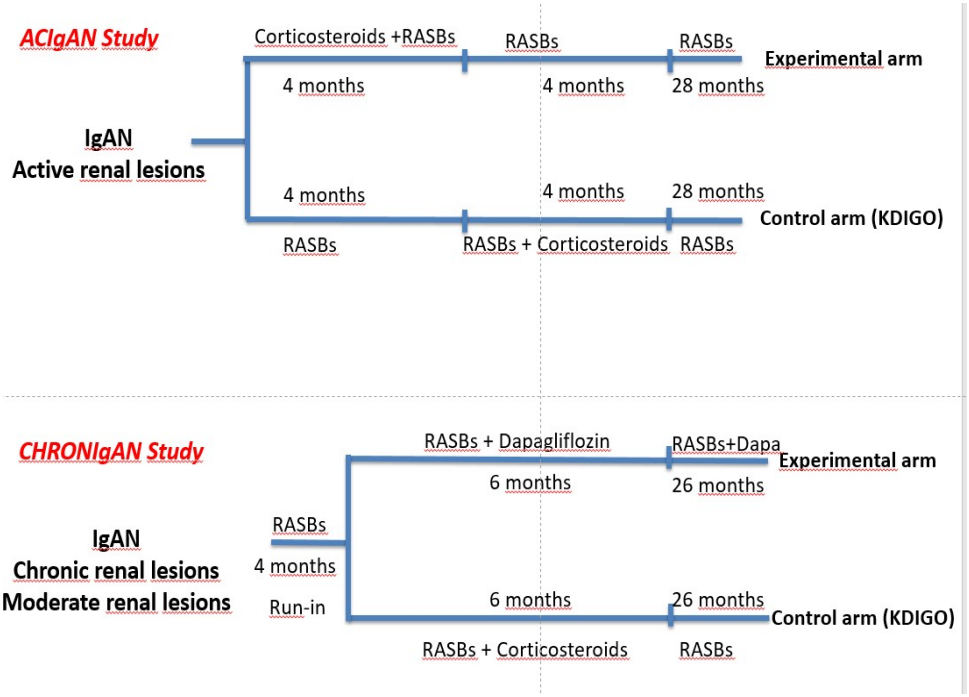
i) *Pazienti a basso rischio* presentano una minore manifestazione morfologica urinaria e proteinuria ≤ 0.5 g/24 ore, una funzione di filtrazione glomerulare (eGFR) normale ed una pressione arteriosa normale; necessitano solo di controlli annuali o semestrali senza terapia. Essi rappresentano solo il 5-10% della popolazione di pazienti IgAN.
ii) *Pazienti a rischio intermedio* presentano proteinuria > 0.5 g/24 ore con normale o ridotta funzione di filtrazione glomerulare (eGFR) e normale o elevata pressione arteriosa. Questi pazienti possono beneficiare della terapia continua di supporto (inibitori del sistema renina-angiotensina; RASB) quando la proteinuria è inferiore a 1g/24 ore e l'eGFR resta stabile. Quando la proteinura è > 1g/24 ore e l'eGFR (normale al basale) si riduce ma resta superiore a 50 ml/min/ 1.73 m^2, dopo tre mesi di terapia di supporto, i pazienti possono beneficiare della terapia corticosteroidea associata a quella di supporto per 6 mesi. Se l'eGFR è < 30 o oscilla tra 30 e 50 ml/min/1,73m^2, è raccomandata solo la terapia di supporto senza immunosoppressione, tranne per i pazienti che presentano una glomerulonefrite rapidamente progressiva.
iii) *Pazienti ad alto rischio* sono quelli con insufficienza renale rapida o acuta causata da una glomerulonefrite rapidamente progressiva o da sindrome nefrosica. Questi pazienti possono beneficiare di una terapia corticosteroidea combinata con agenti immunosoppressivi e terapia di supporto. Essi rappresentano il 2-5% della popolazione dei pazienti IgAN. In presenza di un'insufficienza renale acuta causata da globuli rossi impilati nei tubuli durante un episodio di macroematuria, è suggerita solo la terapia di supporto.

Queste indicazioni sono state confermate nella recente edizione delle linee guida KDIGO pubblicate nel 2021.

	Purtroppo, a causa della mancanza di evidenze sperimentali ottenute tramite studi clinici randomizzati controllati in questo contesto, le linee guida KDIGO non prendono in considerazione la presenza di lesioni renali attive e croniche al momento della biopsia renale come potenziali fattori predittivi "*effect modifier*" che potrebbero guidare le scelte terapeutiche. Tuttavia, quest'aspetto è ben riconosciuto nella pratica clinica. Infatti, pazienti con lesioni renali croniche non sembrano rispondere al trattamento immunosoppressivo rispetto a quelli con lesioni renali attive. Studi osservazionali supportano tali risultati clinici e il loro numero, la consistenza e l'*effect sizes* dimostrati per i trattamenti basati sui risultati della biopsia renale, forniscono elementi per la progettazione e la conduzione di studi randomizzati fondati sull'ipotesi specifica che la risposta possa essere modificata dai risultati della biopsia renale al *baseline*. Il nostro studio clinico su pazienti IgAN (CLIgAN), in primo luogo, prenderà in considerazione il tipo di lesioni renali e, inoltre, arruolerà pazienti nello studio ACIgAN e CHRONIgAN in base alla pratica correntemente raccomandata (RASB seguita da steroidi), rispetto a un approccio differenziale (trattamento precoce con steroidi o SGLT2) basato sui risultati della biopsia.
Obiettivi	**Obiettivi primari:** • Valutare l'effetto terapeutico sulla proteinuria, della terapia corticosteroidea precoce somministrata dopo biopsia renale, in pazienti IgAN con lesioni renali attive (ACIgAN), rispetto alla cura standard con soli RASB seguita da corticosteroidi in associazione con RASB; • Valutare l'effetto terapeutico sulla proteinuria, del Dapagliflozin (inibitore del co-trasportatore renale del sodio-glucosio di tipo 2, SGLT2i) associato con RASB, rispetto alla terapia con corticosteroidi associati con RASB in pazienti con lesioni croniche o moderate (CHRONIgAN), per consentire di evitare i potenziali effetti collaterali della terapia con corticosteroidi. **Obiettivi secondari:** • Valutare l'effetto dei trattamenti in studio sulla funzionalità renale e sulla progressione del danno renale nei pazienti IgAN a 3 anni. • Valutare se la terapia personalizzata ritarda la compromissione della funzionalità renale, dopo la previsione di ESKD valutata mediante l'utilizzo del tool CDSS (Sistema di supporto alla decisione clinica) DialCheck al momento della biopsia renale.
Endpoints	**Endpoint primario:** • Differenza tra i bracci, in termini di riduzione della proteinuria entro 4 mesi e nei *non-responders* entro 8 mesi, nello studio ACIgAN • Differenza tra i bracci, in termini di riduzione della proteinuria entro 10 mesi, nello studio CHRONIgAN.

	Endpoints secondari: • Declino dell'eGFR nell'arco di 3 anni, calcolato come media del declino individuale, ottenuto da una analisi di regressione lineare di eGFR; • Diminuzione dell'eGFR > 40 % dal valore basale; • Evento composito: diminuzione dell'eGFR > 40%, insufficienza renale terminale (definita come eGFR a lungo termine ≤ 15 ml/min/1.73m^2 per più di tre mesi o necessità di iniziare la dialisi o ricevere un trapianto renale) oppure decesso dovuto a malattia renale; • differenza assoluta tra l'ultimo valore di eGFR e quello basale; • funzione renale stabile definita come diminuzione dell'eGFR ≤ 5 ml/min/1.73 m^2 al termine dei tre anni di follow-up; • cambiamento annuale medio nella riduzione del reciproco della creatininemia sierica; • proteinuria media nel tempo (TA-P) calcolata come media ponderata di tutte le proteinurie dosate dopo la randomizzazione e pesate in base all'intervallo di tempo trascorso tra una misurazione e l'altra; • declino della proteinuria nell'arco di 3 anni, calcolato come media del declino individuale, ottenuto tramite una analisi di regressione lineare della proteinuria giornaliera; • remissione completa della proteinuria, definita come il raggiungimento di un valore della proteinuria ≤ 0.2 g/24 ore o di un rapporto proteinuria/creatinuria ≤ 0.2 g/g; • remissione parziale della proteinuria definita come il raggiungimento di una riduzione del valore della proteinuria ≥ 50% o superiore rispetto al valore basale.
Numero di Centri	Oltre i 30
Numero di Pazienti	432 pazienti: • 132 pazienti (66 pazienti per gruppo, inclusa una percentuale di dropout del 10%, nel **trial ACIgAN)** • 300 pazienti (150 pazienti per gruppo, inclusa una percentuale di dropout del 10%, nel **trial CHRONIgAN**)
Criteri di Selezione	**Criteri di Inclusione:** **<u>ACIgAN study</u>** 1. Pazienti adulti con età tra 18 e 75 anni. 2. Consenso informato scritto. 3. Diagnosi di nefropatia idiopatica da IgA (IgAN), effettuata mediante biopsia renale entro 2 settimane, con lesioni renali attive (E1 e/o C1). 4. eGFR ≥ 30 ml/min/1.73 m^2. 5. proteinuria ≥ 0.5 g/24 ore.

	6. pazienti già in trattamento o candidati al trattamento con RASB (sia inibitori dell'enzima di conversione dell'angiotensina, ACEi, sia antagonisti del recettore dell'angiotensina II, sartani), secondo pratica clinica, in accordo alle attuali linee guida KDIGO. **<u>CHRONIgAN study</u>** 1. Pazienti adulti con età tra 18 e 75 anni. 2. Consenso informato scritto; 3. Diagnosi di nefropatia idiopatica da IgA (IgAN), effettuata mediante biopsia renale entro 4 settimane, con lesioni renali croniche (T1,2) o moderate (M0, 1, S0, 1, E0, T0, C0) con alto o molto alto rischio di malattia renale cronica. 4. eGFR ≥ 30 ml/min/1.73 m^2. 5. proteinuria ≥ 0.5 g/24 ore 6. pazienti già in trattamento o candidati al trattamento con RASB (sia inibitori dell'enzima di conversione dell'angiotensina, ACEi, sia antagonisti del recettore dell'angiotensina II, sartani), secondo pratica clinica, in accordo alle attuali linee guida KDIGO. **Criteri di Esclusione**: 1. Diagnosi di IgAN non provata da biopsia renale. 2. Pazienti IgAN con lesioni istologiche minime alla biopsia renale e sindrome nefrosica. 3. Pazienti IgAN con macroematuria ed insufficienza renale acuta. 4. Pazienti IgAN con glomerulonefrite rapidamente progressiva (presenza di lesioni extracapillari in più del 25% dei glomeruli evidenziate alla biopsia renale). 5. Pazienti con IgAN secondaria (nefrite lupica, porpora di Schoenlein-Henoch, cirrosi epatica). 6. Pazienti con IgAN sovrapposta in trapianto renale. 7. Pazienti con altri tipi di malattie glomerulari 8. Pazienti con rene solitario 9. Pazienti con malattia renale allo stadio terminale 10. Alterazioni emorragiche non responsive al trattamento 11. Pazienti con infarto del miocardio o ictus cerebrale nei precedenti sei mesi. 12. Malattie epatiche severe, infezioni in atto, neoplasie 13. Diabete scompensato (glicemia > 200 mg/dL e HbA1c > 7.5%). 14. Necrosi asettica di un qualunque osso. 15. Trattamenti precedenti con una qualsiasi terapia immunosoppressiva. 16. Altre condizioni morbose che possono essere esacerbate dalla terapia corticosteroidea. 17. Precedenti effetti avversi e/o controindicazioni ai RASB e ai SGLT2i. 18. Gravidanza e allattamento.

	19. Se donne in età fertile: pazienti non disponibili a utilizzare misure contraccettive altamente efficaci durante il periodo di trattamento di studio e fino a un mese dopo l'ultima dose di farmaci in studio.
Prodotti Sperimentali	Metilprednisolone succinato e prednisone (Corticosteroidi, CS) Dapagliflozin (Inibitore del cotrasportatore Sodio-glucosio di tipo 2, SGLT2-i)
Trattamenti	 I pazienti saranno randomizzati separatamente in ciascun trial (rapporto di allocazione 1:1). Essi saranno stratificati in base all'età e al sesso in ogni centro. **ACIgAN trial** Braccio sperimentale: Terapia precoce con corticosteroidi in associazione con RASB, seguiti dal trattamento con soli RASB Braccio di controllo (terapia standard): trattamento con soli RASB, seguito da corticosteroidi in associazione con RASB e seguito da soli RASB. **CHRONIgAN trial** Braccio sperimentale: Terapia con RASB seguita da Dapaglifozin in associazione con RASB Braccio di controllo (terapia standard): Trattamento con soli RASB, seguito da Corticosteroidi in associazione con RASB e seguito da soli RASB.
Dimensione campionaria e	**ACIgAN**. I dati presenti in letteratura hanno dimostrato una differenza significativa nella sopravvivenza renale tra pazienti trattati con corticosteroidi ei controlli, se si assume come clinicamente rilevante una differenza del 50% dell'esito primario (ad es. differenza tra i bracci del delta della proteinuria delle

Considerazioni statistiche	24 ore tra il valore basale e quello a 6 mesi). Pertanto, si assume che la differenza media tra il valore basale della proteinuria e quello a 6 mesi possa essere 0,6±1,0 g/24ore (±SD) nei pazienti trattati soltanto con RASB (braccio di controllo) e 1,2±1,0 gr/24 ore (±SD) nei pazienti trattati con corticosteroidi e RASB (braccio sperimentale). Sulla base di queste ipotesi, è stata calcolata una dimensione campionaria di 132 pazienti (66 pazienti per braccio, incluso anche un 10% di dropout di pazienti) per una potenza statistica del 90%, un valore di p a due code di 0,05 e 3 anni di reclutamento dei pazienti. Se il numero dei pazienti arruolati sarà insufficiente dopo 3 anni dall'inizio, si proseguirà il periodo di reclutamento per altri 2 anni. **CHRONIgAN.** I dati della letteratura hanno dimostrato una differenza significativa nella sopravvivenza renale tra pazienti che hanno ricevuto SGLT2-i e il gruppo controllo. D'altro canto, non ci sono dati in letteratura che hanno valutato la differenza nella sopravvivenza renale o nella proteinuria tra SGLT2is e gli steroidi. Pertanto, per questo primo studio comparativo, i ricercatori hanno ipotizzato un campione opportunistico di 300 pazienti (150 pazienti per gruppo, considerando un tasso di dropout del 10%).
Tempistiche stimate	Periodo di arruolamento: 3 anni Periodo di trattamento e follow-up: 3 anni + 30 giorni

Lista delle abbreviazioni

ACEi	
ACIgAN	*Pazienti IgAN con lesioni renali attive*
AE	*Eventi avversi*
AKI	*Danno renale acuto*
ARB	*Bloccanti del recettore dell'Angiotensina*
AZA	*Azatioprina*
BrdU	*Bromodeossiuridina*
C	*Proliferazione extracapillari, mezzelune*
CDSS	*Sistema di supporto alle decisioni cliniche*
CHRONIgAN	*Pazienti IgAN con lesioni renali CRONIche*
CI	*Intervallo di confidenza*
CKD	*Malattia renale cronica*
CKD-EPI	*Collaborazione epidemiologica della malattia renale*
COVID-19	*Malattia CoronaVirus 2019*
CRO	*Organizzazione di ricerca a contratto*
CS	*Corticosteroidi*
CSR	*Rapporto di studio clinico*
CXCL6	*Ligando per chemochine C-X-C 6*
CYP	*Ciclofosfamide*
DEFA4	*Defensina alfa 4*
DEGs	*Geni differenzialmente espressi*
E	*Ipercellularità Endocapillare*
ECG	*Elettrocardiogramma*
eCRF	*Modulo elettronico di segnalazione del caso*
eGFR	*Tasso di filtrazione glomerulare stimato*
Elisa	*Saggio di immunoassorbimento enzimatico*
ESKD	*Malattia renale allo stadio terminale*
FACS	*Ordinamento cellulare attivato da fluorescenza*
FAR2	*Acil-CoA reduttasi grassa 2*

g/24 ore	*Grammo per 24 ore*
g/giorno	*Grammi al giorno*
g/g	*Grammo per grammo*
GCP	*Linee guida per la buona pratica clinica*
Gd-IgA1	*Immunoglobulina A1 carente di galattosio*
GEE	*Equazioni di stima generalizzate*
GFR	*Velocità di filtrazione glomerulare*
HbA1c	*Emoglobina A1c*
ICH	*Conferenza internazionale sull'armonizzazione*
IgA	*Immunoglobulina A*
IgAN	*Nefropatia da Immunoglobulina A*
IgG	*Immunoglobulina G*
IHC	*Immunoistochimica*
IP	*Prodotto sperimentale*
ITGAX	*Subunità dell'Integrina Alpha X*
KDIGO	*Malattia renale: miglioramento dei risultati globali*
LMM	*Modelli misti lineari*
LTB	*Linfotoissina Beta*
M	*Ipercellularità mesangiale*
m^2	*Metro quadrato*
MD	*Medico*
MEq/L	*Milliequivalenti per litro*
MEST-C score	*Ipercellularità mensangiale (M), ed endocapillare (E), sclerosi segmentali (S), fibrosi interstiziale/atrofia tubulare (T), mezzelune (C)*
mg/giorno	*Milligrammi al giorno*
mg/dL	*Milligrammi per decilitro*
mg/Kg	*Milligrammi per chilogrammo*
mg/Kg/bw	*Milligrammi per chilogrammo di peso corporeno*
min.	*Minuto*

ml/min	*Millilitri al minuto*
MMF	*Micofenolato mofetile*
mmHg	*Millimetri di mercurio*
PBMC	*Cellula mononucleata del sangue periferico*
PI3K/Akt	*Fosfatidilinositolo 3 fosfato chinasi/proteina chinasi*
RASBs	*Bloccanti del sistema renina-angiotensina*
RCTs	*Prove controllate randomizzate*
RNA	*Acido ribonucleico*
RT-PCR	*Trascrizione inversa – Reazione a catena della polimerasi*
S	*Sclerosi glomerulare segmentale*
SAE	*Evento avverso grave*
SD	*Deviazione standard*
SGLT2i	*Inibitore del co-trasportatore sodio-glucosio-2*
T	*Atrofia tubulare/fibrosi interstiziale*
TA-P	*Proteinuria media nel tempo*
TNFAIP6	*Proteina 6 indotta dal fattore di necrosi tumorale*
TNFR	*Recettore del fattore di necrosi tumorale*
WNT-B-catenina	*Via Wnt-B-catenina*
WOCBP	*Donne in età fertile*

1. INTRODUZIONE

Ciò che è noto

La IgA nefropatia idiopatica (IgAN) è la forma più frequente di glomerulonefrite che viene diagnosticata mediante la biopsia renale nel mondo. La malattia è più frequente nei paesi asiatici che in quelli europei ed americani (1). Si stima che in Europa ci siano 500.000 pazienti e che sia la più frequente nefrite diagnosticata nei pazienti sottoposti a biopsia renale. Approssimativamente il 40% di questi pazienti arriva all'insufficienza renale cronica terminale (IRCT) dopo 20 anni dalla biopsia renale (2,3). L'elevata prevalenza di IRCT dimostra che IgAN ha un notevole impatto economico perché la terapia renale sostitutiva (dialisi) è costosa. Inoltre, la comparsa della malattia nella seconda e terza decade di vita rappresenta un problema di natura sociale perché i soggetti giovani sono tipicamente molto attivi e altamente produttivi nell'ambiente di lavoro. La comparsa della malattia riduce le prestazioni lavorative. Questo aspetto è un elemento importante che suggerisce la necessità di individuare una terapia specifica e possibilmente personalizzata per i pazienti per ottenere la guarigione.

L'ultima edizione delle linee guida (KDIGO), pubblicate nel 2012 (4), suggerisce differenti trattamenti terapeutici per i pazienti affetti da IgAN in base alle impostazioni cliniche.

Principalmente sono stati individuati tre tipi di pazienti:

- *Pazienti a basso rischio* che presentano anomalie urinarie e proteinuria < 0,5 g/die, normale filtrazione glomerulare stimata (eGFR) e pressione arteriosa normale; Questi pazienti necessitano solo di controlli annuali o biennali senza la terapia. Essi sono solo il 5-10 % dei pazienti IgAN.
- *Pazienti a rischio intermedio* che presentano una proteinuria > 0,5 g/die con normale o ridotta eGFR, normale o elevata pressione arteriosa. Questi pazienti possono beneficiare della terapia di supporto, costituita da ACE-inibitori (ACE-i; RASBs) quando la proteinuria è < 1 g/die e l'eGFR resta stabile. Quando la proteinuria è > 1gr e l'eGFR (normale al basale) si riduce a <rapidamente 50 ml/min/1,73 m^2, dopo tre mesi di terapia continua di supporto, i pazienti possono beneficiare della terapia di supporto associata a quella corticosteroidea effettuata per 6 mesi. Quando eGFR è meno di 30 ml/min o oscilla tra 30 e 50 ml/min/1,73m^2, solo il trattamento di supporto è raccomandato senza immunosoppressione, eccetto per pazienti che presentano una glomerulonefrite rapidamente progressiva.
- *Pazienti ad alto rischio* perdita rapida o acuta di eGFR causata da una glomerulonefrite rapidamente progressiva o sindrome nefrosica possono beneficiare della terapia corticosteroidea combinata con quella immunosoppressiva e la terapia di supporto. Questi pazienti rappresentano solo il 2-5%. In presenza di una insufficienza renale acuta (AKI) causata da globuli rossi impilati nei tubuli durante l'episodio di macroematuria, è sufficiente solo la terapia di supporto.

Queste indicazioni sono state confermate nella recente edizione delle linee guida KDIGO 2021 (5). Sfortunatamente, le linee guida KDIGO non prendono in considerazione le lesioni renali attive o croniche al momento della biopsia renale per una decisione terapeutica perché mancano evidenze basate su studi clinici randomizzati. Anche se un tale approccio sarebbe supportato tenendo presente che le lesioni MEST-C della classificazione di Oxford (6-8) sono state validate nella coorte di pazienti IgAN arruolati nello studio VALIGA (9). La classificazione MEST-C distingue le lesioni renali attive (proliferazioni endocapillari (E) e lesioni extracapillari C1-2) dalle lesioni renali croniche (danno tubulo-interstiziale T1,2).

Nella pratica clinica, è noto che i pazienti con lesioni renali attive sono più responsivi a trattamenti immunosoppressivi rispetto a pazienti con lesioni croniche osservate alla biopsia renale. Partendo da questo concetto per i pazienti con lesioni renali croniche la terapia immunosoppressiva non è indicata, ma ciò non è stato dimostrato nel contesto di uno studio clinico randomizzato. Abbiamo studiato l'effetto della terapia (corticosteroidea e/o farmaci immunosoppressori) in pazienti con IgAN documentata alla biopsia renale. Le pubblicazioni prese in considerazione sono elencate nella **Tabella 1** in cui sono state riportate le conclusioni degli studi. Gli studi clinici retrospettivi e prospettici e le meta-analisi mostrano che la terapia corticosteroidea e/o immunosoppressiva riduce il numero delle lesioni renali attive in biopsie renali ripetute (10-15). Inoltre, c'è un miglioramento della proteinuria e della funzione renale (16-20). Questi risultati non si osservano nei pazienti IgAN con lesioni renali croniche.

Tabella 1. Studi clinici retrospettivi e prospettici, review sistematiche e meta analisi di studi clinici randomizzati che dimostrano il beneficio dei corticosteroidi e/o della terapia immunosoppressiva nei pazienti con le lesioni renali attive con miglioramento della prognosi renale.

Autori	Ref (no.)	Tipo di studio	Conclusioni
Shen XH et al.	10	Retrospettivo	IS riduce le lesioni renali attive (E1, C1,2); confermato da biopsie renali ripetute.
Moriyama et al.	11	Retrospettivo	CS/IS migliorano la prognosi renale a lungo termine nei pazienti IgAN con lesioni renali attive (E1, S1 e C1).
Luo M et al.	12	Retrospettivo	Biopsie renali ripetute dimostrarono che CS/IS riducono il numero di semilune (C1,2)
Itami S et al.	13	Retrospettivo	Presenza di necrosi fibrinoide con semilune (C) o lesioni renali endocapillari (E) è un indicatore per i pazienti che possono beneficiare della terapia immunosoppressiva.
Tumulin JA et al.	14	Prospettico	CS riduce le lesioni proliferative, proteinuria e stabilizza la funzione renale.
Yang P et al.	15	Review Sistematica	Pazienti con lesioni renali (M1, S1 e T1,2) sono più responsivi a CS rispetto a pazienti con lesioni renali lievi (M0, S0, T0). E1 ha meglio risposto a CS che T1 e T2.
Tesar V et al.	16	Retrospettivo	CS riduce la proteinuria e il rischio di progressione della malattia.
Guo Y et al.	17	Retrospettivo	Presenza di necrosi fibrinoide con semilune (C) o lesioni renali endocapillari (E) è un indicatore istologico per i pazienti che possono beneficiare della terapia immunosoppressiva.
Li Y et al.	18	Retrospettivo	I boli endovena di CS combinati con un successivo basso dosaggio di prednisone è un trattamento opzionale per pazienti ad alto rischio IgAN.
Natale P. et al.	19	Review Sistematica	La terapia CS probabilmente previene il declino dell'eGFR o raddoppio della creatinina sierica (sCr) e della proteinuria negli pazienti adulti e nei bambini con IgAN.
Tan J. Et al.	20	Review Sistematica	CS ritarda significativamente la progressione del danno renale con eventi avversi accettabili. CS sono raccomandati come prima linea di terapia immunosoppressiva.

CS: Corticosteroidi; IS: Farmaci immunosoppressori

Gli studi di riferimento (10-15) sembrano adattarsi ad alcuni dei criteri Bradford Hill (21) per l'accertamento di casualità, in modo specifico i) ci sono parecchie osservazioni di studi retrospettivi (10-12), uno studio prospettico (14) ed una review sistematica (15) che esplorano l'associazione tra il tipo di lesione alla biopsia renale e la risposta al trattamento immunosoppressivo; ii) c'è una coerenza tra gli studi nei risultati che le lesioni renali attive possono rispondere agli immunosoppressori; al contrario delle lesioni croniche che non ne beneficiano; questi dati sono stati ottenuti da ricercatori di differenti paesi del mondo; iii) c'è una forte correlazione tra il differente tipo di lesione renale e la risposta alla terapia immunosoppressiva. Alla luce di questa consolidata esperienza clinica pragmatica, basata su numero, coerenza e potenza dei risultati ottenuti con gli studi osservazionali, sembra esserci un ottimo supporto scientifico per la progettazione e conduzione di uno studio clinico randomizzato in cui gli interventi terapeutici per la nefropatia IgA sono basati sui risultati della biopsia renale.

Ciò che non è noto

Non ci sono dati sui diversi trattamenti delle lesioni renali attive e croniche in pazienti IgAN, ottenuti mediante trial clinici randomizzati (RCT). Gli ultimi RCT, in cui sono stati somministrati gli steroidi e/o immunosoppressori (STOP IgAN e TESTING), le lesioni renali della biopsia renale al tempo di arruolamento non erano considerate. Pertanto i pazienti con lesioni renali attive e croniche ricevevano tutti lo stesso trattamento, indipendentemente dai risultati della biopsia renale. In considerazione di ciò, recentemente, i ricercatori dello studio TESTING hanno programmato analisi post-hoc per valutare l'effetto della terapia sulle lesioni renali (24).

Negli studi STOP IgAN e TESTING, i pazienti venivano iscritti dopo 3-6 mesi di terapia RASB secondo le attuali cure standard. Uno studio recente di istologia (25), basato due biopsie renali consecutive effettuate secondo protocollo, mostrava un cambiamento dinamico delle lesioni renali attive e croniche durante il corso clinico della malattia. Infatti, dopo 3-6 mesi, le lesioni renali attive, non solo nella IgAN ma in altre glomerulonefriti (es. lupus nefrite), diventano croniche e i corticosteroidi possono, non esercitare alcun ruolo. Questo punto è stato commentato da Troyanov et al (26) in un recente articolo pubblicato da Itami et al (13), sebbene questo aspetto deve essere formalmente esplorato nel contesto di uno studio clinico randomizzato.

Perché lo studio CLIgAN

Abbiamo disegnato lo studio CLIgAN nel quale i pazienti IgAN con documentata biopsia renale, presentando lesioni renali attive o croniche, riceveranno differenti trattamenti in considerazione dei punti sopra descritti.

Pertanto, CLIgAN è il primo studio clinico randomizzato che prenderà in considerazione il tipo di lesione renale ed i pazienti saranno iscritti separatamente in due RCT basati sulla presenza di lesioni bioptiche attive e croniche.

In recenti studi, gli inibitori orali sodio- glucosio cotrasportatore 2 (SGLT2i) sono stati somministrati in pazienti con nefropatia diabetica di tipo 2 e anche in pazienti con malattia renale cronica (CDK), alcuni di loro erano affetti da IgAN (27-31). L'effetto di SGLT2i è stato comparato con placebo. Tutti i pazienti avevano ricevuto terapia RASB. I pazienti con IgAN che hanno ricevuto SGLTi2 hanno presentato un significativo basso rischio di un endpoint composito (declino sostenuto di eGFR di almeno il 50%,

ESKD, o morte per cause cardiovascolari o renali), indipendentemente dalla presenza o assenza di diabete (30,31). Tutti i pazienti avevano ricevuto una biopsia renale mesi o anni prima l'arruolamento.

Nello studio CLIgAN i pazienti riceveranno per la prima volta Dapagliflozin dopo la biopsia renale in presenza di lesioni renali croniche o moderate con alto rischio di CKD. Lo studio dovrebbe iniziare ad Ottobre 2022 quando il farmaco sarà disponibile per tutti i pazienti con CDK.

1.2. Razionale dello studio

Nello studio CLIgAN, abbiamo stabilito di valutare

i. L'effetto della terapia corticosteroidea ad inizio precoce combinata con RASB (braccio sperimentale) rispetto a RASB da solo in pazienti IgAN con lesioni renali attive (ACIgAN) che riceveranno corticosteroidi dopo 4 mesi di RASB (cura standard) in presenza di proteinuria persistente ≥ 0,5 gr/24 ore e eGFR ≥ 30ml/min/1.73^2 (braccio di controllo).

ii. L'effetto di SGLT2i (dapagliflozin) combinato con RASB (braccio sperimentale) rispetto ai corticosteroidi combinati con RASB (braccio di controllo) nei pazienti IgAN con lesioni renali croniche o moderate (CHRONIgAN) dopo una prima fase di 4 mesi in cui riceveranno solo RASB (cura standard).

In entrambi gli studi i pazienti arruolati nei bracci di controllo saranno trattati secondo le raccomandazioni basate sull'evidenza (cure standard) fornite all'interno delle linee guida KDIGO.

In conclusione, valuteremo l'effetto dei corticosteroidi nella fase iniziale della malattia nei pazienti IgAN con lesioni renali attive (ACIgAN) e l'effetto della Dapagliflozin. nei pazienti IgAN con lesioni renali croniche o moderate (CHRONIgAN) per evitare in questi la terapia con corticosteroidi.

Forniremo anche una previsione del rischio ESKD utilizzando il nostro tool DialCheck, sviluppato mediante l'intelligenza artificiale (32).

1.3. Studio dei farmaci utilizzati

Corticosteroidi

Metilprednisolone (SOLU-MEDROL)

Il metilprednisolone è un potente steroide antinfiammatorio. Ha una maggiore potenza del prednisolone ed una tendenza ancora minore del prednisolone a indurre ritenzione di sodio e acqua. La sua attività antinfiammatoria è almeno cinque volte quella dell'idrocortisone.

Il metilprednisolone sodio succinato ha le stesse azioni metaboliche e antinfiammatorie del prednisolone. Quando vengono somministrati per via parenterale ed in quantità equimolari, i due composti sono equivalenti nell'attività biologica. La potenza relativa del prednisolone sodio succinato e dell'idrocortisone sodio succinato, come indicato dalla diminuzione della conta degli eosinofili, dopo somministrazione endovenosa, è di almeno quattro a uno.

Tra gli usi, è indicato per indurre la remissione delle lesioni renali attive e della proteinuria nei pazienti con IgAN (13, 14, 18) e in altre malattie renali come la sindrome nefrosica idiopatica (33,34) e la nefrite lupica (35).

Prednisone

Il prednisone, pur presentando il tipico profilo steroideo del glucocorticoide, si differenzia dal cortisone, dal quale deriva per deidrogenazione in posizione 1,2 della molecola, per la sua capacità di aumentare (in media 4 volte rispetto al cortisone) tutte quelle attività farmacologiche connesse con le proprietà antireattive di questa classe di compositi. Il prednisone non possiede di per sé un'attività biologica, ma si attiva nell'organismo in quanto subisce, ad opera delle reduttasi epatiche che riducono il chetone in posizione 11 ad ossidrile, una rapida conversione a prednisolone che rappresenta il metabolita steroideo attivato. In condizioni normali questo processo avviene velocemente e totalmente nel fegato, tanto che prednisone e prednisolone possono essere farmacologicamente equivalenti.

Studi condotti in diversi modelli sperimentali, oltre a dimostrare la notevole affinità antinfiammatoria del cortisone, hanno indicato che il prednisone è in grado di influenzare la neoglicogenesi, stimolare la deposizione di glicogeno epatico, determinare un effetto riducente degli eosinofili, prolungare il tempo di sopravvivenza in animali surrenectomizzati, per proteggere i ratti dall'avvelenamento acuto da albume d'uovo, per inibire la crescita ponderale e per antagonizzare le alterazioni indotte sperimentalmente nell'endotelio delle vene e dei capillari. Infine, le esperienze effettuate sull'escrezione idrominerale hanno dimostrato che la somministrazione di dosi terapeutiche di prednisone determina un benefico aumento della diuresi e dell'eliminazione del sodio, senza stimolare l'escrezione urinaria del potassio.

Il prednisone è stato somministrato in pazienti con IgAN (10-12), nelle glomerulonefriti proliferative primarie e secondarie (36) per ridurre il processo infiammatorio a livello glomerulare.

Dapagliflozin (SGLT2i)

Dapagliflozin è un inibitore altamente potente (Ki: 0,55 nM), selettivo e reversibile di SGLT2.

L'inibizione di SGLT2 da parte di dapagliflozin riduce il riassorbimento del glucosio nel tubulo renale prossimale con una concomitante riduzione del riassorbimento di sodio che porta ad una maggiore escrezione urinaria di glucosio e ad una diuresi osmotica. Dapagliflozin, quindi, aumenta il rilascio di sodio nel tubulo distale aumentando il feedback tubulo-glomerulare e riducendo la pressione intraglomerulare. Questa proprietà del farmaco, associata alla diuresi osmotica, porta ad una riduzione del sovraccarico di volume, ad una riduzione della pressione sanguigna e ad un minore pre-carico e post-carico, che possono avere effetti benefici sul rimodellamento cardiaco e preservare la funzione renale. Altri effetti includono un aumento dell'ematocrito e la riduzione del peso corporeo.

I benefici cardiaci e renali della dapagliflozin non dipendono esclusivamente dall'effetto ipoglicemizzante e non sono limitati ai pazienti con diabete, come dimostrato gli studi DAPA-HF e DAPA-CKD (29,30).

Dapagliflozin migliora i livelli di glucosio plasmatico sia a digiuno che post –prandiale riducendo il riassorbimento renale del glucosio che porta all'escrezione urinaria del glucosio. Questa escrezione di glucosio (effetto gluretico), osservata dopo la prima dose, continua nell'intervallo di somministrazione di 24 ore e si mantiene per tutta la durata del trattamento. Pertanto, dapagliflozin viene somministrato una volta al giorno (29-31).

La quantità di glucosio rimossa dal rene attraverso questo meccanismo dipende dalla concentrazione di glucosio nel sangue e dalla velocità di filtrazione glomerulare. Pertanto, nei soggetti con glicemia normale, Dapagliflozin ha una bassa propensione a causare ipoglicemia. Dapagliflozin non altera la normale produzione endogena di glucosio in risposta all'ipoglicemia. Dapagliflozin agisce indipendentemente dalla secrezione e dall'azione dell'insulina. Negli studi clinici con Dapagliflozin è stato osservato un miglioramento nella valutazione del modello di omeostasi per la funzione delle cellule beta (HOMA- beta cell).

L'SGLT2 è espresso selettivamente nel rene. Dapagliflozin non inibisce altri importanti trasportatori di glucosio nei tessuti periferici ed è > 1,400 volte più selettivo per SGLT2 rispetto a SGLT1, il principale trasportatore presente nell'intestino che è responsabile dell'assorbimento del glucosio (37,38).

1.4 Bloccanti del sistema renina-angiotensina

Il ruolo del sistema renina-angiotensina-aldosterone nella fisiopatologia dell'ipertensione e delle malattie cardiovascolari e renali è ben noto Esso è un importante regolatore della pressione sanguigna agendo sui fluidi corporei e sull'omeostasi degli elettroliti. Per due decenni, RASB è stato il cardine del trattamento della malattia renale cronica (CKD). Studi clinici hanno dimostrato che la prescrizione di una terapia con soli inibitori dell'enzima di conversione dell'angiotensina o bloccanti del recettore dell'angiotensina riduce l'albuminuria e rallenta la progressione della nefropatia nei pazienti con diabete. Nelle linee guida di pratica clinica, RASB è raccomandato come farmaco antipertensivo di scelta nei pazienti con CKD con o senza diabete (39,40).

1.5 Dichiarazione generale di rischio e benefico

Il principale vantaggio dei pazienti con IgAN arruolati nel presente studio sarà una terapia mirata basata sulle lesioni renali descritte nella relazione sulla biopsia renale, dato l'equilibrio esistente tra gli studi scientifici che possono valutare il ruolo della biopsia renale nell'indirizzo terapeutico, alla luce di prove pratiche empiriche significative e osservative forti e coerenti a sostegno di un potenziale nesso causale.

Questo può essere un vantaggio per i pazienti con IgAN, in linea con quanto supportato dal punteggio MEST-C della classificazione Oxford, validato nella coorte di pazienti IgAN nello studio VALIGA (9). Ad oggi, le attuali linee guida KDIGO non considerano la presenza di lesioni renali attive e croniche al momento della biopsia renale per decisione terapeutica, sulla base della mancanza di dati sperimentali; questa domanda sembra molto rilevante alla luce della conoscenza pragmatica della pratica clinica e dei risultati degli studi di coorte, della loro forza e coerenza.

I potenziali rischi e benefici di questo studio clinico randomizzato sono principalmente correlati ai trattamenti in studio e sono elencati qui di seguito. Le azioni/modalità di riduzione dei rischi sono specificate, tra parentesi, nella sezione "Rischi da farmaci".

Rischi da farmaci

Corticosteroidi: ipertensione (farmaci antipertensivi, ritenzione idrica (diuretici), iperglicemia (farmaci antidiabetici o insulina), ipotrofia muscolare (esercizio fisico quotidiano), iperlipidemia (agenti ipolipemizzanti), aumento del peso corporeo (dieta).

RASB: allergia (farmaci antiallergici o basse dosi di corticosteroidi), angioedema (corticosteroidi), ipotensione (riduzione della dose), iperkalemia (dieta o resina a scambio cationico), compromissione della funzione renale (riduzione della dose o sospensione temporanea), insufficienza renale acuta (sospensione del farmaco).

Dapagliflozin: allergia (farmaci antiallergici o basse dosi di corticosteroidi), iperlipidemia (agenti ipolipemizzanti), ipoglicemia (sospensione del farmaco), compromissione della funzionalità renale (riduzione della dose o sospensione temporanea), insufficienza renale acuta (sospensione del farmaco).

Benefici del farmaco

Riduzione della proteinuria, miglioramento della proteinuria media nel tempo (TA-P), riduzione della pendenza della proteinuria, riduzione della pendenza dell'eGFR, malattia renale cronica terminale ritardata.

2. Obiettivi

Nel nostro progetto desideriamo valutare:

2.1 Obiettivi primari

- L'effetto terapeutico immediato sulla proteinuria, dopo terapia corticosteroidea precoce, somministrata dopo la biopsia renale in pazienti IgAN con lesioni renali attive (ACIgAN) rispetto alla cura standard del solo RASB seguito da terapia corticosteroidea nei non responders;
- L'effetto terapeutico di SGLT2i (Dapagliflozin) combinato con RASB sulla proteinuria rispetto ai corticosteroidi combinati con RASB in pazienti con lesioni renali croniche o moderate (CHRONIgAN); ciò al fine di evitare gli effetti collaterali della terapia con corticosteroidi.

2.2 Obiettivi secondari

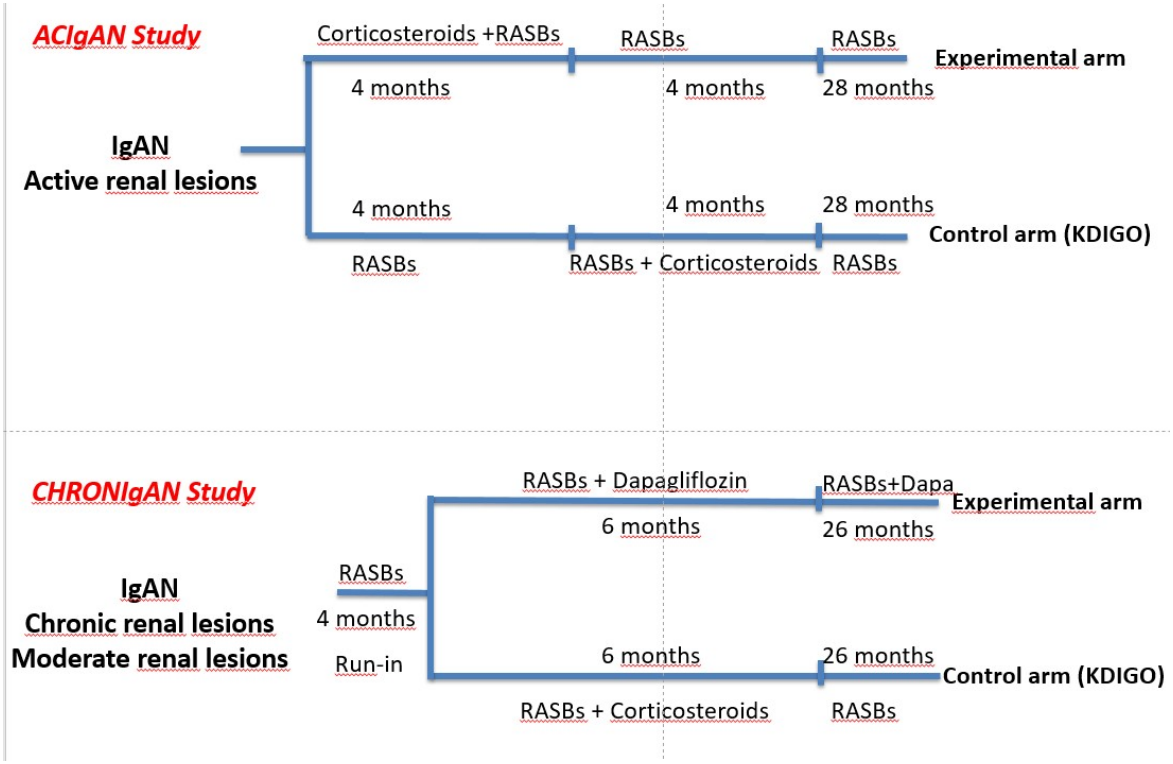
- L'effetto dei trattamenti in studio sulla funzione renale e sulla progressione del danno renale nei pazienti con IgAN seguiti per almeno 3 anni
- Dopo la previsione di ESKD valutata mediante il nostro tool DialCheck al momento della biopsia renale, osserveremo se la terapia personalizzata ritarda la compromissione della funzione renale.

3. DISEGNO DELLO STUDIO CLIgAN

Questo progetto comprende due studi clinici randomizzati, controllati, prospettici, multicentrici, in aperto (RCT) su pazienti con IgAN (CLIgAN) basati sul referto della biopsia renale (Figura 1).

La randomizzazione stratificata sarà effettuata per età o sesso nei centri renali.

Figura 1



STUDIO ACIgAN

I pazienti con lesioni renali attive (E1 e/o C1) in presenza di GFR ≥ 30 ml/min/1,73 m^2 e proteinuria delle 24 ore ≥ 0,5 gr saranno randomizzati in due bracci:

1. Corticosteroidi combinati con RASB per 4 mesi seguiti da solo RASB (braccio sperimentale);
2. RASB da solo per 4 mesi, seguito dalla combinazione di corticosteroidi e RASB per altri 4 mesi nei non-responders, e poi solo RASB (cura standard) come suggerito dalle linee guida KDIGO (5).

I pazienti assegnati al braccio sperimentale riceveranno entro 2 settimane dalla biopsia renale boli di metilprednisolone succinato (Solu-Medrol) da 500- 1000 mg. Un bolo il primo giorno e poi il 50% della dose nei due giorni succssivi, seguiti da prednisone somministrato per via orale (0,5 mg/Kg/peso corporeo) a giorni alterni sino al compimento del mese. Dopo tre mesi, i pazienti ridurranno gradualmente il dosaggio del prednisone orale, nel corso delle successive quattro settimane. Dopo 4 mesi di terapia riceveranno solo RASB.

La dose giornaliera di metilprednisolone sarà personalizzata in base al peso corporeo ideale (15 mg/kg peso corporeo). Il farmaco verrà somministrato in una singola dose per via endovenosa per 30-60 minuti. Per evitare obesità e diabete i corticosteroidi verranno somministrati solo al mattino.

Lo studio è stato disegnato su gruppi paralleli, due bracci, prova di superiorità con allocazione dei pazienti nel rapporto 1:1.

Come terapia standard, il RASB sarà somministrato alla dose massima tollerata per ottenere un effetto anti proteinurico in ogni paziente.

A nostra conoscenza, lo studio, che proponiamo, è il primo in cui i corticosteroidi saranno somministrati in associazione ad ACE-i o sartano subito dopo la biopsia renale in presenza di lesioni renali attive. Le linee guida KDIGO suggeriscono in questi casi prima una terapia con ACE-i o sartano per 3 mesi e successivamente un ciclo di corticosteroidi in presenza di una persistente proteinuria > 0,7-1,0 gr/24 ore. Questo approccio terapeutico, a nostro parere, non è corretto perché, dopo 3 mesi, le lesioni renali attive sono diventate croniche e non responsive alla terapia corticosteroidea. Le stesse lesioni istologiche cronicizzate avranno causato una riduzione della funzione renale.

Razionale del disegno dello studio

I corticosteroidi ad alto dosaggio sono stati somministrati in RCT di pazienti con IgAN (18,41), indipendentemente dal tipo di lesioni renali, nonostante l'evidenza empirica dalla pratica clinica e la forte e consistente evidenza degli studi osservazionali che le lesioni renali attive, identificate alla biopsia renale, possono avere un ruolo importante nella risposta al trattamento. Il nostro obiettivo è quello di valutare il beneficio della terapia corticosteroidea, somministrata precocemente, e dopo combinata con prednisone orale solo nei pazienti IgAN con lesioni renali attive. Nel nostro protocollo, abbiamo escluso la terapia immunosoppressiva (CS+CYP/AZA/MMF) perché gli studi clinici randomizzati hanno dimostrato che il potenziale compromesso tra benefici e danni è a favore dei danni (42).

A nostra conoscenza, questo è il primo studio in cui i corticosteroidi vengono somministrati precocemente dopo la biopsia renale in pazienti IgAN con lesioni renali attive. Sulla base delle evidenze esistenti in studi clinici randomizzati, le linee guida KDIGO suggeriscono in quei casi: RASB per 3-6 mesi e poi corticosteroidi in presenza di proteinuria persistente e GFR ≥30 ml/min/1,73m^2. Questo approccio terapeutico, sebbene supportato da studi clinici randomizzati può arrecare un danno al paziente perché dopo 3-6 mesi le lesioni renali attive diventano croniche e di conseguenza non è possibile trovare alcuna associazione tra l'esposizione ai corticosteroidi e la risposta clinica per i pazienti con IgAN. Nel nostro studio clinico randomizzato confrontiamo l'approccio standard, proposto dalle linee guida KDIGO (RASB per 3-6 mesi seguito da corticosteroidi), con un nuovo approccio costituito da una terapia precoce con corticosteroidi combinata con RASB dopo la biopsia renale.

STUDIO CHRONIgAN.

I pazienti con lesioni renali croniche (T1,2) o **lesioni moderate** (M0,1, S0,1; E0, C0, T0) saranno arruolati in uno studio a due bracci con rapporto di allocazione 1:1 per confrontare la Dapagliflozin combinata con RASB (braccio sperimentale) rispetto ai corticosteroidi combinati con RASB (braccio di controllo) dopo 4 mesi di trattamento con RASB. I pazienti arruolati avranno proteinuria ≥ 0,5 gr/24 ore e GFR ≥ 30ml/min/1,73m^2.

I pazienti inizieranno la terapia entro 4 settimane dalla biopsia renale.

I pazienti assegnati al braccio sperimentale riceveranno la terapia RASB (4 mesi di run-in) seguita da Dapagliflozin (10mg/giorno per via orale) in combinazione con RASB per un totale di 32 mesi consecutivi.

I pazienti assegnati al braccio di controllo riceveranno la terapia RASB (4 mesi di run-in) seguita dalla terapia con corticosteroidi orali (prednisone) per 6 mesi (0,4 mg/Kg di peso corporeo per 2 mesi e poi riduzione graduale di 5 mg/mese per 4 mesi), successivamente solo RASB per un totale di 36 mesi consecutivi.

Questo è uno studio di superiorità per gruppi paralleli, a due bracci, con rapporto di allocazione 1:1.

Razionale del disegno dello studio

Abbiamo deciso la combinazione di Dapagliflozin e RASB perché recentemente questo farmaco è stato somministrato a pazienti con diabete di tipo 2 e ad altri pazienti con CKD (alcuni di loro erano affetti da IgAN) (29-31). In questi studi, l'effetto del farmaco è stato confrontato con il placebo.

Nei nostri RCT, RASB somministrati per via orale saranno titolati al loro massimo effetto anti-proteinurico. Ad esempio, il Ramipril sarà somministrato con un dosaggio minimo di 2,5 mg/giorno e successivamente aumentato di 1,25 mg/giorno ogni 2 settimane per ridurre la proteinuria a 0,5 mg/24 ore e per raggiungere una pressione sistolica e diastolica <130/80 mmHg.

I pazienti saranno monitorati per valutare se la terapia sperimentale può ritardare il tempo per raggiungere l'ESKD predetto dal nostro tool DialCheck (32).

I pazienti passeranno ai bloccanti del recettore dell'angiotensina (ARB), in presenza di intolleranza agli ACE-inibitori (ACEI) con presenza di effetti collaterali. Ramipril verrà somministrato due volte al giorno (8.00 e 20.00) per controllare la pressione sanguigna. Se necessario, verranno somministrati altri farmaci antipertensivi. La kaliemia sarà controllata in modo da non superare i 5,5 mEq/L.

In conclusione, abbiamo progettato due RCT per studiare la terapia personalizzata in pazienti IgAN con biopsia documentata.

4. Partecipanti, tipo di intervento e decorso clinico

4.1 Categoria di pazienti

Pazienti adulti con età tra 18 e 75 anni, che hanno ricevuto la diagnosi di IgAN mediante biopsia renale documentata, saranno eleggibili per partecipare allo studio.

4.2 Criteri di eleggibilità

I criteri di inclusione ed esclusione sono illustrati nella lista seguente. I pazienti saranno arruolati nell' arco di 3 anni e la durata del follow-up per ogni paziente sarà di 3 anni.

4.2.1 Criteri di inclusione

4.2.1.1 Studio ACIgAN

1. Maschi e femmine di età dai 18 ai 75 anni
2. Modulo di consenso informato scritto
3. IgAN idiopatica, comprovata da biopsia, con lesioni renali attive (E1 e/o C1) entro 2 settimane.
4. e-GFR $\geq$ 30 ml/min/1,73m^2.
5. Proteinuria delle 24 ore $\geq$ 0,5g.
6. Pazienti in trattamento o candidati al trattamento con RASB (ACEI o ARB), secondo la pratica clinica, suggerita dalle attuali linee guida KDIGO

4.2.1.2 Studio CHRONIgAN

1. Maschi e femmine di età dai 18 ai 75 anni
2. Modulo di consenso informato scritto
3. IgAN idiopatica, comprovata da biopsia, con lesioni renali croniche (T1,2) o moderate (M0,1, S0, 1, E0, TO, CO) ad alto rischio di CKD, entro 4 settimane.
4. GFR ≥ 30 ml/min/1,73m^2
5. Proteinuria delle 24 ore ≥ 0,5g
6. Pazienti in trattamento o candidati al trattamento con RASB (ACEI o ARB), secondo la pratica clinica, suggerita dalle attuali linee guida KDIGO

4.2.2 Criteri di esclusione

1. IgAN non documentata da biopsia
2. Pazienti IgAN con presenza di lesioni minime alla biopsia renale e sindrome nefrosica.
3. Pazienti IgAN con macroematuria e insufficienza renale acuta
4. Pazienti IgAN con glomerulonefrite rapidamente progressiva (lesioni extracapillari in più del 25% dei glomeruli nella biopsia renale).
5. Pazienti con IgAN secondaria (nefrite da lupus, porpora di Schoenlein-Henoch, cirrosi epatica).
6. Pazienti con IgAN sovrapposta in trapianto di rene
7. Pazienti con altri tipi di malattie glomerulari
8. Pazienti con un solo rene
9. Pazienti con malattia renale allo stadio terminale
10. Disturbi della coagulazione non responsivi al trattamento
11. Pazienti con infarto del miocardio o ictus cerebrovascolare nei sei mesi precedenti.
12. Gravi malattie del fegato, infezioni, neoplasie.
13. Diabete non controllato (glicemia >200mg/dl e HbA1c >7,5%).
14. Necrosi asettica di qualsiasi osso
15. Qualsiasi precedente terapia immunosoppressiva
16. Altre malattie che possono essere esacerbate dai corticosteroidi

17. Precedenti effetti collaterali avversi e o controindicazioni a RASB e SGLT2i
18. Gravidanza e allattamento
19. Donne in età fertile non disponibili all'uso di misure contraccettive altamente efficaci durante il periodo di trattamento dello studio e fino ad un mese dopo l'ultima dose di farmaci in studio.

4.3 Interventi

4.3.1 Terapia dello studio (dosaggio e razionale)

I farmaci in studio (già immessi sul mercato come medicinali autorizzati) non saranno forniti dallo Sponsor dello studio e saranno somministrati secondo la loro indicazione e non saranno avanzate altre richieste di etichettatura aggiuntiva per garantire la sicurezza del soggetto, l'affidabilità e la solidità dei dati generati in questo studio clinico.

Per tutte le informazioni sui farmaci somministrati nello studio si fa riferimento ai fogli illustrativi che accompagnano le confezioni dei prodotti.

RABS

I pazienti riceveranno il trattamento con farmaci RASB (ACEi o ARB) che inibiscono il sistema di renina-angiotensina, come avviene secondo la pratica clinica seguendo le linee guida KDIGO.

Per esempio, Ramipril sarà somministrato al dosaggio di 5 mg per due volte al giorno (8.00-20.00) in pazienti con ipertensione arteriosa. Poi, sarà aumentato di 2,5mg per due volte al giorno ogni tre giorni fino alla riduzione dell'ipertensione e della proteinuria.

In pazienti con normale pressione arteriosa, Ramiprill sarà somministrato al dosaggio di 2,5 mg per due volte al giorno.

In pazienti non tolleranti il Ramiprill, sarà somministrato un sartano, per esempio Losartan 12,5 mg per due volte al giorno. Un graduale aumento di 6,25 mg (due volte al giorno) sarà fatto per ridurre la proteinuria.

Razionale: RASB sarà somministrato per ridurre la pressione sanguigna a livello glomerulare e la proteinuria (39,40).

Dapagliflozin

Il farmaco sarà somministrato con un dosaggio di 10 mg al giorno come riportato in altri studi clinici randomizzati nei quali la Dapagliflozin è stata somministrata in combinazione con RASB (29,31).

Razionale: per ridurre la pressione arteriosa sanguigna a livello glomerulare e la proteinuria.

Corticosteroidi

ACIgAN trial

Il metilprednisolone sarà somministrato ad un dosaggio di 15 mg/Kg di peso corporeo fino ad un dosaggio di 1 gr nel primo giorno e la dose ridotta al 50% nei due giorni successivi. Poi sarà somministrato il prednisone ad un dosaggio di 0,5 mg/kg peso corporeo a giorni alterni sino al compimento del mese. Questo trattamento sarà ripetuto per tre mesi consecutivi. Dopo i 3 mesi, il prednisone sarà gradualmente ridotto del 25% del dosaggio ogni settimana sino alla fine del trattamento (4 settimane).

Razionale: È necessario curare le lesioni renali attive, rappresentate da lesioni proliferative endocapillari ed extracapillari a livello glomerulare. Questo trattamento è stato effettuato anche in altri studi clinici di IgAN (12,18,43).

I pazienti riceveranno la terapia corticosteroidea per via orale per 6 mesi (prednisone 0,4 mg/Kg di peso corporeo per 2 mesi e poi una riduzione graduale di 5 mg/mese per 4 mesi) combinata con terapia RASB e, poi, RASB da solo per un totale di 36 mesi consecutivi.

Razionale: È necessario curare le renali moderate e croniche nei non-responder alla sola RASB, come suggerito dalle linee guida KDIGO (4,5).

4.3.2 Modifiche dello stile di vita e altre terapie

Terapia concomitante

Sarà presa in considerazione l'eradicazione dei focolai infettivi o la concomitante terapia antibiotica per prevenire le infezioni o per evitare la trasformazione di una banale infezione in una grave complicanza. In presenza di una ridotta funzionalità renale (eGFR < 30ml/min/1,73m^2) i pazienti riceveranno dosi ridotte di antibiotici nefrotossici.

Saranno evitati farmaci antinfiammatori non steroidei e altri farmaci nefrotossici.

A causa del breve termine della terapia con i corticosteroidi, i pazienti con IgAN non riceveranno una terapia supplementare per l'osteoporosi. Sarà comunque il medico a decidere, in ogni paziente, la terapia integrativa.

Saranno somministrati vaccini inattivati anti-pneummococcico e anti-influenzale. Il cotrimoxazolo sarà somministrato come profilassi per Pneumocytis jirovecii.

Il vaccino COVID-19 sarà somministrato anche in pazienti con IgAN che saranno arruolati nel braccio dei corticosteroidi.

I pazienti trattati con corticosteroidi riceveranno ciprofloxacina prima e durante le due settimane dopo la vaccinazione meningococcica.

In presenza di ipertensione, i farmaci antipertensivi saranno principalmente sostituiti da RASB per ridurre l'ipertensione e la proteinuria.

Verranno somministrati diuretici. I tiazidici saranno sostituiti da diuretici dell'ansa in presenza di compromissione della funzione renale inferiore a 30 ml/min/1,73m^2.

I farmaci cardioprotettivi saranno somministrati in presenza di insufficienza cardiaca.

Le statine verranno prescritte in presenza di ipercolesterolemia (>200 mg/dl).

L'allopurinolo sarà somministrato in presenza di iperuricemia. Sarà ridotto se i pazienti avranno una compromissione della funzione renale < 30 ml/min/1,73m^2.

La cimetidina non verrà prescritta perché interferisce con le misurazioni della creatinina sierica. Saranno somministrati altri farmaci gastro-protettori.

In presenza di eGFR persistente o permanente <15 ml/min/1,73m^2, i pazienti riceveranno emodialisi periodica o dialisi peritoneale.

Qualsiasi altra terapia immunosoppressiva, ad esempio micofenolato-mofetile, ciclofosfamide o azatioprina non saranno ammessi in questo studio, a meno che non vi siano altre indicazioni precise per l'utilizzo di questi farmaci.

Anche la rifampicina sarà vietata in questo studio in quanto interagisce con il metilprednisolone e rende il farmaco in studio meno efficace.

Modifiche dello stile di vita

Sarà prescritto un regolare esercizio quotidiano per prevenire l'obesità e le malattie cardiovascolari. L'attività fisica dovrà essere praticata per 30 minuti tutti i giorni, principalmente al mattino.

I pazienti con CKD allo stadio 3 osserveranno la dieta mediterranea combinata con un ridotto apporto di proteine animali (0,8g/Kg). L'assunzione di sale (cloruro di sodio) sarà limitata a 5,0 g/giorno. L'adeguatezza dietetica sarà valutata misurando l'escrezione urinaria giornaliera di sodio e urea.

Verrà fatto un programma di intervento contro il fumo per smettere di fumare.

Terapia di salvataggio

Nei pazienti con lesioni renali attive, la terapia a lungo termine sarà rappresentata da solo RASB perché, dopo trattamento corticosteroideo, possono essere presenti solo le lesioni croniche. Non ovviamente in caso di riacutizzazione della malattia in cui si dovrà riprendere la terapia corticosteroidea.

Infine, in alcuni pazienti, qualora fosse necessario, si praticherà la terapia renale sostitutiva (dialisi o trapianto di rene).

Nei pazienti con lesioni renali moderate/croniche non-responsivi ai RASB, la terapia sarà rappresentata da RASB in combinazione con corticosteroidi (prednisone orale).

4.3 Donne in età fertile

Una donna è considerata fertile quando può avere una gravidanza (WOCBP), ciò avviene dopo il menarca, a meno che non sia permanentemente sterile. Essa diventa sterile nella menopausa. I metodi di sterilizzazione permanente comprendono l'isterectomia, la salpingectomia bilaterale e l'ovariectomia bilaterale. Uno stato post-menopausale è definito quando nessuna mestruazione si presenta per 12 mesi senza una causa medica alternativa.

Per includere una paziente nello studio clinico sarà effettuato un test di gravidanza su siero o urina altamente sensibile che dovrà essere negativo Se clinicamente indicato, verranno eseguiti ulteriori test di gravidanza durante lo studio.

In ogni caso in presenza di un ritardo mestruale (oltre un mese tra le mestruazioni) verrà accertata la conferma dell'assenza di una gravidanza. Questo protocollo verrà applicato anche in donne con cicli mestruali poco frequenti o irregolari.

L'inclusione di donne che potenzialmente possono diventare gravide richiederà l'uso di misure contraccettive altamente efficaci durante il periodo di trattamento e fino ad un mese dopo l'ultima dose dei farmaci oggetto dello studio.

Secondo l'attuale manuale sulle "Raccomandazioni relative alla contraccezione e ai test di gravidanza nelle sperimentazioni cliniche" il gruppo di facilitazione e coordinamento delle sperimentazioni cliniche, suggerisce l'uso di metodi contraccettivi altamente efficaci che possono raggiungere un tasso di fallimento inferiore all'1% all'anno, se utilizzati in modo coerente e corretto. Tali metodi includono:

- Contraccezione ormonale combinata (contenente estrogeni e progestinici) associata a inibizione dell'ovulazione: orale, intra vaginale, transdermica
- Contraccezione ormonale a base di solo progestinico associato all'inibizione dell'ovulazione: orale, iniettabile, impiantabile
- Dispositivo intrauterino (IUD)
- Sistema intrauterino di rilascio degli ormoni (IUS)
- Occlusione tubarica bilaterale
- Partner vasectomizzato
- Astinenza sessuale

4.4 Misure dei risultati

L'endpoint primario è la riduzione della proteinuria delle 24 ore come differenza tra i due bracci, come suggerito da Inker et al (44). Sarà valutato dopo 4 e 8 mesi nello studio ACIgAN e dopo 10 mesi nello studio CHRONIgAN.

L'endpoint secondario è la presenza di GFR calcolata come media della pendenza individuale ottenuta dalla registrazione lineare individuale di eGFR a lungo termine (3 anni).

Sulla base della definizione del Consenso Internazionale sugli esiti degli studi clinici per l'insufficienza renale (23), abbiamo considerato endpoint primari e secondari, che saranno valutati nei due RCT, come di seguito elencati:

Endpoint primario:

- Differenza tra i due bracci nella riduzione della proteinuria entro 4 e 8 mesi nello studio ACIgAN ed entro 10 mesi nello studio CHRONIgAN.

Endopoint secondari:

- Pendenza della retta che passa per diversi valori dell'eGFR, calcolata come media delle pendenze individuali ottenute mediante la regressione lineare dell'eGFR individuale calcolato durante un periodo di 3 anni;
- Declino dell'eGFR >40% rispetto al valore basale;
- Endpoint composito: declino di e-GFR >40%, ESKD (definito come GFR ≤ 15 ml/min/1,73m^2 per più di tre mesi o necessità di dialisi cronica o trapianto) o morte per malattia renale;
- Differenza assoluta tra l'ultimo valore eGFR ed eGFR basale;
- Funzione renale stabile, definita come diminuzione della velocità di filtrazione glomerulare ≤ 5ml/min/1,73m^2 alla fine dei tre anni di follow-up;
- Variazione media annua della pendenza del reciproco della concentrazione di creatinina sierica;

- Proteinuria media nel tempo (TA-P), calcolata come media ponderata di tutti i valori ottenuti durante lo studio clinico; il valore viene ponderato in base all'intervallo di tempo tra le misurazioni;
- Pendenza della retta che passa per i diversi punti relativi ai valori della proteinuria calcolata come media delle pendenze individuali, ottenuti nell'arco di 3 anni;
- Remissione completa della proteinuria definita come raggiungimento di un livello di proteine urinarie ≤ 0,2g/giorno;
- Remissione parziale della proteinuria definita come il raggiungimento di una riduzione delle proteine urinarie ≥ 50% o superiore rispetto al valore basale.

Gli endpoint saranno valutati mensilmente nei pazienti IgAN con lesioni renali attive nei primi otto mesi dopo la biopsia renale e successivamente ogni tre mesi. Nei pazienti IgAN con lesioni renali croniche o moderate, gli endpoint saranno valutati ogni tre mesi nei primi due anni dopo l'arruolamento e successivamente ogni sei mesi.

4.4.1 Previsione del rischio

La previsione del rischio di ESKD nei pazienti con IgAN sarà basata sulla diagnosi istologica (classificazione MEST-C) della biopsia renale, eGFR, proteinuria, presenza di ipertensione al momento della biopsia renale. Useremo il nostro strumento DialCheck.

Utilizzando un nuovo strumento in corso di sviluppo, la previsione del rischio sarà calcolata in diversi momenti del decorso clinico della malattia:

i. Al momento della diagnosi clinica e istologica
ii. Dopo 4 e 8 mesi dalla terapia in pazienti con lesioni renali attive

iii. Dopo 10 mesi dalla terapia in pazienti con lesioni renali croniche o moderate. Successivamente ogni anno, durante il follow-up

4.5 Cronologia dello studio

- Durata dello studio: circa 6 anni
- Periodo di arruolamento: 3 anni
- Periodo di trattamento e follow-up: 3anni + 30 giorni

Le figure 2A e 2B illustrano il calendario dell'arruollamento, degli interventi, delle valutazioni cliniche in corso di terapia e delle visite mediche effettuate ai pazienti.

Figure 2A. SPIRIT 2013 DICHIARAZIONE DELLO STUDIO ACIgAN: Calendario delle iscrizioni, degli interventi, delle valutazioni e delle visite dei partecipanti

	PERIODO DI STUDIO																	
	Arruola-mento	**Alloca-zione**	**Post-allocazione**														**Fine del trattamento**	**Fine dello studio**
Punto temporale	- t_1	t_0	t_1	t_2	t_4	t_6	t_8	t_{12}	t_{15}	t_{18}	t_{21}	t_{24}	t_{27}	t_{30}	t_{33}	t_{36}	t_{36}	30 giorni dopo l'ultimo trattamento
Arruolamento:																		
Schermata di idoneità	x																	
Consenso informato	x																	
Biopsia renale	x																	
Dati di laboratorio	x																	
Allocazione		x																
Interventi:																		
(A) Cs+RASBs (4 mesi) → RASBs			●													●		
(B) RASBs (4 mesi) →Cs+RASBs (4 mesi)→RASBs			●													●		
Assessments:																		
Creatinina sierica	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		
eGFR	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		
Proteinuria giornaliera	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		
Eventi avversi	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x
Modifiche concomitanti	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x
Risultati variabili:																		
Riduzione della proteinura (end point primario)						x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Riduzione della pendenza di eGFR (endpoint secondario)			x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	

Raccolta di campioni biologici																		
Siero		x	x	x	x	x	x	x				x				x		
Urine		x	x	x	x	x	x	x				x				x		

Figure 2B. SPIRIT 2013 STATEMENT OF THE CHRONIgAN STUDY: Time Schedule of the enrolment interventions, assessments and visits of theparticipants.

	PERIODO DI STUDIO															
	Arruolamento	**Allocazione**	**Post-allocation**												**Fine del trattamen-to**	**Fine dello studio**
Punto temporale	- t_1	t_0	t_1	t_4	t_8	t_{10}	t_{12}	t_{14}	t_{18}	t_{24}	t_{27}	t_{30}	t_{33}	t_{36}	t_{36}	30 giorni dopo l'ultimo trattamento
Arruolamento:																
Schermata di idoneità	x															
Consenso informato	x															
Biopsia renale	x															
Dati di laboratorio	x															
Allocazione		x														
Interventi:																
(A) Cs+RASBs (4 mesi) → RASBs			●											●		
(B) RASBs (4 mesi) →Cs+RASBs (4 mesi)→RASBs			●											●		
Assessments:																
Creatinina sierica	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		
eGFR	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		
Proteinuria giornaliera	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		
Eventi avversi	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x
Modifiche concomitanti	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x
Risultati variabili:																
Riduzione della proteinura (end point primario)						x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Riduzione della pendenza di eGFR (end point secondario)			x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	

Raccolta di campioni biologici																
Siero		x	x	x	x	x		x		x				x		
Urine		x	x	x	x	x		x		x				x		

4.6 Raccolta di campioni biologici

Saranno raccolti tutti i campioni di sangue (8 ml) e di urina delle 24 ore (30 ml) da pazienti IgAN con lesioni renale acute, arruolati nello studio clinico ACIgAN, e da pazienti IgAN con lesioni renali croniche e moderate, arruolati nello studio CHRONIgAN. I campioni saranno raccolti nei tempi stabiliti, riportati nella Figura 2A e nella Figura 2B. I campioni di sangue e urina verranno utilizzati per il dosaggio della cistatina C. La valutazione di questa variabile consentirà di ottenere l'eGFR creatinina/cistatina C, utilizzato per valutare meglio la progressione del danno renale.

Tutti i campioni biologici saranno conservati in congelatore a -20°C o -80°C nei Centri di Nefrologia partecipanti allo studio. Ogni sei mesi, o quando possibile, i campioni biologici raccolti saranno spediti alla Fondazione Schena. Le spese di spedizione saranno sostenute dalla Fondazione.

Per la raccolta di campioni biologici per lo studio ancillare "Analisi biomolecolare all'avanguardia per la terapia di precisione in IgAN (BIO-D), si rimanda alla sezione n.9. PROGETTO ANCILLARE.

4.7 Fine dello studio o ritiro del paziente

La fine dello studio è definita come l'ultima visita dell'ultimo soggetto arruolato.

Verrà effettuata una visita di fine studio 30 giorni dopo l'ultimo trattamento per raccogliere dati sull'eventuali eventi avversi e altre terapie somministrate.

L'eventuale ritiro di un paziente arruolato nello studio e/o dall'intero studio avverrà alle seguenti condizioni:

- Ritiro del consenso informato
- Gravidanza
- Malattie maligne sopraggiunte
- Insufficienza renale cronica (allo stadio terminale)
- Dialisi
- Trapianto renale
- Mancato rispetto delle procedure di studio
- Giudizio dello sperimentatore, per qualsiasi motivo etico, medico o scientifico
- Morte del paziente

Il paziente può ritirarsi dal trattamento in qualsiasi momento senza penalità o perdita di benefici a cui ha diritto.

5. VALUTAZIONE DELLA SICUREZZA

Il ricercatore principale dello studio è responsabile per garantire che tutto il personale coinvolto nello studio abbia familiarità con il contenuto di questa sezione dello studio.

5.1 Parametri di sicurezza

5.1.1 Definizione di eventi avversi

La Conferenza Internazionale sull'Armonizzazione (ICH) delle linee guida per la buona pratica clinica (GCP) nella sezione E6 (R2) definisce un evento avverso (AE) come:

qualsiasi evento medico spiacevole in un paziente, sottoposto o meno ad esami di laboratorio, a cui è stato somministrato un prodotto farmaceutico e che non ha necessariamente una relazione causale con questo trattamento. Un evento avverso può quindi essere qualsiasi segno sfavorevole e non intenzionale (incluso un risultato di laboratorio anomalo), sintomo o malattia temporalmente associata all'uso di un medicinale, considerato o meno correlato al medicinale.

Un evento avverso include, ma non è limitato, ad un qualsiasi peggioramento clinicamente significativo della condizione pre-esistente di un paziente. Un risultato di laboratorio anomalo (compreso il risultato dell'ECG) che richiede un'azione o un intervento da parte dello sperimentatore, o un risultato, giudicato dallo sperimentatore rappresentare un cambiamento oltre l'intervallo della normale fluttuazione fisiologica, deve essere segnalato come evento avverso.

Gli eventi avversi possono presentarsi in corso di trattamento (ovvero, si possono presentare all'inizio dell'assunzione del prodotto sperimentale) o non presentarsi in corso di trattamento. Un evento avverso non emergente durante il trattamento è qualsiasi nuovo segno o sintomo, malattia o altro evento medico sfavorevole che inizia dopo l'ottenimento del consenso informato scritto ma prima che il paziente abbia ricevuto il prodotto sperimentale.

Il trattamento o l'intervento chirurgico elettivo o il trattamento o chirurgico pianificato in anticipo (programmato prima dell'arruolamento del paziente nello studio clinico) per una condizione preesistente documentata, che non è peggiorata rispetto al basale, non è considerato un evento avverso (serio o non grave). Un evento medico spiacevole che si verifica durante la procedura elettiva programmata o il trattamento programmato di routine deve essere registrato come evento avverso o evento avverso grave.

Il termine evento avverso è usato per includere sia gli eventi avversi gravi che non gravi.

5.1.2 Definizione di eventi avversi gravi

Un evento avverso grave è un evento che si verifica durante qualsiasi fase dello studio (ad esempio screening, arruolamento, trattamento, wash-out, follow-up), con qualsiasi dose dei farmaci in studio che soddisfi uno o più dei seguenti criteri:

- Decesso del paziente
- Immediato pericolo di vita
- Richiede il ricovero ospedaliero o il prolungamento del ricovero esistente
- Provoca invalidità o incapacità persistente o significativa
- È un'anomalia congenita o un difetto alla nascita nella prole del paziente

- È un evento medico importante che può mettere a rischio il paziente o può richiedere un intervento medico per prevenire uno degli esiti sopraelencati.
  - Il giudizio medico o scientifico deve essere preso in considerazione quando si decide se la segnalazione accertata sia appropriata in questa situazione. Esempi di eventi importanti dal punto di vista medico sono il trattamento intensivo in un pronto soccorso o a casa per broncospasmo allergico, discrasie ematiche o convulsioni che non comportano ricoveri; o sviluppo di tossicodipendenza o abuso di droghe.

5.1.3 Definizioni di reazioni avverse al farmaco

Una reazione avversa al farmaco è una risposta ad un medicinale che è nociva e non intenzionale. Questa definizione include gli effetti nocivi e indesiderati derivanti non solo dall'uso autorizzato di un medicinale a dosi normali, ma anche da errori terapeutici e uso dei farmaci sperimentali al di fuori dei termini dell'autorizzazione all'ammissione in commercio, inclusi il sovradosaggio, l'uso improprio e l'abuso del medicinale.

La definizione implica una ragionevole possibilità di una relazione causale tra l'evento avverso e la somministrazione del farmaco. Ciò significa che ci sono fatti (prove) o argomenti che suggeriscono una relazione causale.

Una reazione avversa "grave" è una reazione avversa considerata "grave" secondo il criterio di "gravità" riportato nella precedente sezione "Definizione di eventi avversi gravi".

Una "reazione avversa inattesa" è definita come "una reazione avversa, la cui natura o gravità non è coerente con le informazioni fornite sul prodotto (ad esempio opuscolo per lo sperimentatore per un prodotto sperimentale non autorizzato o riassunto delle caratteristiche del prodotto per un prodotto autorizzato)".

5.2 Valutazione dei parametri di sicurezza

5.2.1 Valutazione della gravità

La valutazione della gravità è una delle responsabilità dello sperimentatore nella valutazione degli eventi avversi e di quelli gravi.

La determinazione della gravità deve essere effettuata dallo sperimentatore sulla base del giudizio medico e delle categorie di gravità cha vanno dal grado 1 a 5 come definito di seguito.

Grado 1 (lieve): un evento che di solito è transitorio e può richiedere solo un trattamento minimo o un intervento terapeutico. L'evento generalmente non interferisce con le normali attività della vita quotidiana.

Grado 2 (moderato): un evento che di solito viene alleviato con un ulteriore intervento terapeutico specifico. L'evento interferisce con le normali attività della vita quotidiana.

Grado 3 (grave): un evento che richiede un intervento terapeutico intensivo. L'evento interrompe le normali attività della vita quotidiana o influisce in modo significativo sullo stato clinico del paziente.

Grado 4 (pericolo per la vita): un evento, e/o le sue conseguenze immediate, associato ad un rischio imminente di morte o a disabilità fisiche o mentali che influenzano o limitano la capacità del paziente di svolgere attività di vita quotidiana (categoria, deambulazione, andare in bagno, ecc.).

Grado 5 (fatale): morte (perdita della vita) a seguito di un evento.

È importante distinguere tra criteri seri e gravità di un evento avverso. La gravità è una misura dell'intensità mentre la serietà del evento avverso è definita dai criteri esposti nella sezione precedente.

Un evento avverso di Grado 3 non deve essere necessariamente considerato un evento avverso serio. Ad esempio, un mal di testa di grado 3 che persiste per diverse ore potrebbe non soddisfare la definizione normativa di evento avverso serio e dovrebbe essere considerato un evento non grave, mentre una mal di testa di grado 2 che comporta un ricovero ospedaliero dovrebbe essere considerato un evento avverso serio.

5.2.2 Valutazione della relazione

La valutazione della relazione con il prodotto sperimentale o con le procedure dello studio sarà effettuata secondo il miglior giudizio dello sperimentatore.

5.3 Registrazione di eventi avversi e di eventi avversi severi

Gli eventi avversi, gravi e non gravi, saranno raccolti dal momento in cui il paziente firma il modulo di consenso informato fino a 30 giorni dopo l'ultimo trattamento. Se un evento inizia dopo il periodo, sopra definito di sicurezza, del follow-up ed è dovuto ad una tossicità ad insorgenza tardiva del farmaco in studio, questo deve essere segnalato con avverso, più o meno grave, a seconda dei casi.

Durante il corso dello studio, tutti gli eventi avversi, più o meno gravi devono essere seguiti in modo continuativo per ciascun paziente per tutto il tempo in cui l'evento è in corso. Deve essere fatto ogni sforzo per ottenere una risoluzione degli eventi, anche se essi continuano dopo che il paziente ha interrotto il farmaco in studio o lo studio è stato completato.

Eventuali eventi avversi irrisolti durante l'ultima visita del paziente nello studio vengono seguiti dallo sperimentatore per tutto il tempo indicato dal punto di vista medico, ma senza ulteriore registrazione nell'e-CRF. Il Promotore si riserva il diritto di richiedere ulteriori informazioni per qualsiasi paziente con eventi avversi, più o meno gravi, al termine dello studio, se ritenuto necessario.

Per ogni evento avverso verranno raccolte le seguenti variabili:

- Evento avverso (scritto)

- La data di inizio e fine dell'evento avverso
- Il grado massimo riportato
- Cambiamenti di grado
- Se l'evento avverso è più o meno grave
- Valutazione del nesso di causalità da parte dello sperimentatore rispetto ai protocolli oggetto del prodotto in studio (si o no)
- Azioni intraprese riguardo i prodotti dello studio
- Trattamento dell'evento avverso
- Risultato

Inoltre, saranno raccolte le seguenti variabili dell'evento avverso:

- La data, in cui si è verificato l'evento avverso, ha soddisfatto i criteri per un eventi avverso grave
- Data in cui l'investigatore è venuto a conoscenza del evento avverso grave
- Criteri di serietà soddisfatti
- Data del ricovero
- Data della dimissione
- Probabile causa di morte
- Data di morte
- Se è stata eseguita un'autopsia
- Valutazione del nesso di causalità in relazione alla/e procedura/e dello studio
- Valutazione del nesso di causalità in relazione ad altri farmaci, come spiegato nella Sezione 9.3.2
- Descrizione dell'evento avverso grave

5.3.1 Periodo di registrazione dello studio e follow-up degli eventi avversi, anche quelli gravi

Gli eventi avversi seri o meno saranno registrati dal momento della firma del consenso informato, durante tutto il periodo di trattamento e 30 giorni dopo l'ultimo trattamento.

Durante il corso dello studio, tutti gli eventi avversi e quelli gravi saranno seguiti in modo attivo per ciascun paziente. Sarà fatto ogni sforzo per ottenere una risoluzione per tutti gli eventi, anche se gli eventi continuano dopo l'interruzione/il completamento dello studio.

Lo sperimentatore è il responsabile che deve seguire tutti gli eventi avversi gravi fino alla risoluzione, fino al ritorno del paziente allo stato basale, o fino a quando la condizione non si è stabilizzata con l'aspettativa che rimarrà cronica, anche se ciò si estende oltre la partecipazione allo studio.

5.3.2 Rapporto sulle cause dell'evento avverso

Lo sperimentatore studierà i rapporti causali tra i farmaci somministrati e gli eventi avversi e risponderà sì o no alla domanda "Lei pensa che ci sia una possibile relazione tra l'evento avverso e il prodotto sperimentale?"

Per gli eventi avversi gravi si dovrà indagare anche sui rapporti con altri farmaci che il paziente assume e rispondere sì o no.

5.3.3 Rapporto sulle procedure

Lo sperimentatore è inoltre tenuto a fornire una valutazione della relazione tra gli eventi avversi gravi e le procedure di protocollo di studio sul modulo di segnalazione degli eventi avversi gravi. Ciò include sia gli eventi avversi gravi non emergenti dal trattamento (ovvero eventi avversi gravi che si verificano prima della somministrazione del prodotto sperimentale) sia eventi avversi gravi emergenti con il trattamento. Verrà utilizzato un protocollo per segnalazione di eventi avversi gravi e le procedure o intervento richiesto durante lo studio (ad esempio, prelievo di sangue). Le seguenti linee guida saranno utilizzate dagli sperimentatori per valutare la relazione tra eventi avversi e protocollo dello studio:

- Evento avverso correlato al protocollo: l'evento si è verificato a causa di una procedura o intervento che è stato descritto nel protocollo ma non è presente alcuna eziologia alternativa nella cartella clinica del paziente.
- Evento avverso non correlato al protocollo: l'evento è correlato ad un'eziologia diversa dalla procedura o intervento descritto nel protocollo. L'eziologia alternativa deve essere documentata nella compilazione della cartella clinica del paziente.

5.3.4 Eventi avversi basati su segni e sintomi

Tutti gli eventi avversi, segnalati spontaneamente dal paziente o segnalati in risposta ad un questionario relativo allo studio e presentato dal personale medico "Hai avuto problemi di salute dopo l'ultima visita/ti è stato chiesto nell'ultima visita?" o rivelati dall'osservazione, saranno raccolti e registrati nella cartella clinica elettronica (e-CRF). Quando si raccolgono eventi avversi, è preferita la registrazione della diagnosi, quando è possibile, anche la registrazione dei segni e sintomi. Tuttavia, se una diagnosi è nota e ci sono altri segni o sintomi che generalmente non fanno parte della diagnosi, la diagnosi e ciascun segno o sintomo saranno registrati separatamente.

5.3.5 Eventi avversi basati sull'esame obiettivo e gli esami di laboratorio

I risultati degli esami di laboratorio richiesti dal protocollo e delle misurazioni dei segni vitali saranno riassunti nel Rapporto sullo studio clinico (CSR). Il deterioramento rispetto al basale dei valori di laboratorio e dei segni vitali prescritti dal protocollo sarà riportato come evento avverso se soddisfa uno qualsiasi dei criteri di eventi avversi gravi o sono la ragione per l'interruzione del trattamento con il farmaco sperimentale.

Se il deterioramento di un valore di laboratorio o di un segno vitale sarà associato a segni e sintomi clinici, il segno o sintomo sarà riportato come evento avverso ed il risultato di laboratorio associato o il segno vitale saranno considerati come informazioni aggiuntive. Quando possibile, lo sperimentatore che effettua la segnalazione utilizzerà il termine clinico piuttosto che quello di laboratorio (ad esempio, anemia rispetto a basso valore di emoglobina). In assenza di segni o sintomi clinici, i deterioramenti clinicamente rilevanti nei parametri non obbligatori verranno segnalati come eventi avversi.

Qualsiasi risultato medico anomalo clinicamente rilevante, nuovo o aggravato, osservato all'esame obiettivo rispetto a quello basale verrà segnalato come evento avverso.

5.3.6 Decessi

Tutti i decessi che si verificheranno durante il periodo dello studio, o entro il periodo di follow-up definito dal protocollo dopo la somministrazione dell'ultima dose del farmaco oggetto dello studio, saranno segnalati al monitor/medico dello studio come evento avverso, più o meno grave, entro 24 ore. Sarà anche documentato nella e-CRF.

Il Promotore dello studio ha il diritto di chiedere ulteriori informazioni per qualsiasi paziente con eventi avversi, più o meno gravi, in corso o alla fine dello studio, se lo riterrà necessario.

5.3.7 Follow-up di eventi avversi irrisolti

Eventuali eventi avversi irrisolti durante l'ultima visita del paziente nello studio saranno seguiti dallo sperimentatore per tutti il tempo indicato dal punto di vista medico, ma senza ulteriore registrazione nell'e-CRF. Dopo 30 giorni dall'ultimo trattamento, solo i pazienti con evento avverso grave, correlato al prodotto sperimentale in corso, continueranno ad essere seguiti per motivi di sicurezza.

Il Promotore ha il diritto di chiedere ulteriori informazioni per qualsiasi paziente con eventi avversi più o meno gravi in corso alla fine dello studio, se lo riterrà necessario.

5.3.8 Segnalazione di eventi avversi gravi

Verranno segnalati tutti gli eventi avversi gravi, indipendentemente dal fatto che siano considerati causalmente correlati al prodotto sperimentale o alla/e procedura/e dello studio. Il periodo di riferimento per gli eventi avversi gravi sarà quello immediatamente successivo al momento in cui il consenso informato scritto sarà ottenuto fino a 30 giorni dopo l'ultimo trattamento o fino all'inizio della terapia alternativa. Lo sperimentatore e/o lo sponsor sarà responsabile di informare il comitato etico e/o l'autorità di regolamentazione dell'evento avverso secondo i requisiti locali.

Lo sponsor indicherà inoltre la causalità degli eventi in relazione a tutti i farmaci in studio, come stabilito dal responsabile dello studio. Il rapporto di evento avverso sarà inviato via e-mail al responsabile dello studio entro 24 ore.

5.3.9 Segnalazione di sospette reazioni avverse gravi inattese

Le sospette reazioni avverse gravi inaspettate (SUSARS) fatali o pericolose per la vita del paziente saranno segnalate dallo Sponsor all'Autorità Regolatoria e al Comitato Etico, entro 7 giorni dalla conoscenza dell'evento, secondo le normative vigenti. Le relative informazioni di follow-up saranno successivamente comunicate entro ulteriori 8 giorni.

Tutte le altre SUSARS saranno segnalate dallo Sponsor all'Autorità Regolatoria e al Comitato Etico con segnalazione accelerata, entro un massimo di 15 giorni dalla prima conoscenza dell'evento. Le relative informazioni di follow-up saranno successivamente comunicate non appena possibile.

Lo Sponsor informerà anche tutti gli Investigatori.

5.4 Gravidanza

Gravidanze e gravidanze sospette (incluso un test di gravidanza positivo indipendentemente dall'età della paziente o dallo stato di malattia) in un soggetto di sesso femminile che si verificano mentre il soggetto assume prodotti sperimentali o entro un mese dall'ultimo trattamento dello studio del soggetto, saranno considerate eventi immediatamente segnalabili. Il trattamento sarà interrotto immediatamente. La gravidanza, la gravidanza sospetta o il test di gravidanza positivo saranno segnalati immediatamente allo Sponsor utilizzando il modulo di segnalazione della gravidanza. Lo sperimentatore seguirà il soggetto di sesso femminile fino al completamento della gravidanza e notificherà immediatamente allo sponsor dello studio l'esito della gravidanza (esito normale o anomalo). Se l'esito della gravidanza sarà anormale (ad esempio, aborto spontaneo o terapeutico), lo sperimentatore segnalerà l'esito anomalo come evento avverso. Se l'esito anomalo soddisfa uno dei criteri seri, verrà segnalato come evento avverso grave entro 24 ore dalla conoscenza dell'evento da parte dello sperimentatore utilizzando il modulo di segnalazione eventi avversi gravi o un modulo equivalente.

6. CALCOLO DELLA DIMENSIONE DEL CAMPIONE

ACIgAN. I dati della letteratura (22,23) hanno dimostrato una differenza nella sopravvivenza renale tra i pazienti trattati con corticosteroidi ed i controlli quando i ricercatori hanno ipotizzato una differenza del 50% nella valutazione dell'endpoint primario (cioè la differenza tra i bracci relativamente al delta della proteinuria delle 24 ore, tra valore basale e quello a 6 mesi) come dato clinicamente rilevante. Pertanto, abbiamo ipotizzato che un valore medio del delta della proteinuria tra valore basale e quello a 6 mesi nei pazienti trattati con solo RASB (braccio di controllo) sia di 0.6 ± 1,0 g/24 ore (± SD) rispetto al valore medio del delta della proteinuria di 1,2 +1,0 g/24 ore (± SD) tra valore basale e quello a 6 mesi nei pazienti trattati con RASB e corticosteroidi (braccio sperimentale). Sulla base di questa ipotesi, abbiamo calcolato che la dimensione del campione di pazienti da arruolare sia di 132 soggetti (66 pazienti per ciascun braccio ipotizzando un tasso di abbandono del 10%) per una potenza del 90%, un livello di significatività bilaterale di 0,05 e 3 anni di reclutamento. Se il numero dei pazienti arruolati sarà insufficiente, il periodo di reclutamento sarà prorogato di due anni.

CHRONIgAN. I dati della letteratura (29,31) hanno mostrato una differenza di sopravvivenza renale tra pazienti trattati con SGLT2i e controlli. Non ci sono dati in letteratura che esplorino la differenza di sopravvivenza renale o proteinuria tra pazienti trattati con SGLT2i e quelli con corticosteroidi. Pertanto, abbiamo stabilito per questo primo studio comparativo un campione di 300 pazienti (150 pazienti per gruppo, ipotizzando un tasso di abbandono del 10%).

6.1 Reclutamento dei pazienti

Razionale: in alcuni RCT (22,23) i pazienti affetti da IgAN hanno ricevuto da 3 a 6 mesi di trattamento con RASB prima del loro arruolamento con la terapia corticosteroidea. A nostro avviso questo approccio non è corretto perché le lesioni renali attive evolvono nella fase cronica e non rispondono alla terapia praticata con corticosteroidi tardivamente. Pertanto, l'obiettivo del nostro RCT è il trattamento precoce delle lesioni renali attive che sono responsabili dell'alterazione del GFR e della proteinuria.

Reclutamento: i pazienti IgAN saranno arruolati entro 2-4 settimane dalla biopsia renale nei centri di nefrologia. La biopsia renale sarà valutata secondo la classificazione di Oxford (6-8) perché è un metodo semplice per prevedere gli esiti renali e per valutare le lesioni renali attive e croniche (46). Pertanto, la biopsia renale sarà l'elemento chiave, non solo per la diagnosi ma anche per la terapia personalizzata, poiché le lesioni renali attive (E1, C1) saranno trattate con terapia corticosteroidea immediata prima che le lesioni diventino croniche.

La biopsia renale sarà analizzata anche utilizzando un metodo digitale basato sull'intelligenza artificiale. Per la lettura della biopsia devono essere presenti almeno otto glomeruli per una diagnosi corretta. La tecnica dell'immunofluorescenza sarà utilizzata per valutare la presenza dei depositi di IgA nella sede mesangiale dei glomeruli. Le sezioni di tessuto renale saranno colorate con ematossilina ed eosina, acido periodico-Schiff, tricromica e argento metenamina. Per la valutazione delle lesioni renali verrà utilizzata la classificazione Oxford (MEST-C) (8). Le lesioni renali attive sono quelle proliferative endocapillari (E) ed extracapillari (C), mentre le lesioni T (T1,2) sono espressione di lesioni renali croniche con prognosi severa (46-49). Saranno valutate anche altre lesioni istologiche come la necrosi fibrinoide, la glomerulosclerosi e l'arteriosclerosi.

Tre patologi renali indipendenti, che non conoscono i risultati dello studio, valuteranno le lesioni renali nella biopsia utilizzando il sistema Aperio. Il referto istologico sarà necessario per l'arruolamento dei pazienti. Nessun studio clinico randomizzato con arruolamento di un elevato numero di pazienti IgAN ha dimostrato che la malattia migliora quando le decisioni cliniche vengono prese per tempo in presenza del punteggio MEST-C.

- Creatinina sierica. La creatina sarà misurata utilizzando metodi enzimatici calibrati al metodo di spettrometria di massa della diluizione isotopica della cromatografia liquida del National Istitute of Standard and Technology. Il GFR stimato sarà calcolato mediante la formula CKD-EPI (50). Inoltre, sarà calcolata anche la pendenza della retta ottenuta da più valori dell'e-GFR in fase acuta, cronica e totale (somma della fase acuta e cronica) (51). I pazienti, classificati nello stadio CKD da 1 a 3, saranno inclusi nello studio clinico.

- Proteinuria. I pazienti raccoglieranno l'urina delle 24 ore per il dosaggio della proteinuria e della creatininuria. Valori ≥ 0,5 g/giorno saranno considerati anormali. Sarà misurata anche la proteinuria media nel tempo (TA-P) (52) e la pendenza della proteinuria (53).

L'età del paziente, la creatinina sierica, la proteinuria, e l'ipertensione hanno un peso inferiore quando non si considerano anche le lesioni istologiche. Ciò sottolinea l'importanza della biopsia renale, non solo per la diagnosi ma anche per il trattamento personalizzato.

- L'ipertensione arteriosa è definita quando è presente un valore della pressione arteriosa >130/80 mmHg o quando i soggetti sono trattati con farmaci anti-ipertensivi. Il trattamento sarà effettuato anche nei pazienti ipertesi con pressione arteriosa >130/80 e quando la proteinuria giornaliera sarà superiore a 0,5 g. In questi casi sarà necessaria la riduzione del sale nella dieta giornaliera.

6.2 Allocazione

Dopo l'ammissibilità iniziale del paziente, basata sullo screening dei dati clinici e del referto della biopsia renale, verrà illustrato lo studio clinico. Dopo la firma sul modulo del consenso informato, il paziente sarà arruolato e randomizzato separatamente in ogni studio (rapporto di assegnazione 1:1) tramite un programma informatico che genera numeri casuali per garantire l'occultamento dell'assegnazione. La randomizzazione stratificata sarà effettuata per età e sesso per ogni centro di nefrologia. Lo studio del follow-up per valutare i risultati della terapia consisterà in visite regolari che osserveranno gli intervalli prestabiliti per raccogliere notizie cliniche, i dati degli esami di laboratorio e le informazioni sull'aderenza alla terapia. Prima che la sperimentazione sia completata, ogni paziente riceverà un'ultima visita ambulatoriale.

6.3 Studio in cieco

Per l'assegnazione del paziente ad uno dei bracci dello studio sarà utilizzata la procedura in cieco.

6.4 Metodi statistici

Le variabili quantitative in presenza di una distribuzione normale saranno espresse come media ± SD; mentre in presenza di variabili non distribuite normalmente si utilizzeranno gli intervalli interquartili. I confronti delle variabili continue tra i due bracci saranno eseguiti mediante il t-test o mediante il test U di Mann-Whitney, a seconda dei casi. La differenza dell'endpoint primario tra i due bracci, per esempio la differenza tra i due bracci del valore delta della proteinuria tra il basale e quello a 6 mesi nello studio ACIgAN e la differenza tra i due bracci del valore delta della proteinuria delle 24 ore tra basale e a 12 mesi nello studio CHRONIgAN, sarà espresso come differenza media e 95% dell'intervallo di confidenza. Le variabili categoriche saranno presentate come frequenza assoluta e in percentuale. I valori saranno confrontati utilizzando il test X2 di Pearson o il test di Fisher, a seconda dei casi. L'analisi dell'evento rispetto al tempo sarà eseguita disegnando la curva di Kaplan-Meier; si confronterà il gruppo sperimentale con quello di controllo mediante il log rank test. L'analisi

multivariata sarà effettuata con il metodo di Cox al fine di valutare il rischio relativo associato a possibili fattori prognostici di base quali il sesso, età, creatinina sierica, e-GFR, ipertensione, lesioni istologiche e terapia.

L'analisi primaria sarà condotta secondo l'approccio intent-to-treat in tutti i pazienti randomizzati, indipendentemente dall'aderenza al trattamento assegnato. Sarà, inoltre, eseguita un'analisi per protocollo. Sarà, anche, eseguita un'analisi secondaria mediante modelli misti lineari (LMM) o equazioni generalizzate di stima (GEE), utilizzando misurazioni ripetute di e-GFR e proteinuria. La scelta tra le due analisi dipenderà strettamente dal comportamento delle variabili nelle nostre coorti di studio.

In questi modelli, i dati saranno espressi come coefficienti di regressione, 95% l'intervallo di confidenza ed il valore della p. Tutte le analisi verranno eseguite utilizzando SPSS per Windows, 17.0 (SPSS Inc., North Sydney, Australia) e STATA/IC 13.1 per Windows (College Station, Texas, USA). Un valore della p inferiore a 0,05 sarà considerato statisticamente significativo

6.5 Analisi della popolazione di studio

L'analisi primaria dell'efficacia della sperimentazione sarà eseguita nella popolazione per intent- to-treat (ITT), in cui saranno inclusi tutti i pazienti assegnati in modo casuale.

Un'analisi secondaria sarà eseguita nella popolazione persistente nello studio (PP, per esempio, analizzando tutti i pazienti che hanno continuato la terapia sperimentale per almeno 4 e 8 mesi (studio ACIgAN) o 10 mesi (studio CHRONIgAN).

Pazienti che necessitano di modificare il trattamento previsto nello studio, prima del 1° mese (studio ACIgAN) o del 4° mese (studio CHRONIgAN) saranno considerati come drop out.

La popolazione di pazienti sicura di essere analizzata sarà rappresentata da tutti i pazienti che avranno ricevuto almeno una dose dei farmaci sperimentali.

Una recente review sistematica (15) ha evidenziato che i pazienti con lesioni istologiche M1 erano responsivi ai corticosteroidi. Pertanto, faremo un'analisi per sottogruppi per valutare l'effetto dei corticosteroidi nei pazienti IgAN con lesioni renali attive e croniche che presentano le lesioni M1 rispetto a M0.

7. GESTIONE DEI DATI

7.1 Raccolta dati

La raccolta dei dati sarà effettuata dalle unità renali partecipanti. Per ridurre la perdita dei pazienti e dei dati, gli incontri trimestrali sul follow-up saranno effettuati tramite Webinar.

Il personale dell'investigatore designato inserirà i dati richiesti dal protocollo9 nei Case Report Form elettronici (eCRF). Il personale del sito di ricerca non avrà accesso al CCRF fino a quando non sarà stato addestrato.

Il responsabile principale di ogni unità operativa assicurerà che i dati siano inseriti nella eCRF in modo completo, accurato e che l'inserimento e gli aggiornamenti siano eseguiti in modo tempestivo.

7.2 Gestione dei dati

I processi di acquisizione e registrazione dei dati saranno effettuati dalla Società eResult tramite la piattaforma OMNIACARE e il datacenter sarà allocato nel ReCaS.

OMNIACARE sarà responsabile dell'acquisizione dei dati provenienti dai laboratori che saranno trasferiti al datacenter di ReCaS per la loro elaborazione. La struttura è cloud-based e adotta il modello HAAS in modo che non dipenda da uno specifico fornitore di servizi cloud e consenta un'effettiva scalabilità delle risorse. L'attività consisterà nel trasportare i dati dai dispositivi in cui vengono generati alla piattaforma informatica. Saranno studiate e implementate soluzioni per consentire il trasferimento trasparente, efficiente e affidabile dei dati dai propri dispositivi presso i laboratori partecipanti allo studio al datacenter ReCaS in cui si trova la piattaforma di calcolo. L'accesso remoto ai dati avverrà mediante tecnologie cloud e protocolli sicuri come WebDAV e HTTPS. Inoltre, verrà implementata una soluzione di archiviazione personale simile a Dropbox, al fine di consentire l'archiviazione e la gestione dei dati, condividendoli con i partner in modo semplice.

7.3 Monitoraggio dei dati

Un comitato indipendente di monitoraggio dei dati effettuerà analisi intermedie ogni 12 mesi. I dati saranno presentati al Comitato Direttivo della sperimentazione. L'analisi ad interim sarà eseguita sull'endpoint primario quando il 50% dei pazienti sarà randomizzato e avrà completato 6 mesi di follow-up. L'analisi ad interim sarà effettuata in cieco dall'Azienda Coresearch che è una società indipendente di statistica.

In presenza di beneficio o inutilità della terapia nel braccio sperimentale, il Comitato Indipendente per il monitoraggio della sicurezza dei dati segnalerà al Comitato Etico Centrale l'interruzione del trattamento.

7.4 Danni

Le informazioni sulla sicurezza saranno raccolte per la popolazione di pazienti intent-to-trreat registrando eventi avversi gravi. Dopo conferma dell'evento avverso, verrà valutata la sua gravità analizzando le procedure condotte, gli esiti e le relazioni con i farmaci in studio. Gli eventi avversi saranno segnalati al responsabile dell'unità operativa che conferirà con il Comitato indipendente di monitoraggio i cui membri non conosceranno a quale gruppo il paziente è stato assegnato. Il Comitato di monitoraggio valuterà la sicurezza dello studio e, indipendentemente, determinerà eventuali revisioni necessarie al disegno dello studio e convaliderà tutte le decisioni per continuare lo studio.

7.5 Monitoraggio e audit

Prima dell'inizio dello studio, durante la visita di apertura del sito o in occasione di una riunione dello sperimentatore, il personale dello Sponsor (o la CRO designata) illustrerà il protocollo e l'e-CRF allo staff degli sperimentatori. Durante lo studio, la CRO verificherà la completezza delle cartelle cliniche dei pazienti, l'accuratezza delle voci sull'e-CRF, l'aderenza al protocollo della buona pratica clinica, lo stato di avanzamento dell'arruolamento e si assicurerà che il trattamento dello studio venga erogato e gestito secondo quanto previsto dal protocollo. Il personale responsabile della conduzione dello studio assisterà lo sperimentatore durante lo studio seguendo le fasi dello studio mediante webinar. Lo sperimentatore conserverà i documenti originali per ciascun paziente arruolato nello studio (cartella clinica, visite ambulatoriali) contenenti informazioni demografiche e mediche, dati di laboratorio e risultati di qualsiasi altro test o valutazione. Tutte le informazioni registrate sulla e-CRF saranno riconducibili ai documenti originali contenuti nella cartella del paziente. Lo sperimentatore conserverà anche il modulo di consenso informato firmato in originale (una copia firmata verrà consegnata al paziente). Lo sperimentatore permetterà al clinical monitor l'accesso a tutti i documenti originali pertinenti lo studio per confermare la loro coerenza con i dati presenti nella eCRF. Gli standard di monitoraggio dello Sponsor richiederanno una verifica completa della presenza del consenso informato, l'adesione ai criteri di inclusione/esclusione e la documentazione degli eventi avversi gravi.

I dati/documenti originali saranno disponibili per le ispezioni da parte dello Sponsor o della CRO o dell'autorità sanitaria.

8. ASPETTI ETICI E DIFFUSIONE DEI RISULTATI

8.1. Approvazione dello studio da parte dei Comitati Etici

Il protocollo è soggetto all'approvazione dal Comitato Etico Indipendente competente. Sarà effettuato secondo la dichiarazione di Helsinki (adattamento IV), la linea guida ICH per la buona pratica clinica e le leggi e regolamenti del Paese. Durante il follow-up ogni paziente sarà informato sugli obiettivi raggiunti, sui benefici attesi e sui possibili rischi, su i diritti di rifiutare la terapia o di uscire dallo studio in ogni momento dello studio.

Il modello di consenso informato che verrà presentato ai potenziali partecipanti è stato predisposto e approvato dal Comitato Direttivo.

8.2 Emendamenti allo studio

Modifiche sostanziali con numero identificativo del protocollo e date, descritte in modo trasparente nei rapporti sullo studio sperimentale, saranno sottoposte all'attenzione dei Comitati Etici.

8.3. Consenso o Assenso

Il materiale scritto (foglietto informativo e documento di consenso) sarà presentato dai ricercatori clinici dei centri nefrologici ai partecipanti. Dopo la firma della partecipazione allo studio, il paziente verrà arruolato e randomizzato separatamente in ciascuno studio in funzione della presenza di lesioni renali attive o croniche (rapporto di assegnazione 1 a1) tramite un programma allocato nel sito web che genera numeri casuali.

Ulteriore richiesta di consenso verrà effettuata per la raccolta dei campioni biologici (sangue, urine) che verranno utilizzati per lo studio ancillare ”Analisi biomolecolare per la terapia di precisione nella IgAN (BIO-D).

8.4 Riservatezza

Ogni paziente arruolato sarà identificato solo con un codice personale collegato al codice del centro nefrologico. Pertanto, i dati depersonalizzati circoleranno per il monitoraggio dello studio clinico. Il codice digitale crittografato sarà memorizzato dai centri nefrologici. Le informazioni sullo studio saranno mantenute riservate e gestite secondo le leggi e i regolamenti vigenti.

8.5 Assicurazione

Lo sponsor ha stipulato una polizza assicurativa di responsabilità civile che copre questa sperimentazione clinica. Questa polizza assicurativa è conforme alle leggi e ai requisiti locali. L’assicurazione effettuata dal Promotore non esonera lo Sperimentatore e i collaboratori dal mantenere una propria polizza assicurativa di responsabilità civile.

8.6 Dichiarazione di interesse

I partner clinici e scientifici non hanno conflitti d’interesse nella pubblicazione dei dati.

8.7 Accesso ai dati

Prima della pubblicazione dei dati soltanto il Comitato Direttivo avrà accesso ai dati complessivi. Quindi tutti i ricercatori avranno accesso al proprio set di dati completo dopo una richiesta formale che descrive il tipo di ricerca che si desidera effettuare.

8.8 Assistenza ancillare e post-processuale

Progetto ancillare. Studio BIO-D

8.9 Politica di diffusione

Il piano per divulgare i risultati della sperimentazione alle principali parti interessate si baserà sulla presentazione dei dati ai Congressi Nazionali ed Internazionali e sulla presentazione di articoli a riviste scientifiche internazionali. Inoltre, la diffusione dei dati avverrà tramite il sito web appositamente sviluppato per lo studio. Il piano sarà discusso nel Comitato Direttivo.

9. PROGETTO ANCILLARE. STUDIO DI TRASCRITTOMICA TESSUTALE

Uno studio molecolare sarà condotto su una coorte di 120 pazienti IgAN arruolati che presentano alla biopsia renale lesioni renali attive o croniche/moderate per valutare l'effetto della terapia personalizzata sull'espressione genica dei tessuti (BIO-D)

9.1 Contesto

La nefropatia da Immunoglobulina A è caratterizzata da episodi ricorrenti di macroematuria in concomitanza di infezioni del tratto respiratorio superiore o di altre infezioni della mucosa, o da microematuria permanente. La diagnosi si basa sulla presenza di depositi di IgA nel mesangio dei glomeruli. Per l'analisi istologica della biopsia renale, viene utilizzato un "sistema di punteggio" basato sulla classificazione MEST-C (6-8).

Vengono valutati cinque tipi di lesioni renali: ipercellularità mesangiale (M0,1), proliferazione endocapillare (E0,1), sclerosi glomerulare segmentale (S0,1), atrofia tubulare/fibrosi interstiziale (T0,1,2), e proliferazione extracapillare, denominate semilune (C0,1,2). La malattia è anche caratterizzata da un aumento dei livelli sierici di IgA1 (Gd-IgA1), immunoglobulina A carente di galattosio (54).

Abbiamo studiato l'espressione genica nei leucociti isolati da campioni di sangue, ottenuti da pazienti affetti da IgAN, ed evidenziato geni differentemente espressi (DEGs). L'analisi bioinformatica ha discriminato 2010 DEGs e l'analisi funzionale, operata sui migliori geni selezionati, ha dimostrato che le vie della WNT-B catenina e PI3K/Akt erano altamente attivate nei pazienti con IgAN (55). Inoltre, i DEGs sono stati trovati anche in monociti, isolati dal sangue di pazienti con IgAN; essi sono principalmente coinvolti nell'apoptosi, nella disfunzione mitocondriale e nel TNFR2/1 (56). Abbiamo anche focalizzato l'attenzione sui DEGs espressi durante l'episodio di ematuria macroscopica in concomitanza a infezioni della mucosa; essi sono i geni che esprimono l'interferone e la presentazione dell'antigene (57).

Recentemente, abbiamo ottenuto dati preliminari sull'espressione genica in microvescicole isolate dall'urina di pazienti con IgAN (dati non pubblicati). Ciò significa che abbiamo messo a punto tutte le tecniche per lo studio del trascrittoma nei tre compartimenti corporei (sangue, rene, urina) nei pazienti IgAN con lesioni renali attive alla biopsia renale e nei pazienti IgAN con lesioni renali croniche arruolati nello studio CLIgAN.

In conclusione, lo studio CLIgAN comprende uno studio trascrittomico effettuato sui tre compartimenti (sangue, rene, urina) dei pazienti IgAN al momento della biopsia renale e durante il follow-up. Analizzeremo separatamente i cambiamenti del trascrittoma delle cellule mononucleate del sangue periferico e delle microvescicole urinarie durante il decorso clinico della malattia nei due sottogruppi di pazienti. Questo approccio consentirà una stratificazione molecolare più fine dei pazienti e la potenziale identificazione di biomarcatori diagnostici specifici che potrebbero essere utilizzati per una terapia di precisione nei pazienti con IgAN.

9.2 Scopo dello studio

Scopo di questo progetto di ricerca è integrare i risultati trascrittomici ottenuti da tutti e tre i compartimenti (sangue, rene, urina) nello stesso paziente al momento della biopsia renale e poi durante il follow-up per valutare il beneficio dei corticosteroidi combinati con RASB nei pazienti con lesioni renali attive e il beneficio della Dapagliflozin combinata con RASB nei pazienti con lesioni renali croniche o moderate. Analizzeremo separatamente i cambiamenti del trascrittoma durante il decorso clinico della malattia nei due sottogruppi di pazienti con IgAN. Lo steso giorno verranno prelevati campioni di sangue e urine. Questo approccio scientifico consentirà una stratificazione molecolare più fine dei pazienti IgAN e l'identificazione di biomarcatori specifici che potrebbero essere utilizzati per l'identificazione di nuovi bersagli terapeutici ed il beneficio della terapia personalizzata.

9.3 Obiettivi

- Ottenere una più fine stratificazione molecolare dei pazienti con lesioni renali attive e moderate/croniche.
- Identificare biomarcatori diagnostici specifici che potrebbero essere utilizzati per la terapia di precisione nei pazienti IgAN.

9.4 Endpoint

Analisi di biomarcatori su campioni biologici di pazienti valutando:

<u>Campioni di sangue</u>

- Il dosaggio delle IgA, Gd-IgA1, Gd-IgA1-specifiche IgG, Gd-IgA-specifiche IgA, immunocomplessi Gd-IgA1-IgG.
- Pattern di espressione genica nei PBMC di pazienti con lesioni renali attive o cronico-moderate.

<u>Campioni di urina</u>

- Analisi trascrittomica nelle cellule urinarie

- Analisi trascrittomica sulle microvescicole isolate dalle urine

Campioni di tessuto

- Pattern trascrittomico su RNA estratto da tessuto renale nei pazienti con lesioni renali attive o cronico/moderate.

9.5 Raccolta dei campioni biologici

In questo progetto raccoglieremo campioni sangue, biopsia renale e campioni di urina da pazienti IgAN con lesioni renali acute, arruolati nello studio clinico ACIgAN, e da pazienti IgAN con lesioni renali corniche e , nello studio clinico CHRONIgAN. I campioni di sangue e urine saranno raccolti in ogni paziente il giorno stesso prima verrà eseguita la biopsia renale e poi durante il decorso clinico della malattia. I pazienti IgAN saranno accuratamente stratificati secondo la classificazione MEST-C.

I campioni di sangue e urina saranno raccolti in tempi diversi (T) durante il follow-up dello studio CLIgAN:

i. Pazienti con lesioni renali attive: T0, T1, T2, T4, T6, T8, T12, T24, T36 mesi
ii. Pazienti con lesioni renali croniche e moderate: T0, T1, T4, T8, T10, T14, T24, T36 mesi

Campioni di sangue. 10 ml di sangue saranno raccolti in provette contenenti EDTA o eparina per l'isolamento dei leucociti del sangue periferico che saranno utilizzati per studi di trascrittomica.

Saranno raccolti campioni di siero per la misurazione di IgA, Gd-IgA1 e altri biomarcatori. Alcuni di questi biomarcatori sono stati descritti come predittori prognostici, ma nessuno è stato convalidato in studi clinici prospettici. Pertanto, misureremo alcuni biomarcatori attuali, coinvolti nella patogenesi della malattia come Gd-IgA1, durante il follow-up.

Campioni di urina. Saranno raccolti 30-50 ml di urina della seconda minzione mattutina per l'isolamento delle microvescicole urinarie.

La biopsia renale sarà utilizzata per la diagnosi istologica e la tecnica di immunofluorescenza. Quindi, la trascrittomica sarà eseguita su RNA messaggero eluito da sezioni di 5 micron di spessore per un totale di 8 sezioni.

9.6 Metodi

Tutti i campioni saranno conservati in freezer a -20°C e –80°C nei centri partecipanti. Ogni sei mesi, o quando possibile, i campioni biologici raccolti saranno inviati alla Fondazione Schena per lo studio molecolare. Le spese di spedizione saranno supportate dalla Fondazione.

L'analisi del trascrittoma verrà eseguita utilizzando il sequenziamento dell'RNA di cellule singole o nucleari.

9.7 Analisi statistica

I dati della trascrittomica saranno elaborati mediante analisi computazionale e intelligenza artificiale (reti neutrali artificiali e deep learning).

L'analisi integrativa dei dati di trascrittomica sarà comparata con la risposta alla terapia combinata (corticosteroidi e RASB) nei pazienti IgAN con lesioni renali attive e alla terapia combinata (Dapagliflozin e RASB) nei pazienti con lesioni renali croniche o moderate.

9.8 Consenso o assenso

Ulteriore richiesta di consenso verrà effettuata per la raccolta dei campioni biologici (sangue, urine e tessuto renale) che saranno usati per lo studio ancillare "Analisi biomolecolare comparata con la terapia di precisione nei pazienti IgAN" (BIO-D).

9.9 Dove sarà condotta la ricerca

I campioni biologici saranno raccolti nei centri nefrologici e analizzati nei laboratori della Fondazione Schena. Ogni sei mesi i campioni saranno spediti alla Fondazione Schena per lo studio molecolare. Le spese di spedizione saranno a carico della Fondazione.

La Fondazione Schena ha sede presso Il Dipartimento di Emergenza Trapianto, Policlinico, Università di Bari, che dispone di laboratori moderni di ricerca di biologia molecolare completamente attrezzati contenenti strumentazioni analitiche e genomiche per eseguire tutte le analisi. Il sequenziamento dell'RNA di singola cellula (sc-RNA-seq) e le analisi computazionali saranno effettuate in outsourcing in collaborazione con il Dipartimento di Biologia Molecolare dell'Università di Bari.

9.10 Politica di diffusione

Il piano per divulgare i risultati della sperimentazione si baserà sulla presentazione dei dati a Congressi Nazionali ed Internazionali e sulla pubblicazione di articoli in riviste scientifiche internazionali. Inoltre, la diffusione dei dati avverrà tramite il sito web, appositamente disegnato e sviluppato per il progetto BIO-D/CLIgAN. Il progetto sarà discusso nelle fasi di avanzamento nel Comitato Direttivo.

La condivisione dei dati sarà stabilita dal Comitato Direttivo.

10. REFERENCES

1. Schena FP, Nistor I. Epidemiology of IgA Nephropathy: A Global Perspective. Semin Nephrol. 38:435-442,2018.

2. Koyama A, Igarashi M, Kobayashi M. Natural history and risk factors for immunoglobulin A nephropathy in Japan. Research Group on Progressive Renal Diseases Am J Kidney Dis. 29:526-532,1997.

3. Manno C, Strippoli GF, D'Altri C, Torres D, Rossini M, Schena FP, et al. A novel simpler histological classification for renal survival in IgA nephropathy: a retrospective study. Am J Kidney Dis. 49:763-75,2007. 4. KDIGO Clinical Practice Guideline for Glomerulonephritis. Kidney Intern Suppl. 2:209-217, 2012.

5. KDIGO Clinical Practice Guideline for Glomerulonephritis. In press. Kidney Intern Suppl 2021

6. Cattran DC, Coppo R, Cook HT, et al. The Oxford classification of IgA nephropathy: rationale, clinicopathological correlations, and classification Kidney Int. 2009;76:534-545,

7. Roberts IS, Cook HT, Troyanov S, et al. The Oxford classification of IgA nephropathy: pathology definitions, correlations, and reproducibility. Kidney Int 2009;76:546–556

8. Trimarchi H, Barratt J, Cattran DC, et al. Oxford Classification of IgA nephropathy 2016: an update from the IgA Nephropathy Classification Working Group. Kidney Int. 2017;91:1014-1021.

9. Coppo R, Troyanov S, Bellur S, et al. VALIGA study. Validation of the Oxford classification of IgA nephropathy in cohorts with different presentations and treatments. Kidney Int. 2014;86:828–836

10. Shen XH, Liang SS, Chen HM, Le WB, Jiang S, Zeng CH, Zhou ML, Zhang HT, Liu ZH. Reversal of active glomerular lesions after immunosuppressive therapy in patients with IgA nephropathy: a repeat-biopsy based observation. J Nephrol. 2015;28:441-449.

11. Moriyama T , Karasawa K , Miyabe Y , Akiyama K , Ogura S et al. Validation of the revised Oxford classification for IgA nephropathy considering treatment with corticosteroids/immunosuppressors. Sci Rep 2020;10:11151.

12. Luo MN, Pan QP, Huang ZQ, Li SM, Xu YZ, Liu HF IgA nephropathy patients with partial crescent formation benefit from immunosuppressants: evidence from repeat renal biopsy. Discovery medicine: 2020-12-29

13. Itami S, Moriyama T, Miyabe Y, Karasawa K, Nitta K. A Novel Scoring System Based on Oxford Classification Indicating Steroid Therapy Use for IgA Nephropathy. Kidney Intern Reports 2022: 7, 99–107

14. Tumlin JA, Lohavichan V, Hennigar R. Crescentic, proliferative IgA nephropathy: clinical and histological response to methylprednisolone and intravenous cyclophosphamide. Nephrol Dial Transplant. 2003;18:1321-1329.

15.Yang P, Chen X, Zeng L, Hao H, Xu G. The response of the Oxford classification to steroid in IgA nephropathy: a systematic review and meta-analysis. Oncotarget. 2017;8:59748-59756.

16. Tesar V, Troyanov S, Bellur S, Verhave JC, Cook HT, Feehally J, Roberts IS, Cattran D, Coppo R; VALIGA study of the ERA-EDTA Immunonephrology Working Group Corticosteroids in IgA Protocol Number: CLIgAN (Version: 4.0; Version Date: 14/Sep/2022) EudraCT Number: 2021-006854-29 Page 51 of 53 Nephropathy: A Retrospective Analysis from the VALIGA Study. .J Am Soc Nephrol. 2015;26:2248- 2258

17. Guo, Y., Shi, S., Zhou, X. et al. The effect of immunosuppressive therapy in patients with fibrinoid necrosis lesions in a large cohort of patients with IgA nephropathy. J Nephrol (2021). https://doi.org/10.1007/s40620-021-01176-x

18. Li Y, Fu R, Gao J, Wang L, Duan Z et al. Effect of pulsed intravenous methylprednisolone with alternative low-dose prednisone on high-risk IgA nephropathy: a 18-month prospective clinical trial. Sci Rep 2022;12:255.

19. Natale P, Palmer SC, Ruospo M, Saglimbene VM, Craig JC, Vecchio M, Samuels JA, Molony DA, Schena FP, Strippoli GF. Immunosuppressive agents for treating IgA nephropathy. Cochrane Database Syst Rev. 2020; 12;3

20. Tan J, Dong L, Ye D, Tang Y, Hu T et al. The efficacy and safety of immunosuppressive therapies in the treatment of IgA nephropathy: A network meta-analysis. Scientific Reports 2020, 10:6062

21. Hill, Austin Bradford (1965). "The Environment and Disease: Association or Causation?". Proceedings of the Royal Society of Medicine. 58 (5): 295– 300. doi:10.1177/003591576505800503. PMC 1898525. PMID 14283879.

22. Rauen T, Eitner F.Floege J, Sommerer C, Zeier M, Otte B, et al. Intensive Supportive Care plus Immunosuppression in IgA Nephropathy. N Engl J Med. 374:992-993, 2016.

23. Lv J, Zhang H, Wong MG, Jardine MJ, Hladunewich M, Jha V, et al. Effect of Oral Methylprednisolone on Clinical Outcomes in Patients With IgA Nephropathy: The TESTING Randomized Clinical Trial. JAMA. 318:432-442,2017.

24. Wong MG, Lv J, Hladunewich MA, Jha, Hooi LS et al. TESTING Study Group The Therapeutic Evaluation of Steroids in IgA Nephropathy Global (TESTING) Study: Trial Design and Baseline Characteristics. Am J Nephrol 2021;52(10-11):827-836.

25 Jullien P, Laurent B, Berthoux F, Masson I, Dinic M et al., Repeat renal biopsy improves the Oxford classification-based prediction of immunoglobulin A nephropathy outcome. Nephrology Dialysis Transplantation 2020, 35:1179–1186,

26. Troyanov S, Hladunewich M, Reich HN. How Should Pathology Findings Influence Treatment in IgA Nephropathy? Kidney Int Rep (2022) 7, 3–5; https://doi.org/10.1016/j.ekir.2021.11.001

27. Wanner C, Inzucchi SE, Zinman B. Empagliflozin and Progression of Kidney Disease in Type 2 Diabetes N Engl J Med 375:323-329,2016.

28. Jardine MJ, Mahaffey KW, Perkovic V. Jardine MJ, et al. Canagliflozin and Renal Outcomes in Diabetic Nephropathy. N Engl J Med. 381:1089-1090,2019

29. Heerspink HJL, Stefánsson BV, Correa-Rotter R, Chertow GM, Greene T, Hou FF, Mann JFE, McMurray JJV, Lindberg M, Rossing P, Sjöström CD, Toto RD, Langkilde AM, Wheeler DC; Dapagliflozin in Patients with Chronic Kidney Disease. N Engl J Med. 383:1436-1446,2020

30. Wheeler DC, et al. A pre-specified analysis of the DAPA-CKD trial demonstrates the effects of dapagliflozin on major adverse kidney events in patients with IgA nephropathy. Kidney Intern, 2021; 100:215-224.Protocol Number: CLIgAN (Version: 4.0; Version Date: 14/Sep/2022) EudraCT Number: 2021-006854-29 Page 52 of 53

31. David ZI, et al. Effects of the SGLT2 inhibitor dapagliflozin on proteinuria in non-diabetic patients with chronic kidney disease (DIAMOND): a randomised, double-blind, crossover trial. Lancet Diabetes Endocrinol. 2020;8:582-593.

32. Schena FP, Anelli VW, Trotta J, Di Noia T, Manno C, Tripepi G, et al. Development and testing of an artificial intelligence tool for predicting end stage kidney disease in patients with immunoglobulin A nephropathy. Kidney Int. S0085-2538:30969-8,2020.

33. K Murnaghan, D Vasmant, A Bensman Pulse methylprednisolone therapy in severe idiopathic childhood nephrotic syndrome Acta Paediatr Scand. 1984;73:733-739

34. Kazuetsu Mori, Masataka Honda, Masahiro Ikeda Efficacy of methylprednisolone pulse therapy in steroid-resistant nephrotic syndrome Pediatr Nephrol. 2004;19:1232-1236.

35. Scheinberg M. The history of pulse therapy in lupus nephritis (1976–2016). Lupus Science & Medicine 2016;3:e000149

36. PonticelliC. Locatelli F. Glucocorticoids in the Treatment of Glomerular Diseases Clin J Am Soc Nephrol. 2018; 13: 815–822.

37. Rossing P, Inzucchi SE, Vart P, Jongs N, Docherty KF et al for the DAPA-CKD and DAPA-HF Trial Committees and Investigators Dapagliflozin and new-onset type 2 diabetes in patients with chronic kidney disease or heart failure: pooled analysis of the DAPA-CKD and DAPA-HF trialsDAPA-CKD and DAPA-HF Trial Committees and Investigators. Lancet Diabetes Endocrinol. 2022;10:24-34.

38. Vallon V. The mechanisms and therapeutic potential of SGLT2 inhibitors in diabetes mellitus Annu Rev Med. 2015;66:255-2570.

39. Leon SJ, Tangri N. The Use of Renin-Angiotensin System Inhibitors in Patients With Chronic Kidney Disease. Can J Cardiol 2019;35:1220-1227

40. Kamiyama T, Moriyama T, Kumon S, Karasawa K, Nitta K. The beneficial effects of reninangiotensin system inhibitors (RASI) on IgA nephropathy with tubulointerstitial lesions categorized by Oxford classification. Clin Exp Nephrol 2019;23:834-840

41. Pozzi C, Bolasco PG, Fogazzi GB, Andrulli S, Altieri P, Ponticelli C, Locatelli F. Corticosteroids in IgA nephropathy: a randomised controlled trial. Lancet 1999;353:883-887.

42. Rauen T, Fitzner C, Eitner F, Sommerer C, Zeier M, Otte B, et al. Effects of Two Immunosuppressive Treatment Protocols for IgA Nephropathy. J Am Soc Nephrol. 29:317-325,2018.

43. Katafuchi R, Ninomiya T, Mizumasa T, Ikeda K et al. The improvement of renal survival with steroid pulse therapy inn IgA nephropathy,. Nephrol Dial Transpl 2008;23:3915-3920

44. Inker LA, Lambers-Heerspink H, Tighiouart H, et al. Association of treatment effects on early change in urine protein and treatment effects on GFR slope in IgA nephropathy: An individual participant meta-analysis. Am. J. Kidney Dis. 78:340-349, 2021.

45. Neuen BL, Young T, Heerspink HJL, Neal B, Perkovic V, Billot L et al. SGLT2 inhibitors for the prevention of kidney failure in patients with type 2 diabetes: a systematic review and metaanalysis. Lancet Diabetes Endocrinol. 7:845-854,2019Protocol Number: CLIgAN (Version: 4.0; Version Date: 14/Sep/2022) EudraCT Number: 2021-006854-29 Page 53 of 53

46. Kang SH, Choi SR, Park HS, Lee JY, Sun IO, Hwang HS, et al. The Oxford classification as a predictor of prognosis in patients with IgA nephropathy. Nephrol Dial Transplant. 27:252-258,2012.

47. Chakera A, MacEwen C, Bellur SS, Chompuk LO, Lunn D, Roberts ISD. Prognostic value of endocapillary hypercellularity in IgA nephropathy patients with no immunosuppression. J Nephrol. 29:367-375,2016.

48. Park S, Baek CH, Park SK, Kang HG, Hyun HS, Park E, et al. Clinical Significance of Crescent Formation in IgA Nephropathy - a Multicenter Validation Study. Kidney Blood Press Res. 44:22-32,2019.

49. Herzenberg AM, Fogo AB, Reich HN, Troyanov S, Bavbek N, Massat AE, et al. Validation of the Oxford classification of IgA nephropathy Kidney Int . 80:310-317,2011.

50. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF 3rd, Feldman HI et al. CKD-EPI. A new equation to estimate glomerular filtration rate. Ann Intern Med. 150:604-612,2009.

51. Greene T, et al. Performance of GFR Slope as a Surrogate End Point for Kidney Disease Progression in Clinical Trials: A Statistical Simulation. Am Soc Nephrol. 2019;30:1756-1769.

52. Reich HN, Troyanov S, Scholey JW, Cattran DC for the Toronto Glomerulonephritis Registry Remission of Proteinuria Improves Prognosis in IgA Nephropathy JASN 18: 3177-3183, 2007.

53. Lea J, Greene T, Hebert L, Lipkowitz M, Massry S, Middleton J et al. The relationship between magnitude of proteinuria reduction and risk of end-stage renal disease: results of the African American study of kidney disease and hypertension. Arch Intern Med. 25;165:947-953,2005.

54. Placzek WJ, Yanagawa H, Makita Y, Renfrow MB, Julian BA, Rizk DV, Suzuki Y, Novak J, Suzuki H. Serum galactose-deficient-IgA1 and IgG autoantibodies correlate in patients with IgA nephropathy. PLoS One. 2018 Jan 11;13(1):e0190967.

55. Cox SN, Sallustio F, Serino G, Pontrelli P, Verrienti R, Pesce F, Torres DD, Ancona N, Stifanelli P, Zaza G, Schena FP. Altered modulation of WNT-beta-catenin and PI3K/Akt pathways in IgA nephropathy. Kidney Int. 2010 Aug;78(4):396-407.

56. Cox SN, Serino G, Sallustio F, Blasi A, Rossini M, Pesce F, Schena FP. Altered monocyte expression and expansion of non-classical monocyte subset in IgA nephropathy patients. Nephrol Dial Transplant. 2015 Jul;30(7):1122-232.

57. Cox SN, Sallustio F, Serino G, Loverre A, Pesce F, Gigante M, Zaza G, Stifanelli PF, Ancona N, Schena FP. Activated innate immunity and the involvement of CX3CR1-fractalkine in promoting hematuria in patients with IgA nephropathy. Kidney Int. 2012 Sep;82(5):548-60.

58. Cox SN, Chiurlia S, Divella C, Rossini M, Serino G, Bonomini M, Sirolli V, Aiello FB, Zaza G, Squarzoni I, Gangemi C, Stangou M, Papagianni A, Haas M, Schena FP. Formalin-fixed paraffinembedded renal biopsy tissues: an underexploited biospecimen resource for gene expression profiling in IgA nephropathy. Sci Rep. 2020 Sep 16;10(1):15164.