

Traduzione del brevetto europeo n. 3151853 dal titolo:

“ACIDO GLUTAMMICO DECARBOSSILASI (GAD) PER L'USO NEL TRATTAMENTO DI UNA MALATTIA AUTOIMMUNE”

A nome di: DIAMYD MEDICAL AB

Con sede in: Kungsgatan 29 - 11156 Stockholm / SE

\*\*\*\*\*

### **Campo dell'Invenzione**

La presente invenzione si riferisce in generale al campo dell'immunologia e in particolare all'immunoterapia. Più in particolare, la presente invenzione riguarda la prevenzione e/o il trattamento di malattie autoimmuni, come diabete di tipo 1 o diabete autoimmune. La presente invenzione fornisce composizioni e combinazioni che sono particolarmente utili nella prevenzione e/o nel trattamento di tale malattia. Vengono forniti anche metodi per terapie di combinazione per il trattamento e/o la prevenzione di malattie autoimmuni.

### **Stato della Tecnica**

Il sistema di difesa immunitario, come molti sistemi di difesa, è costituito da numerose parti, per lo più interattive. Esiste il sistema innato, che fondamentalmente si ritiene reagisca attraverso i recettori di riconoscimento di pattern, come, come i recettori Toll-simili, contro antigeni microbici (ag) piuttosto ben noti e comuni; ed esiste il sistema acquisito che può adattarsi per rispondere a una grande varietà di invasori estranei e inoltre creare e mantenere cellule della memoria che reagiscono rapidamente nel caso in cui si verificano nuovi incontri con lo stesso ag.

Nelle malattie autoimmuni, il sistema immunitario adattativo comunemente reagisce contro almeno un self-antigene (auto-antigene, aag). Sebbene non completamente compresa, l'autoimmunità può essere scatenata in vari modi. Esempi di possibili fattori scatenanti discussi includono, ma non sono limitati a, risposte innate a virus, diete, vitamine, stress, microbiomi, vaccini, antibiotici e altri farmaci. La predisposizione genetica è un ulteriore fattore importante.

Nel caso di autoantigeni prodotti per via endogena, questi vengono processati all'interno di una cellula e i suoi peptidi vengono trasportati sulla superficie cellulare insieme alle molecole MHC-I ed esposti a varie cellule, incluse le cellule T CD8+ naïve; le cellule T CD8+ citotossiche già mature; e/o le cellule T effettrici della memoria CD8+. Per attivare una cellula T CD8+ naïve a maturare in un linfocita T citotossico, è necessario un segnale secondario di co-stimolazione associato al CD28.

Un autoantigene che non si trova all'interno di una cellula viene normalmente assorbito da una cellula presentante l'antigene (APC), come una cellula dendritica (DC) o i macrofagi, e i peptidi processati verranno trasportati insieme a molecole MHC-II e presentati a cellule naïve T CD4+ della memoria o mature. Anche qui c'è un secondo segnale di co-stimolazione che coinvolge il CD28, necessario per attivare le cellule T CD4+ naïve in una forma di cellula T-helper (Th). Di solito vengono discusse due

forme di cellule Th: Th1; Th2.

Quale tipo di linfocita Th venga generato a seguito dell'incontro tra il complesso APC-MHCII-ag e il recettore di cellule T CD4+ (TCR) dipende da diversi fattori, che includono la maturità della DC e il mezzo circostante, che include la, ma non è limitata alla, disponibilità di IL-10, al momento della presentazione. Mentre una cellula Th1 secreta citochine infiammatorie, che includono l'IFN $\gamma$ , e stimola una risposta infiammatoria cellulo-mediata, le cellule Th2 tipicamente secernono IL4 e stimolano una risposta umorale dove i BC producono anticorpi non citolitici e neutralizzanti. Gli anticorpi per il "rivestimento" e il fissaggio del complemento (tossicità cellulare anticorpo-dipendente) sono solitamente stimolati dal sistema innato.

Ogni linfocita B (BC) esprime il suo unico e specifico recettore dei linfociti B (BCR) sotto forma di una molecola di anticorpo immobilizzata. Mentre i TC riconoscono l'antigene cognato ag - come peptide processato nel contesto di una molecola MHC, le cellule B riconoscono gli antigeni nella loro forma nativa (tali antigeni non processati normalmente non interagiscono con l'attivazione delle cellule T), e con l'aiuto principalmente della segnalazione di Th2 si differenziano in cellule plasmatiche che producono anticorpi di breve durata, il 10% dei quali si ritiene che diventino BC di memoria antigene-specifici a lunga durata.

Si ritiene comunemente nel campo che l'insulina e le molecole associate all'insulina siano le prime molecole a essere coinvolte nel processo che porta al diabete autoimmune, inclusi i diabeti di tipo 1 e i diabeti autoimmuni latenti nell'adulto. Sono stati condotti estesi studi clinici e sono attualmente effettuati utilizzando diverse formulazioni derivate dall'insulina al fine di indurre tolleranza e arrestare o prevenire la progressione della malattia. Molte altre molecole di antigene delle cellule beta e loro peptidi, che includono la, ma non sono limitate alla, GAD65, sono stati provati per lo stesso scopo, e altri, non limitati alla catena B dell'insulina e alla pro-insulina e loro varianti, sono in preparazione per lo sviluppo clinico.

Durante lo sviluppo del sistema immunitario nell'uomo, si ritiene che i linfociti reattivi al self-antigene siano eliminati per clonaggio per discriminare il self dal non-self. I linfociti T reattivi non-self vengono salvati e continuano a differenziarsi in cellule T CD4+ o CD8+ naïve, che possono essere attivate in caso di incontro con il loro antigene specifico. Alcuni linfociti auto-reattivi sfuggono tuttavia al processo di delezione. Ancora di più se l'antigene è sequestrato come ad esempio all'interno di una cellula. Nel caso dell'insulina, tuttavia, come esempio di una molecola abbondante, relativamente pochi linfociti insulino-reattivi sfuggono al processo di delezione e di conseguenza esistono relativamente poche cellule naïve T CD4+ o CD8+ insulino-reattive.

Molecole abbondanti presenti in natura, come ad esempio l'insulina, non vengono solitamente assorbite e presentate dalle DC a meno che questo processo non sia avviato da cellule T CD8+ attivate e/o da segnalazione TLR. Pertanto, e ciò può non essere stato notato nel campo, il processo



autoimmune che porta ai diabeti può in molti casi essere avviato da linfociti naïve CD8+ insulino-reattivi sfuggiti che riconoscono aag direttamente associato con MHC di classe-1 su cellule degli organi bersaglio. Nel caso di soggetti geneticamente predisposti, un timocita CD8+ naïve reattivo all'insulina "sfuggito" può di conseguenza innescare un processo infiammatorio che include la generazione di cellule citotossiche CD8+ che a loro volta possono indurre citochine che allertano il sistema innato includendo aumentare il fatto di provocare che i BC producano anticorpi anti-insulina. Alcune cellule beta soccomberanno e rilasceranno gli antigeni sequestrati, come ad esempio la GAD65, per cui esiste un'abbondante quantità di TC CD4+ e CD8+ naïve. La GAD65 può inoltre avere elementi comuni con alcune strutture virali che stimolano ulteriormente la segnalazione TLR-simile.

Mentre la reazione autoimmune lavora, si sviluppano meccanismi contro infiammatori, come ad esempio l'espressione di molecole CTLA4 e la secrezione di IL-10. Poiché nel caso dell'insulina, il contributo di ADC-MHCII alla malattia autoimmune emergente è debole, tali meccanismi compensativi inducono la tolleranza all'insulina in un modo autoantigene-specifico. Tuttavia, le molecole di GAD vengono assorbite, le DC trasformate e i peptidi di GAD vengono presentati ai TC CD4+ naïve, attivandoli in forma di cellule Thelper. Pertanto, una reazione immunitaria transitoria all'insulina viene sostituita da una reazione più solida nei confronti della GAD. Questo spiega perché in molti bambini piccoli geneticamente predisposti il primo autoanticorpo spesso è diretto all'insulina e perché tali anticorpi spesso scompaiono con il progredire della malattia.

Mocellin in: Cytokine Growth Factor Rev. 2004, *The multifaceted relationship between IL-10 and adaptative immunity: Putting together the pieces of a puzzle*, descrive come l'interleuchina-10 (IL-10) sia una citochina pleiotropica che modula la funzione di numerose cellule adattative correlate all'immunità. Sebbene generalmente considerata una molecola immunorepressiva, la IL-10 possiede proprietà immunostimolanti in modelli in vivo. Ad esempio, la IL-10 prodotta localmente da cellule di isole pancreatiche stimola la progressione dell'autoimmunità nel topo NOD, mentre la somministrazione sistemica può avere un effetto anti-infiammatorio e di conservazione delle cellule beta. Viene fornito un sommario della relazione tra la IL-10 e malattie infettive, autoimmunità, allergia, cancro e trapianto che coinvolgono l'immunità adattativa.

Russel et al. in: Islets. 2014, *The impact of anti-inflammatory cytokines on the pancreatic  $\beta$ -cell*, più recentemente hanno presentato evidenze del fatto che molecole antinfiammatorie come l'interleuchina (IL)-4, IL-10 e IL-13 possono esercitare un'influenza diretta sulla funzione delle cellule- $\beta$  e vitalità e che i livelli circolanti di queste citochine potrebbero essere ridotti nei diabeti di tipo 1 e hanno proposto che il targeting delle vie anti-infiammatorie potrebbe offrire un potenziale terapeutico nei diabeti di tipo 1.

Calcinaro et al. in: Diabetologia. 2005, *Oral probiotic administration induces interleukin-10 production*



*and prevents spontaneous autoimmune diabetes in the non-obese diabetic mouse*, hanno concluso che la somministrazione orale precoce di batteri probiotici ha evitato lo sviluppo del diabete in topi NOD ed è stata associata ad una maggiore espressione di IL-10 nel pancreas, dove sono state rilevate cellule mononucleate isole-infiltranti IL-10 positive.

Van Dongen e al. in: *Int J Cancer*. 2010 Aug 15; 127 (4): 899-909. doi: 10.1002/ijc.25113. *Anti-inflammatory M2 type macrophages characterize metastasized and tyrosine kinase inhibitor-treated gastrointestinal stromal tumors (GIST)*, riportano che i tumori trattati con gli inibitori della tirosina chinasi imatinib e sunitinib, hanno indotto la secrezione di IL-10 anti-infiammatoria nelle colture di macrofagi, indicando che il trattamento con questi inibitori potrebbe contribuire a un microambiente immunosoppressivo nel GIST. Nel complesso, i dati hanno rivelato che il GIST è un sito attivo di interazione immunitaria-tumore in cui i meccanismi di soppressione prevalgono sulle potenziali risposte antitumorali. Gli inibitori della tirosina chinasi potrebbero favorire questo equilibrio negativo.

Louvet et al. in: *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008, *Tyrosine kinase inhibitors reverse type 1 diabetes in nonobese diabetic mice*, riportano come gli inibitori della tirosina chinasi (TK) offrano opportunità per il trattamento delle malattie autoimmuni. Il trattamento con imatinib (Gleevec) ha prevenuto e invertito il T1D in topi NOD. Risultati simili sono stati osservati con il sunitinib (Sutent). Un altro inibitore di TK, il PLX647, ha mostrato un'efficacia solo marginale, mentre una forma solubile del recettore del fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGFR), il PDGFRbetalg, ha rapidamente invertito il diabete. Il trattamento con Imatinib ha portato a una remissione duratura e la tolleranza e l'efficacia a lungo termine verosimilmente dipendono dall'inibizione di una combinazione di tirosina chinasi, a supporto dell'uso di inibitori selettivi della chinasi per il trattamento del T1D.

Agostino et al. in: *J Oncol Pharm Pract*. Epub 2010, *Effect of the tyrosine kinase inhibitors (sunitinib, sorafenib, dasatinib, and imatinib) on blood glucose levels in diabetic and nondiabetic patients in general clinical practice*, descrivono con gli inibitori di tirosina chinasi (i TKI) hanno influenzato le concentrazioni di glucosio nel sangue (blood glucose BG) in pazienti trattati con dasatinib, imatinib, sorafenib e sunitinib. Tutti hanno mostrato cali significativi di BG. Sebbene il meccanismo dell'effetto ipoglicemico di questi farmaci non sia chiaro, c-kit e PDGFR $\beta$  sono state le chinasi bersaglio comuni.

Adorini in: *Ann N Y Acad Sci*. 2003, *Tolerogenic dendritic cells induced by vitamin D receptor ligands enhance regulatory T cells inhibiting autoimmune diabetes*, riporta che la 1,25-Diidrossivitamin D(3) induce le DC con un fenotipo tolerogenico, caratterizzate da una diminuita espressione di molecole di co-stimolazione CD40, CD80, e CD86, da una bassa IL-12, e da un'aumentata secrezione di IL-10. Il trattamento con 1,25-(OH)(2)D(3) ha indotto la tolleranza agli allotrapianti di isole di topo associati allo sviluppo alterato di cellule di tipo 1 CD4(+) e CD8(+) e una percentuale aumentata di cellule regolatrici CD25(+) CD4(+) e ha anche inibito lo sviluppo del diabete a dosi non iper-calcemiche, suggerendo la vitamina D come approccio per il trattamento dei diabete di tipo 1.



Heine et al. in: Eur J Immunol. 2008, *1,25-dihydroxyvitamin D(3) promotes IL-10 production in human B cells*, riportano che la 1,25-diidrossivitamina D(3) (calcitriolo) inibisce l'espressione di IgE da parte delle cellule B e migliora l'espressione di IL-10 da parte delle cellule dendritiche e delle cellule T. Il collegamento molecolare nelle cellule B attivate tra la segnalazione di vitamina D, l'espressione di IL-10 e la loro capacità di produrre calcitriolo dal suo precursore, suggeriscono che la 25-idrossivitamina D(3) può essere utilizzata come modulatore delle risposte immunitarie.

Niirio et al. in: Biochem Biophys Res Commun. 1998, 1998, *MAP kinase pathways as a route for regulatory mechanisms of IL-10 and IL-4 which inhibit COX-2 expression in human monocytes*, descrive come le protein chinasi attivate dal mitogeno (le MAPK) sono attivate e svolgono un ruolo importante nella regolazione dell'espressione delle molecole pro-infiammatorie nei monociti / macrofagi. I monociti umani stimolati da lipopolisaccaride (LPS) inducono la proteina COX-2 e l'espressione dell'mRNA di COX-2, nonché la proteina chinasi segnale-regolata (ERK)2 e MAPK p38 nei monociti. L'induzione di mRNA COX-2, di proteina COX-2 e di prostaglandine (PG)E2 da parte di LPS è stata inibita dagli inibitori specifici di ERK e MAPK p38. L'interleuchina (IL) -10 ha inibito allo stesso modo l'espressione COX-2. La fosforilazione indotta da LPS e l'attivazione di ERK2 e MAPK p38 sono state significativamente inibite dalla IL-10, suggerendo che l'inibizione da parte della IL-10 dell'espressione indotta da LPS di molecole pro-infiammatorie potrebbe essere attribuita agli effetti regolatori di entrambe le citochine sull'attivazione MAPK.

Obermajer et al. in: Blood. 2011, *Positive feedback between PGE2 and COX2 redirects the differentiation of human dendritic cells toward stable myeloid-derived suppressor cells*, descrivono come le cellule dendritiche (DC) e le cellule soppressorie mieloide-derivate (MDSC) mostrano ruoli opposti nel sistema immunitario.

La cicloossigenasi 2 (COX2) è il regolatore chiave della sintesi di PGE(2) e un fattore determinante nel reindirizzare lo sviluppo di DC CD1a(+) a MDSC monocitiche CD14(+)CD33(+)CD34(+). Il PGE(2) esogeno e attivatori di COX2 così diversi come il lipopolisaccaride, la IL-1 $\beta$  e l'IFN $\gamma$  inducono tutti l'espressione di monociti di COX2, bloccando la loro differenziazione nelle DC CD1a(+) e inducendo PGE(2) endogeno, IDO1, IL-4R $\alpha$ , NOS2 e IL-10, tipici fattori soppressivi associati alle MDSC. L'interruzione di feedback di COX2-PGE(2) mediante inibitori della COX2 o antagonisti di EP2 ed EP4 sopprime la produzione di fattori soppressivi associati alle MDSC e la funzione CTL-inibitoria delle MDSC completamente sviluppate di pazienti affetti da cancro. Il ruolo centrale di feedback di COX2-PGE(2) nell'induzione e nella persistenza delle MDSC evidenzia il potenziale per la sua manipolazione per migliorare o sopprimere le risposte immunitarie nel cancro, nell'autoimmunità o nel trapianto.

Lieb in: Med Hypothesis. 2007, *Antidepressants, prostaglandins and the prevention and treatment of cancer*, riporta che un meccanismo putativo di carcinogenesi sono la sovraregolazione della

cicloossigenasi, la sintesi e l'espressione di oncogeni, l'attivazione virale, l'interruzione del segnale, l'apoptosi fallita, l'avvio e la promozione del tumore, l'angiogenesi, la metastasi, l'immunosoppressione, l'attività della telomerasi e l'autoimmunità. Tutti sono regolati dalle prostaglandine. La regressione osservabile e radiografica del cancro è stata documentata in pazienti che assumono farmaci non steroidei e anti-prostaglandine, come l'indometacina e l'ibuprofene.

Kim et al. in: *Immune Netw.* 2010, *Cyclooxygenase Inhibitors, Aspirin and Ibuprofen, Inhibit MHC-restricted Antigen Presentation in Dendritic Cells*, riportano che i FANS hanno effetti immunomodulatori sulle cellule T e B e che l'ibuprofene inibisce la presentazione dell'antigene MHC di classe I e di classe II - ristretta nelle cellule dendritiche (DC). L'ibuprofene non ha inibito l'attività fagocitaria delle DC, il livello di espressione delle molecole MHC totali e le molecole di co-stimolazione sulle DC. L'ibuprofene ha invece aumentato il livello di espressione delle molecole MHC totali e delle molecole di co-stimolazione sulle DC. I risultati dimostrano che l'ibuprofene inibisce l'elaborazione intracellulare dell'antigene fagocitato e suggeriscono che una somministrazione prolungata di FANS ad alte dosi può compromettere la capacità delle DC di presentare antigeni in associazione con molecole MHC.

Gribben et al. in: *Immunology* 1994, *CTLA4 mediates antigen-specific apoptosis of human T cells*, descrivono come la molecola CTLA4 è una molecola limitata da cellule T indotta dall'attivazione di TCR o di CD28. Durante una risposta immunitaria in corso c'è un equilibrio tra i segnali pro-infiammatori e non pro-infiammatori. La reticolazione di CD28 o la regione di legame comune di CD28/CTLA4 da parte dei mab o dei ligandi naturali B7-1 e 2 fornisce un segnale costimolatorio positivo con conseguente sovraregolazione pro-infiammatoria dell'IL-2. Infatti, la reticolazione di CTLA4 può fornire un debole segnale costimolatorio al CD28. Dopo l'attivazione di cellule T, l'espressione di CD28 è sotto-regolata e la CTLA4 sovra-regolata. In tali momenti la reticolazione di CTLA4 in assenza di costimolazione CD28 può indurre la delezione di cellule T precedentemente attivate, che indica che il CTLA4 può sia costimolare sia indurre la delezione a seconda dello stato di attivazione della cellula T.

Posadas et al. in: *Clinical Immunology* 2009, *Abatacept in the treatment of rheumatoid arthritis*, descrivono che nell'artrite reumatoide (RA), le cellule T e diverse altre cellule tra cui le cellule dendritiche DC, i macrofagi e i fibroblasti, esprimono marcatori di attivazione come il CD28 e l'antigene linfocitario T citotossico 4 (CTLA4). Nel sangue periferico, le cellule T naïve necessitano di due segnali per attivarsi al loro pieno potenziale funzionale: i) un antigene nel contesto di una molecola MHC sulla cellula presentante l'antigene (APC) presentato al corrispondente recettore per l'antigene specifico delle cellule T (TCR) sulla cellula T; e ii) ligazione di CD28 sulla cellula T con CD80/86 sulle APC. La stimolazione di cellule T naïve da parte dell'antigene cognato senza costimolazione porta ad una anergia delle cellule T, mentre la ligazione delle molecole costimolatorie sulle cellule T in assenza di

antigene cognato non ha alcun effetto sulle cellule T.

Una delle molecole di superficie che vengono sovraregolate sulla cellula T attivata dopo una stimolazione riuscita con i due segnali è il CTLA4. Si lega a CD80/86 con una avidità superiore rispetto al CD28. Questo non solo impedisce al CD28 di legarsi, ma il CTLA4 induce anche segnali inibitori nella nuova cellula attivata.

Abatacept (un'immunoglobulina CTLA4 Fc-modificata) è una proteina di fusione, immunomodulante, che riduce le cellule T, costituita dalla porzione extracellulare del CTLA4 umano e dalla catena pesante di IgG1 umana. Essa blocca il segnale costimolatorio coinvolto nell'attivazione di cellule T naïve. La sua ligazione con CD80/86 sulle APC può anche interferire e ridurre la IL-6 indotta da CD80/86, che può sotto-regolare le citochine infiammatorie come la IL-1beta, l'IFNgamma e la IL-17. Un'ulteriore ligazione di Abatacept con CD80/86 può indurre la indoleammina diossigenasi (IDO) nelle APC, che a sua volta può indurre anergia nelle cellule T, nonché sottoregolare l'attivazione di paracrina di cellule T naïve da parte di cellule T attivate.

Sono state presentate opinioni contraddittorie sulla capacità degli Abatacepts di influenzare il richiamo e la restimolazione delle cellule della memoria CD4+. Il CD80/86 espresso sulle cellule B può essere ancora un ulteriore percorso in cui l'abatacept può svolgere una funzione immunomodulante.

Patakas et al. in: abstract # 723 ACR/ARHP, 2013, *Abatacept Is Highly Effective At Inhibiting T Cell Priming and Induces a Unique Transcriptional Profile In CD4+T Cells*, ha mostrato come lo sc priming con ovalbumina in presenza di abatacept ha prodotto grandi quantità di IL-2, assomigliando così alle cellule T naïve esposte per la prima volta all'antigene. Queste cellule T includevano meno cellule T Treg e T4 CD4+ rispetto ad altre popolazioni di cellule T (non innescate o naïve) e il loro stato era accompagnato da un'inibizione dell'attivazione delle cellule dendritiche a livello trascrizionale. Patakas ha concluso che mentre l'abatacept modula in modo significativo la comunicazione T-DC con conseguente innesco cellulare difettoso, questo è distinto dalla tolleranza anergica.

Orban et al. in: Lancet 2011, *Co-stimulation modulation with abatacept in patients with recent-onset type 1 diabetes: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial*, , riportano che l'abatacept preserva significativamente la secrezione endogena di insulina, come misurata mediante peptide C stimolato, nel corso dei 6 mesi iniziali rispetto al placebo, quindi diminuisce in parallelo con il gruppo placebo. Si ritiene che l'effetto benefico iniziale sia dovuto al fatto che l'abatacept blocca il segnale di costimolazione B80/86-CD28 impedendo l'attivazione di cellule T naïve. È stato ipotizzato che la successiva diminuzione della funzione delle cellule beta dopo 6 mesi fosse dovuta al fatto che l'attivazione continua delle cellule T si riduceva con il progredire della malattia.

Sebbene Orban menzioni che l'attivazione di cellule T naïve necessita di due segnali, mentre uno è compreso da un antigene presentato nel contesto di una molecola MHC su una APC; e l'altro è un segnale costimolatorio che coinvolge la molecola CD28 sulla cellula T, durante lo studio non è stato

utilizzato alcun antigene specifico. Questo può essere la base dell'ipotesi che, sebbene l'abatacept prevenga inizialmente e con successo l'attivazione di cellule T naïve in cellule T citotossiche, questo può eventualmente essere contrastato e/o compensato da altre parti del sistema immunitario, come ad esempio una maggiore secrezione di IL-2, e quando questo si è verificato, manca la finestra per indurre la tolleranza a un antigene specifico.

Orban et al. in: *Diabetes Care* 2013, *Costimulation Modulation With Abatacept in Patients With Recent-Onset Type 1 Diabetes: Follow-up 1 Year After Cessation of Treatment*, hanno successivamente riportato un effetto benefico continuato per un anno dopo l'interruzione della somministrazione del farmaco, sebbene le differenze tra il braccio attivo e il placebo siano diminuite. Pertanto, il 35% dei pazienti nel braccio attivo presenta un picco di peptide C stimolato > 0.2 nmol/l rispetto al 30% per i soggetti placebo a 36 mesi dopo l'inizio del trattamento. È stato sottolineato che mancava un effetto con il trattamento con abatacept nei pazienti DR3 negativi.

I due studi di Orban menzionati sopra indicano che la regolazione immunitaria dell'abatacept come terapia a sé stante nei pazienti con diabete di tipo 1 di recente insorgenza non è sufficiente per avere un effetto duraturo di conservazione della funzione delle cellule beta.

Verhagen et al. in: *PLOS* 2014, *CTLA-4 Modulates the Differentiation of Inducible Foxp3+ Treg Cells but IL-10 Mediates Their Function in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*, concludono che la presenza di IL-10 è un fattore importante per migliorare l'effetto repressivo delle Treg.

La GAD65 (l'isoforma da 65 kd della acido glutammico decarbossilasi), è un importante auto-antigene delle cellule beta, poiché viene prodotto nelle isole con un rilascio maggiore come risposta alla stimolazione delle cellule beta. Questa proteina ha dimostrato di influenzare profondamente il processo immunitario autoimmune. Numerosi studi hanno dimostrato che la GAD può prevenire il diabete negli animali da esperimento. La somiglianza della GAD con le proteine virali può essere importante per l'azione terapeutica. L'effetto osservato, anche dopo l'inizio del processo immunitario, suggerisce che potrebbe essere possibile aspettarsi lo stesso effetto nell'uomo. La GAD ricombinante è stata formulata in idrossido di alluminio (allume) e in uno studio di fase II su pazienti affetti da LADA, la somministrazione di una singola dose bassa, Diamyd 20 µg, ha portato a un miglioramento della funzionalità delle cellule beta fino a 2 anni rispetto al gruppo trattato con placebo, senza effetti collaterali. Sono state provate anche altre dosi: 4 µg non hanno mostrato alcun effetto, 100 µg hanno mostrato un effetto simile a 20 µg, mentre 500 µg non hanno mostrato alcun effetto. È stata trovata un'associazione con il cambiamento nel rapporto di cellule CD4+CD25+/CD4-CD25-, indicando un meccanismo per l'effetto. In questo contesto è stato condotto uno studio di fase II su pazienti diabetici di tipo 1 di insorgenza recente di 10-18 anni. I pazienti sono stati randomizzati a 20 µg di GAD-allume (Diamyd) sc al giorno 1 e 30, o placebo. L'effetto ancora dopo 30 mesi è stato notevole, e chiaramente sia statisticamente che clinicamente significativo, con circa la metà della diminuzione del peptide C

nel gruppo trattato con GAD rispetto al gruppo placebo. I pazienti con una durata del diabete <3 mesi hanno avuto un effetto straordinariamente buono con nessuna o con una minima diminuzione della funzione delle cellule beta durante il follow-up dei primi 15 mesi. Ancora dopo 48 mesi i pazienti trattati con durata inferiore a 6 mesi avevano mantenuto in modo significativo il peptide C e nessun evento avverso.

Successivamente sono stati avviati studi di fase III in Europa e negli Stati Uniti. Nello studio europeo sono stati reclutati 334 pazienti in tre bracci, un braccio con GAD-allume (Diamyd) 20 µg al giorno 1, 30, 90 e 270, un altro braccio con GAD-allume 20 µg al giorno 1 e 30 e placebo al giorno 90 e 270 e un terzo braccio con placebo al giorno 1, 30, 90 e 270. Sebbene sia stato osservato un andamento positivo (efficacia del 16%,  $p = 0.1$ ) l'endpoint primario, l'AUC del peptide C sierico dopo un test di tolleranza ai pasti misti (MMTT) a 15 mesi, non è stato raggiunto. Questo ha portato alla chiusura anticipata delle prove di fase III. Tuttavia, lo studio europeo di Fase III ha mostrato un'efficacia statisticamente significativa in alcuni sottogruppi predefiniti. Inoltre, 45 pazienti svedesi avevano superato la visita ai 30 mesi quando lo studio è stato interrotto e quei 15 pazienti che avevano ricevuto due dosi di GAD-allume (Diamyd) 20 µg hanno mostrato una conservazione significativa del peptide C dopo 30 mesi rispetto al placebo. È stato notato che questi pazienti svedesi erano quelli senza efficacia a 15 mesi, mentre l'efficacia è stata trovata a 15 mesi nei pazienti non nordici. Si è concluso che, sebbene parzialmente efficace, potrebbe essere necessario combinare il GAD-allume con altri composti al fine di entrare a far parte di un regime di trattamento clinicamente efficace per i diabete di tipo 1.

Denes et al. in: *Diabetes Technol Ther.* 2010, *Autoantigens plus interleukin-10 suppress diabetes autoimmunity*, hanno riferito che, mentre i ceppi di virus vaccinico ricombinante (rVV) che esprimono la subunità della tossina colerica B immunomodulante (CTB) fusi a un frammento dell'acido glutammico decarbossilasi (GAD65) autoantigene o la citochina immunorepressiva interleuchina-10 (IL-10) sono stati in grado indipendentemente di generare solo bassi livelli di soppressione immunitaria del diabete mellito di tipo 1 (T1DM) nel topo NOD, una combinazione mediata dal virus vaccinia (VV) di proteine di fusione CTB::GAD e proteine IL-10 hanno mostrato di essere una strategia immunoterapica più efficace e duratura per il T1DM.

Robert et al. in: *Diabetes.* 2014, *Oral delivery of glutamic acid decarboxylase (GAD)-65 and IL10 by Lactococcus lactis reverses diabetes in recent-onset NOD mice*, più recentemente hanno dimostrato che la somministrazione orale di batteri di *Lactococcus lactis* (LL) vivi per la secrezione controllata del peptide GAD65370-575 autoantigene T1D e di citochina anti-infiammatoria interleuchina-10, in combinazione con anti-CD3 a basso dosaggio a breve termine, hanno mantenuto la massa funzionale delle cellule β in topi NOD di recente insorgenza.

Skyler et al., *Diabetes* 2011, *Stopping Type 1 Diabetes, Attempts to Prevent or Cure Type 1 Diabetes*

*in Man*, un regime di combinazione che coinvolge un modulatore immunitario e una terapia specifica per l'antigene, fornisce un razionale per un trattamento più duraturo del T1D.

Staeva et al. in: DIABETES, VOL. 62, JANUARY 2013, *Recent Lessons Learned from Prevention and Recent-Onset Type 1 Diabetes Immunotherapy Trials*, riportano lo stato della tecnica del pensiero attuale e raccomanda di valutare le terapie di combinazione che comprendono auto-antigeni e composti anti-infiammatori.

Skyler in: DIABETES TECHNOLOGY & THERAPEUTICS, Volume 16, Supplemento 1, 2014, *Immune Intervention for Type 1 Diabetes, 2012-2013*, esamina i recenti studi sul campo.

Rigby et al. in: Current Opinion Endocrinol Diabetes Obes 2014, 21:271-278, *Targeted immune interventions for type 1 diabetes: not as easy as it looks!* descrivono molti degli sforzi per combattere il diabete autoimmune e concludono che nonostante quasi una dozzina di studi con molte centinaia di partecipanti, non è stata trovata alcuna monoterapia e che: a) diverse sottopopolazioni di pazienti con T1D sembrano rispondere in modo diverso agli interventi immunitari, suggerendo una significativa eterogeneità; b) una terapia efficace deve combinare l'inibizione delle cellule del Teff (per deplezione, maggiore soppressibilità, o entrambe), con la stimolazione delle Treg (per aumento della frequenza o della funzione, inclusa l'ablazione dell'ambiente pro-infiammatorio); e questo può richiedere combinazioni comprendenti un agente di Teff-deplezione, un agente che di Treg-boosting e un antigene.

Come indicato sopra, diverse monoterapie e regimi di combinazione che includono una varietà di composti hanno mostrato effetti promettenti nella prevenzione e nel trattamento dei diabeti autoimmuni nel modello murino. Tuttavia, il trasferimento di tali regimi nell'uomo è sempre fallito nel mostrare un effetto clinicamente significativo. Rimane quindi uno straordinario bisogno di alleviare la società e i pazienti dalla devastante malattia dei diabeti autoimmuni e dalle sue complicazioni a lungo termine. Uno scopo della presente invenzione è quello di divulgare metodi e composizioni per la prevenzione e il trattamento del componente autoimmune di T1D e LADA, aprendo la strada all'aumento endogeno, o realizzato con altri metodi, della massa delle cellule beta funzionali.

### **Sommario dell'Invenzione**

La presente invenzione riguarda l'acido glutammico decarbossilasi (GAD) per l'uso in un metodo per la prevenzione e/o il trattamento di una malattia autoimmune selezionata tra i diabeti di tipo 1, i diabeti autoimmuni e i diabeti autoimmuni latenti, comprendente somministrare a un soggetto una composizione, detta composizione comprendendo l'acido glutammico decarbossilasi, mediante iniezione direttamente in un linfonodo.

Forme di realizzazione preferite dell'invenzione sono esposte nelle rivendicazioni dipendenti.

### **Definizioni**

Tutte le espressioni e i termini utilizzati nel presente documento intendono avere il significato dato loro

dalla persona esperta del settore alla data di deposito della presente domanda, salvo qualsiasi altra espressione sia evidente dal contesto di questa divulgazione. Tuttavia, per motivi di chiarezza, alcuni termini ed espressioni sono esplicitamente definiti di seguito.

Un "autoantigene" o "self-antigene" è un costituente del tessuto endogeno che ha la capacità di interagire con autoanticorpi e provocare una risposta immunitaria. Un "autoantigene di cellule beta" è un autoantigene originato dalle cellule beta pancreatiche.

Un "autoanticorpo" è un anticorpo che reagisce con autoantigeni dell'organismo che li ha prodotti.

Il termine "vitamina D" comprende la vitamina D<sub>2</sub> e la vitamina D<sub>3</sub>. Gli "analoghi della vitamina D" comprendono senza pregiudizio Ergocalciferolo, Diidrotachisterolo, Alfacalcidolo, Calcitriolo, Colecalciferolo e Calcifediolo e loro combinazioni, nonché qualsiasi altro analogo della vitamina D classificato nel gruppo A11CC del Sistema di Classificazione Anatomico Terapeutico e Chimico.

Il termine "inibitori della cicloossigenasi", o "inibitore della cox", si riferisce a composti che si combinano con la cicloossigenasi e quindi impediscono la sua combinazione substrato-enzima con l'acido arachidonico e la formazione di eicosanoidi, prostaglandine e trombossani. Un sottogruppo degli inibitori della cicloossigenasi sono gli inibitori della cicloossigenasi-2, che hanno specificità per la cicloossigenasi-2.

Il termine "inibitore di TNF alfa" si riferisce a composti che inibiscono l'azione del Fattore di Necrosi Tumorale alfa (TNF alfa) e comprende adalimumab, certolizumab, etanercept, golimumab, infliximab, nonché qualsiasi altro composto classificato nel gruppo L04AB del Sistema di Classificazione Anatomico Terapeutico e Chimico.

Un "epitopo" è la porzione superficiale di un antigene in grado di suscitare una risposta immunitaria e di combinarsi con l'anticorpo prodotto per contrastare tale risposta, o un recettore di cellule T.

Il termine "analoghi dell'acido gamma-ammino butirrico" comprende vigabatrin e baclofen.

Le espressioni che usano il singolare "un", "uno/a" e simili devono essere interpretate come comprendenti il plurale.

Come utilizzato nel presente documento, la "co-somministrazione" si riferisce alla somministrazione dei composti del regime della presente invenzione in modo tale che i loro regimi di dosaggio si sovrappongano. Non è necessario che vengano somministrati contemporaneamente.

L'abbreviazione "T1D" sta per "Diabeti di Tipo 1".

#### **Descrizione dettagliata dell'invenzione**

Nel momento in cui un primo autoanticorpo anti-insulina appare in un individuo geneticamente predisposto, come ad esempio, ma non limitato a, un individuo di aplotipo DR3 e non vengono rilevati altri autoanticorpi, questo può significare che le TC CD4+ e CD8+ GAD-reattive non sono state ancora attivate, il che offre una finestra di opportunità per arrestare completamente la malattia con i soli inibitori della differenziazione antinfiammatoria e/o linfocitaria, senza l'uso di un antigene di cellule beta, poiché

è probabile che l'autoimmunità all'insulina venga auto-eliminata dai meccanismi di contrasto. In questa situazione con poche o nessuna cellula Thelper CD4+ attivata GAD-reattiva ancora prodotta, è importante dirigere l'attivazione lontano dal tipo Th1 pro-infiammatorio. Nei soggetti positivi agli anticorpi GAD e/o nei pazienti diabetici, la GAD e altri antigeni di cellule beta formulati in allume, solitamente considerati come adiuvanti di guida di Th2, possono essere aggiunti ai fini della tollerizzazione specifica dell'antigene. Sebbene questo possa produrre più cellule Th2 e Treg che cellule pro-infiammatorie, diversi fattori, inclusi i fattori ambientali interni, possono annullare gli effetti di tollerizzazione. Pertanto, potrebbe non essere sufficiente utilizzare le formulazioni di guida di Th2 di autoantigeni come monoterapie e la presente invenzione divulga composizioni e regimi di combinazione per migliorare i protocolli di tollerizzazione delle cellule beta.

Precedenti tentativi di indurre la regolazione immunitaria nelle malattie autoimmuni somministrando ionoterapie, come ad esempio GAD e antigeni dell'insulina; composti antinfiammatori, come ad esempio anticorpi contro CD3, CD20; timoglobulina, abatacept, alefacept o TNFalfa inibitori, come etanercept, hanno mostrato una certa efficacia, ma la durata di questi effetti o la loro efficacia dopo la presentazione della malattia sono limitazioni per portare questi approcci nella clinica. La presente invenzione divulga una nuova strategia per il trattamento e la prevenzione delle malattie autoimmuni nelle DC rinforzate con vitamina D che agiscono sinergicamente con autoantigene e anti-infiammatori al fine di fornire vari gradi di effetto.

La presente invenzione fornisce quindi mezzi (ad esempio metodi, composizioni e combinazioni) per la prevenzione e/o il trattamento di diabete di tipo 1, di diabete autoimmuni e di diabete autoimmuni latenti.

La presente invenzione utilizza la conoscenza relativa al fatto che la Vitamina D (Vit D) rinforza le cellule dendritiche (DC) immature, che finora non hanno dimostrato di essere sufficienti per alterare il decorso di qualsiasi malattia autoimmune, nell'essere più tollerogeniche, e combina la somministrazione di Vit D con la somministrazione di un self-antigene, associato a detta malattia autoimmune, in modo tempestivo, rafforzando così l'immunomodulazione tollerogenica dell'auto-antigene somministrato.

Per migliorare ulteriormente l'ambiente tollerogenico in cui le DC presentano auto-antigeni al sistema immunitario in un soggetto con un'adeguata concentrazione sierica di vitamina D, la presente invenzione divulga la scoperta che un regime di combinazione che utilizza un comune composto anti-infiammatorio insieme a un autoantigene è adatto per il trattamento e la prevenzione del T1D.

Oltre ai suoi potenziali effetti sinergici, un altro vantaggio della co-somministrazione dei composti della presente invenzione riguarda il problema che i disturbi autoimmuni spesso includono risposte autoimmuni contro più auto-antigeni. Può essere difficile tentare di anergizzare o eliminare tutti i linfociti autoaggressivi utilizzando la tollerizzazione diretta antigene-specifica con tutti i loro antigeni cognati,

perché potrebbero non essere noti tutti gli antigeni cognati. Ad esempio, si pensa che i diabeti di tipo 1 (T1D) siano causati da linfociti autoaggressivi che entrano nelle isole di Langerhans, dove distruggono le cellule .beta. L'attivazione di tali cellule è probabilmente multifattoriale, coinvolgendo una predisposizione genetica, fattori scatenanti ambientali come i virus e forse danni al pancreas (cellule delle isole), ad esempio causati da una reazione pro-infiammatoria locale.

Poiché il processo autoaggressivo è di solito abbastanza avanzato quando gli individui umani pre-diabetici vengono identificati mediante screening per gli anticorpi delle cellule delle isole, si può presumere che durante questa fase della malattia saranno in corso risposte aggressive a più di un antigene-isola. Inoltre, la soppressione immunitaria sistemica non specifica cronica non è considerata un'opzione, poiché il diabete colpisce frequentemente individui giovani e la soppressione immunitaria per tutta la vita è associata a effetti collaterali che sono inaccettabili rispetto alla sola terapia insulinica. Pertanto, è molto desiderabile un intervento curativo a base immunitaria con specificità e bassi effetti collaterali sistemici. I presenti metodi aggirano il problema di bersagli multipli auto-antigenici, poiché la co-somministrazione dei composti della presente invenzione può essere sufficiente per ristabilire la tolleranza a più autoantigeni che sono bersagli in un disturbo autoimmune.

I presenti metodi aggirano anche i problemi della soppressione immunitaria sistemica non specifica cronica, poiché la co-somministrazione dei composti della presente invenzione può ristabilire la tolleranza a lungo termine senza la necessità di un dosaggio continuo per tutta la vita.

Senza essere vincolati alla teoria, l'invenzione prevede che la co-somministrazione dei composti dell'invenzione abbia il potenziale per stabilire sinergicamente una tolleranza a lungo termine in parte inducendo l'attivazione/espansione di cellule T regolatorie (e anche di cellule presentanti l'antigene regolatorie (le APC)).

Sono stati descritti diversi fenotipi di cellule T regolatorie. Possono insorgere dopo la timectomia e possono essere indotti dopo la modulazione immunitaria sistemica. Le loro funzioni effettrici non sono completamente note. Sembrano essere parte dell'equilibrio intrinseco del sistema immunitario e la loro perdita provoca una grave deregolazione immunitaria e autoimmunità. Sono stati descritti regolatori simili a Th2 con specificità di antigene definita. Si pensa che agiscano come soppressori di bystander e che insorgono dopo l'immunizzazione antigene-specifica. Homann et al., J. Immunol. (1999) 163: 1833-8. A seconda della loro funzione effettrice sono stati definiti Th3 (produttori di TGF-.beta). Queste cellule sono linfociti antigene specifici con funzioni effettrici specializzate e non si comportano come le cellule Th2. Applicare il cosiddetto paradigma Th1/Th2 a queste cellule può quindi essere fuorviante.

La soppressione di bystander riguarda il fenomeno della diffusione antigenica. Si ritiene che la diffusione antigenica sia una componente essenziale durante la progressione dei processi autoimmuni locali. Si può quindi supporre che quando i pazienti hanno diversi autoanticorpi, la risposta

autoaggressiva può coinvolgere molti self-antigeni (o "autoantigeni"). Poiché la maggior parte degli autoantigeni potrebbe non essere identificata per un particolare disturbo autoimmune, non è possibile tollerizzare ogni specificità autoaggressiva con un regime terapeutico che comporta la conoscenza del rispettivo elemento di restrizione MHC e del peptide. L'induzione di cellule regolatorie con i presenti metodi ha numerosi vantaggi in questa situazione. È noto, ad esempio, che le cellule T regolatorie nel T1D possono agire localmente nei linfonodi e nelle isole come soppressori di bystander, il che significa che possono sopprimere i linfociti aggressivi con altre specificità auto-antigeniche. Questo può avvenire modulando le cellule presentanti l'antigene (le APC), ad esempio, mediante la secrezione di citochine con funzione modulante immunitaria. Pertanto, tali cellule regolatorie T del soppressore di bystander possono smorzare l'autoaggressione a molti altri autoantigeni senza conoscerne la precisa specificità.

La presenza di un primo autoanticorpo contro un 1° antigene o self-antigene abbondante, come ad esempio l'insulina in un individuo geneticamente predisposto, mentre non possono essere rilevati autoanticorpi contro almeno un secondo self-antigene più sequestrato (meno abbondante), può offrire una finestra di opportunità per arrestare un potenziale processo di malattia emergente nelle sue tracce utilizzando solo mezzi antinfiammatori e/o inibitori della differenziazione dei linfociti. Infatti, poiché la risposta infiammatoria a tale 1° self-antigene debole può essere alimentata da relativamente poche cellule T (TC) CD8+ e CD4 autoreattive insulino-specifiche sfuggite dal timo provenienti dal processo di delezione clonale, l'infiammazione può svanire e detto 1° antigene può in alcune forme di realizzazione essere utilizzato come tollerogeno che induce tolleranza ad altri autoantigeni, forse più sequestrati o non comuni, per i quali sono disponibili per l'attivazione più cellule T CD8+ e CD4+ autoreattive naive sfuggite.

In situazioni dove l'autoimmunità è stata innescata da autoantigeni più potenti, come ad esempio la GAD65 nel caso dei diabete autoimmuni, e che è in grado di guidare il processo patologico, potrebbe non essere sufficiente utilizzare solo mezzi antinfiammatori e/o inibitori di differenziazione di linfociti, senza l'uso di detti potenti autoantigeni per l'induzione della tollerizzazione attiva. D'altra parte, solo l'uso di un solo potente autoantigene, ad esempio la GAD65 formulata in un adiuvante come l'idrossido di alluminio (nel presente documento "allume"), generalmente considerato un adiuvante di guida di Th2, può comportare l'attivazione non solo di componenti regolatori, ma anche di molecole e cellule pro-infiammatorie e/o citotossiche, non limitate a molecole appartenenti al sistema immunitario innato, macrofagi, cellule dendritiche, cellule B (BC), cellule T (TC) o altri fattori inclusi fattori ambientali che possono contribuire a contrastare la tollerizzazione. Inoltre, possono essere utilizzate altre formulazioni adiuvanti meno di guida di Th2, come la soluzione salina o l'albumina sierica umana. Pertanto, potrebbe non essere sufficiente utilizzare formulazioni di singoli autoantigeni come monoterapie e la presente invenzione divulga composizioni e metodi che utilizzano almeno due

autoantigeni per migliorare l'effetto di tollerizzazione specifica degli autoantigeni somministrati formulati in allume, soluzione salina o albumina sierica umana.

La presente invenzione fornisce in un aspetto almeno una composizione farmaceutica comprendente almeno un antigene. L'almeno una composizione farmaceutica secondo l'invenzione può pertanto in alcune forme di realizzazione comprendere almeno due antigeni. Secondo certe altre forme di realizzazione, l'almeno una composizione comprende almeno tre autoantigeni. Secondo certe altre forme di realizzazione, l'almeno una composizione comprende almeno quattro autoantigeni. Secondo certe altre forme di realizzazione, gli antigeni possono essere formulati in composizioni separate. Il più preferito è che tutti gli antigeni secondo l'invenzione siano formulati nella stessa composizione. In alcune forme di realizzazione tutti gli antigeni sono autoantigeni, in alcune altre forme di realizzazione alcuni o tutti gli antigeni sono antigeni (tollerogeni) a cui il sistema immunitario ha sviluppato una risposta regolatoria e quindi in grado di influenzare la reazione ad altri autoantigeni in modo tollerante. Uno scopo della presente invenzione è quello di divulgare composizioni, regimi e metodi che consentano l'induzione della tolleranza alle auto-strutture che vengono attaccate nelle malattie autoimmuni. In una forma di realizzazione specifica almeno due antigeni sono associati a una particella carrier, esponendo così una cellula immunitaria del sistema immunitario adattativo ad almeno due antigeni con varia influenza su detta cellula immunitaria risultante in una risposta modificata all'auto struttura soggetta all'attacco autoimmune.

Assorbendo, legando o racchiudendo una proteina o un antigene peptidico a una particella carrier verso cui il sistema immunitario reagisce e inserendo le particelle nel tessuto umano, ad esempio mediante iniezione sottocutanea, la proteina o il peptide possono essere bersagliati per ingestione da parte del sistema immunitario. Probabilmente questa ingestione viene eseguita da cellule dendritiche o da macrofagi (cellule presentanti l'antigene, le APC). Alcune delle proteine o dei peptidi ingeriti in questo processo saranno presentati al sistema immunitario adattativo dalle proteine HLA (MHC) e seguirà una reazione immunitaria adattativa. La risposta adattativa sarà influenzata dai livelli di attività del sistema immunitario innato e dalle risposte immunitarie esistenti nei confronti di qualsiasi antigene presentato dalle proteine HLA nel processo. Queste proteine influenzanti possono essere i peptidi o le proteine legati alle particelle, oppure proteine native, autoantigeni o tollerogeni (antigeni a cui il sistema immunitario reagisce in modo tollerogenico) che vengono ingeriti e presentati nello stesso processo. Se queste proteine vengono ingerite dalla stessa cellula immunitaria, verranno presentate insieme dalle proteine HLA sulla superficie cellulare.

La presentazione di peptidi non nativi al sistema immunitario può essere influenzata dai segnali del sistema immunitario innato in risposta all'interruzione del tessuto, di tipo Th2. Gli antigeni endogeni, inclusi gli autoanticorpi, i nucleotidi di RNA ecc. possono fare lo stesso. Una proteina nativa, o una proteina verso cui esiste già una risposta, farà scattare la segnalazione da parte delle cellule

immunitarie adattative, che influenzeranno la risposta immunitaria totale e potrebbero attivare segnali tollerogenici o una preesistente reazione Th1. Se la segnalazione indotta da una procedura di iniezione e dall'interazione di cellule immunitarie naive e cellule immunitarie che presentano l'antigene, è più forte della risposta preesistente, si formerà una nuova risposta immunitaria che include la memoria.

Se una combinazione di proteine che poggiano sugli stessi carrier di particelle viene iniettata e ingerita e presentata dalla stessa APC, gli effetti saranno additivi espandendo il numero di possibili cellule immunitarie adattative con cui interagire, portando ad una maggiore possibilità di formare una nuova risposta immunitaria nonostante una possibile reazione preesistente a una delle proteine.

Se un autoantigene proteico viene iniettato insieme a un'altra proteina (nativa o estranea) sullo stesso carrier di particelle verso cui esiste già una risposta immunitaria, la risposta immunitaria all'antigene sarà ampiamente influenzata dalla risposta che il sistema immunitario ha già stabilito per gli antigeni di accompagnamento. Se gli antigeni di accompagnamento sono proteine native verso cui esistono cellule T regolatorie centrali (come ad esempio la IL10, l'insulina, l'albumina sierica umana, l'emoglobina), la risposta sarà indirizzata verso la tolleranza. Se queste proteine sono antigeni con cui la persona è già stata immunizzata, come spesso accade con il tossoide tetanico o difterico, la risposta immunitaria sarà influenzata da queste reazioni esistenti (che sono per lo più reazioni infiammatorie). Nel presente documento viene divulgato il trattamento di autoimmunità e/o la determinazione o l'induzione di tolleranza mediante la co-somministrazione dei composti dell'invenzione. Oltre alle malattie autoimmuni, può essere stabilita la tolleranza agli allergeni, dove i peptidi o le proteine allergenici vengono co-somministrati con i composti dell'invenzione dove gli antigeni anziché essere auto-antigeni sono allergeni (antigeni) specifici per le malattie allergiche. Resta inteso che i dettagli forniti nel presente documento rispetto a un aspetto, in particolare i dettagli sugli autoantigeni, sugli antigeni influenzanti, sul composto che induce la IL-10 e sul composto che riduce la capacità del sistema immunitario di attivare le TC e le BC naive e di richiamare le risposte dai linfociti attivati e della memoria, i tempi e le modalità di somministrazione, si applicano *mutatis mutandis* a tutti gli altri aspetti dell'invenzione.

#### **GAD per uso in metodi terapeutici**

Secondo la presente invenzione, la GAD viene somministrata mediante iniezione direttamente in un linfonodo.

In una forma di realizzazione, la presente invenzione riguarda GAD per l'uso in un metodo per la prevenzione e/o il trattamento dei diabete di tipo 1, dei diabete autoimmuni e dei diabete autoimmuni latenti, comprendente somministrare una composizione, detta composizione comprendendo almeno la GAD, ad un soggetto avente un livello sierico di vitamina D superiore a 50 nanomoli/litro. Ciascuna delle almeno due molecole può quindi influenzare la reazione della cellula immunitaria adattativa a cui

sono presentati gli antigeni.

Il soggetto può avere un livello sierico di vitamina D tra 50-150 nanomoli/litro, come di 60-100 nanomoli/litro, 75-100 nanomoli/litro o 100-150 nanomoli/litro.

Il metodo può comprendere un pretrattamento del soggetto per regolare il livello sierico di vitamina D e tale pretrattamento può comprendere la somministrazione della vitamina D e/o di analoghi della vitamina D e/o l'esposizione a radiazione UVB, preferibilmente per da 7 a 90 giorni prima della somministrazione della composizione comprendente almeno un autoantigene di cellule beta a detto soggetto.

Il metodo può inoltre comprendere la somministrazione della vitamina D e/o di analoghi della vitamina D in una quantità di 7000-70000 UI/settimana per 3-48 mesi.

Il metodo può inoltre comprendere la somministrazione di un inibitore di cicloossigenasi, come discusso di seguito sotto il titolo "Inibitori della cicloossigenasi".

Il metodo può inoltre comprendere la somministrazione di un composto CTLA4, come discusso di seguito alla voce "Composti CTLA4".

Il metodo può inoltre comprendere la somministrazione di un inibitore di TNFalfa, come discusso di seguito sotto il titolo "Inibitori di TNFalfa".

La presente divulgazione riguarda la prevenzione e/o il trattamento dei diabeti di tipo 1, dei diabeti autoimmuni e dei diabeti autoimmuni latenti in un individuo che ne necessita, comprendente somministrare a detto individuo:

- a) per scopi specifici di tollerizzazione all'antigene, almeno la GAD. In una forma di realizzazione, la GAD viene somministrata quando i livelli sierici di vitamina D sono tra 50 e 150 nMl, più preferibilmente tra 75 e 100 nMl e il più preferibilmente tra 100 -150 nMl; e
- b) per interferire con la capacità delle APC di maturare, somministrare a detto individuo almeno un composto induttore di IL-10 selezionato dal gruppo costituito da vitamina D, analoghi della vitamina D, acido gamma-ammino butirrico, analoghi dell'acido gamma-ammino butirrico e inibitori della tirosina chinasi; come elencato sopra. In una forma di realizzazione l'induzione di IL-10 è potenziata o realizzata mediante l'uso di esposizione alla luce UVB; e
- c) per interferire con la capacità del sistema immunitario di attivare le TC e le BC naive e di richiamare le risposte dei linfociti attivati e della memoria, somministrare un composto come un composto FANS; un composto CTLA-4; o un inibitore di TNFalfa; come elencato sopra.

In questo documento viene divulgato un metodo per il trattamento dei diabeti di tipo 1, dei diabeti autoimmuni e dei diabeti autoimmune latenti, comprendente somministrare a un soggetto con detta malattia:

- a) un ciclo di vitamina D per rinforzare la capacità delle cellule dendritiche presentanti l'antigene di presentare i peptidi antigenici al sistema immunitario in modo tollerizzante;

b) una GAD, come la GAD65, formulata in un carrier farmaceutico somministrato in quantità sufficiente a ripristinare o indurre la tolleranza alla GAD; e opzionalmente

c) una dose terapeutica di un composto anti-infiammatorio, ad esempio un inibitore di cicloossigenasi come l'ibuprofene, o un più pronunciato inibitore di cox-2 o di cox-1.

Il ciclo di vitamina D inizia preferibilmente da 15 a 90 giorni prima della somministrazione dell'autoantigene, o da 7 a 90 giorni prima della somministrazione dell'autoantigene, e viene somministrata in forma liquida o in forma di compresse a dosi corrispondenti da 7000 a 70000 UI alla settimana per un periodo da 3 a 48 mesi.

Il pretrattamento con vitamina D mira ad elevare i livelli sierici di vitamina D del soggetto trattato a più di circa 50 nanomoli/litro, o a più di 60, 75 o 100 nanomoli/litro. Il pretrattamento può essere evitato se il soggetto ha già livelli sierici di vitamina D a questi livelli.

In un'altra forma di realizzazione dell'invenzione, la concentrazione sierica di Vit D può essere migliorata mediante la fototerapia. In questo caso i soggetti saranno esposti alla radiazione ultravioletta B preferibilmente tra 10-120 minuti al giorno per da 15 a 90 giorni prima della somministrazione dell'autoantigene. La fototerapia dovrebbe continuare per un periodo da 3 a 48 mesi.

Le dosi preferite di GAD sono tra due e quattro somministrazioni, a distanza di almeno due settimane, più preferibilmente a distanza di un mese, ciascuna di tra 10 e 200 µg di antigene se somministrate mediante iniezione. Se somministrate per via orale, le dosi preferite sono tra 500 mg e 5 g al giorno per un periodo tra tre e 48 mesi. L'ibuprofene viene preferibilmente somministrato in dosi giornaliere da 100 a 800 mg per un periodo da 60 a 150 giorni durante il quale ha luogo la somministrazione dell'autoantigene.

La GAD deve essere somministrata mediante iniezione direttamente in un linfonodo. Il composto anti-infiammatorio e la GAD possono essere somministrati in/con un carrier, un eccipiente o un diluente farmaceuticamente accettabili.

In una forma di realizzazione della composizione contenente la GAD viene somministrata a distanza di 1-4 settimane, ad esempio a distanza di 2-4 settimane o a distanza di 2 settimane, in un periodo di trattamento iniziale da 3 a 4 mesi e, opzionalmente, a distanza di 2-3 mesi di distanza in un periodo di trattamento continuato di 6-9 mesi.

In una forma di realizzazione, la quantità di GAD viene aumentata da 1-5 µg per somministrazione all'inizio del periodo di trattamento a circa 40-100 µg per somministrazione nelle somministrazioni finali.

Un regime di dosaggio preferito include dosi crescenti di autoantigene di 1 µg, 5 µg, 20 µg, 50 µg, due iniezioni di ciascuna dose a distanza di 4 settimane, che sarebbero 28 settimane di trattamento con GAD-allume. Un programma di dosaggio alternativamente preferito include dosi crescenti come di

4ug, 8ug, 16ug, 20ug, 40ug nei giorni 0, 15, 30, 45, 60 e successivamente di 40 ug nei giorni 120, 180, 270.

Secondo l'invenzione, la somministrazione di autoantigene viene effettuata direttamente nei linfonodi per consentire alle APC residenti di presentare i peptidi antigenici al sistema immunitario. La dose sarà preferibilmente tra 1 e 15 µg per autoantigene, più preferito tra 2 e 10 µg per autoantigene o tra 2 e 5 µg per autoantigene. È preferita la formulazione in allume.

Secondo certe forme di realizzazione, in cui l' almeno un antigene viene somministrato per via intralinfonodale, un dosaggio preferito è tra 1-15ug, più preferito tra 2-10 e il più preferito tra 2-5ug per iniezione e autoantigene utilizzato, tali somministrazioni avvenendo almeno 2 volte, più preferito almeno 3 volte e il più preferito almeno 4 volte, a distanza di almeno 14 giorni, più preferibilmente a distanza di almeno 30 giorni.

Secondo certe forme di realizzazione, la GAD viene formulata separatamente o insieme ad altri antigeni, che a seconda dei casi possono essere, in allume, in soluzione salina o in albumina sierica umana.

Secondo certe forme di realizzazione, l' almeno una composizione farmaceutica comprende almeno due antigeni, in cui un antigene è la GAD, sulla stessa particella carrier. Secondo certe altre forme di realizzazione, l' almeno una composizione farmaceutica comprende almeno due antigeni, in cui un antigene è la GAD, su differenti particelle di carrier. Secondo certe forme di realizzazione, gli almeno due antigeni, in cui un antigene è la GAD, vengono somministrati separatamente e in tempi e frequenze, regimi e formulazioni differenti che siano adatti per gli antigeni specifici. Più preferibilmente gli almeno due antigeni, in cui un antigene è la GAD, sono formulati nella stessa composizione farmaceutica e quindi somministrati contemporaneamente.

In alcune forme di realizzazione la GAD viene formulata in un adiuvante, come ad esempio l'allume. In forme di realizzazione più particolari la GAD viene formulata in soluzione salina o in albumina sierica umana.

Secondo certe forme di realizzazione, la GAD e l' almeno un composto induttore di IL-10 vengono somministrati contemporaneamente. Secondo certe forme di realizzazione, la GAD e l' almeno un composto induttore IL-10 vengono somministrati separatamente.

Secondo certe forme di realizzazione, la somministrazione dell' almeno un composto induttore di IL-10 inizia tra 1-14 giorni prima della prima somministrazione di GAD. Secondo certe forme di realizzazione, la somministrazione dell' almeno un composto induttore IL-10 inizia almeno 2, preferibilmente almeno 10 settimane, prima della prima somministrazione di GAD.

Secondo certe forme di realizzazione che includono periodi di trattamento con vitamina D, vengono somministrati al giorno tra 500 e 10000 UI, più preferibilmente tra 1000 e 3000 UI di vitamina D, come di vitamina D3.

Secondo certe forme di realizzazione che includono periodi di pretrattamento con vitamina D, vengono somministrati a settimana tra 7000-100000 UI di vitamina D, come di vitamina D3, prima della prima somministrazione dell' almeno un antigene e come dose di mantenimento 500-2000 IU al giorno nel seguito.

In alcune forme di realizzazione, il periodo di trattamento con vitamina D è tra 60 e 420 giorni dopo la prima somministrazione di GAD.

Il composto che riduce la capacità del sistema immunitario di attivare le TC e le BC naive e di richiamare le risposte dei linfociti attivati e della memoria, come un inibitore di cicloossigenasi; un composto CTLA-4; oppure un inibitore di TNF $\alpha$  può essere somministrato contemporaneamente o separatamente dalla GAD e/o dall' almeno un composto induttore di IL-10.

In alcune forme di realizzazione, il composto che riduce la capacità del sistema immunitario di attivare le TC e le BC naive e di richiamare le risposte dai linfociti attivati e dalla memoria è un inibitore di cicloossigenasi.

Secondo certe forme di realizzazione, il periodo di trattamento con l' inibitore di cicloossigenasi inizia almeno 2 settimane prima della prima somministrazione dell' almeno un antigene.

Secondo certe forme di realizzazione, quando l' inibitore di cicloossigenasi è l' ibuprofene, viene somministrata almeno una dose al giorno da 400 a 1000 mg durante il periodo di trattamento con il FANS.

Il periodo di trattamento con l' inibitore di cicloossigenasi è almeno tra 4 e 14 settimane, più preferito tra 4 e 8 settimane.

Nei presenti metodi, il composto anti-infiammatorio deve essere somministrato per via orale o mediante iniezione.

In alcune forme di realizzazione, il composto che riduce la capacità del sistema immunitario di attivare le TC e le BC naive e di richiamare le risposte dai linfociti attivati e dalla memoria è un inibitore di TNF $\alpha$ .

Bloccare il TNF $\alpha$  riduce lo stato di attivazione della risposta immunitaria e diminuisce l' attività delle DC e di altri immunociti. Inoltre, poiché il TNF $\alpha$  interrompe l' architettura FSC e GC nel tessuto linfoide e compromette le funzioni delle cellule B, l' attivazione delle cellule T effettrici antigene-specifiche e la produzione di autoanticorpi viene ridotta. Recenti dati preclinici sul diabete mostrano che l' antigene delle cellule beta rilasciato dalle DC quiescenti può indurre la non risposta delle cellule T periferiche, sotto-modulare la distruzione delle cellule beta in corso e arrestare la distruzione delle cellule beta. Pertanto, nell' ambito di una terapia combinata di autoantigene - inibitore del TNF $\alpha$ , i livelli di autoanticorpi e i numeri e l' attività delle cellule T effettrici saranno relativamente ridotti, mentre il numero e la funzione di Treg specifiche per l' autoantigene saranno almeno mantenuti. Ci vogliono mesi per modificare questi processi immunologici e documentare questi effetti, ma durante

questo periodo, a causa dei suoi effetti acuti protettivi sulle cellule beta e metabolici, l'inibizione di TNFalfa conserverà anche direttamente le cellule beta. Poiché la GAD65 è nota per essere uno degli autoantigeni primari nel T1DM, questo approccio produce una deviazione della risposta autoimmune dei diabeti verso un fenotipo regolatorio di massa critica sufficiente a portare a un effetto significativo e prolungato sulla conservazione delle cellule beta.

Pertanto, in un aspetto della presente invenzione, un inibitore di TNF-alfa selezionato dal gruppo costituito da infliximab, adalimumab, certolizumab, golimumab ed etanercept, viene utilizzato come composto anti-infiammatorio. Una dose preferita quando si usa l'etanercept è tra 0.2 e 1 mg/kg mediante sc, una o due volte alla settimana per un periodo da 2 a 9 mesi.

Secondo certe forme di realizzazione, quando l'inibitore di TNF $\alpha$  è Etanercept, è preferito il dosaggio approvato dalla FDA di 5 mg/kg alle settimane 0, 2 e 6. In un'altra forma di realizzazione la dose è la stessa utilizzata nello studio in Fase I di monoterapia con inibitori di TNF $\alpha$  (0.4 mg/kg (max 25 mg) sc due volte a settimana  $\times$  26 settimane). In modo il più preferito in un'altra forma di realizzazione vengono utilizzate solo due dosi, max 25 mg/dose nel regime di trattamento di combinazione che comprende la vitamina D e autoantigeni.

Secondo certe forme di realizzazione, l'inibitore di TNF $\alpha$  viene somministrato prima della prima somministrazione dell'almeno un antigene.

In alcune forme di realizzazione, il composto che riduce la capacità del sistema immunitario di attivare le TC e le BC naive e di richiamare le risposte dai linfociti attivati e dalla memoria è un composto CTLA-4, selezionato dal gruppo costituito da abatacept. Secondo forme di realizzazione particolari, vengono somministrate dosi di almeno 2-20 mg/kg di abatacept per occasione di trattamento, a partire da +/- 7 giorni intorno al momento della prima somministrazione dell'almeno un antigene.

Secondo certe forme di realizzazione, l'abatacept viene somministrato contemporaneamente alla prima somministrazione di GAD.

Secondo certe forme di realizzazione, la somministrazione di GAD e del composto che riduce la capacità del sistema immunitario di attivare le TC e le BC naive e di richiamare le risposte dai linfociti attivati e dalla memoria, viene ripetuta nei giorni 14, 28 e 45 +/- una settimana a seconda dei casi per assicurare il blocco del CD28 sulle TC, e dove il primo giorno segna la prima somministrazione dell'almeno un composto induttore di IL-10.

Secondo certe forme di realizzazione, l'individuo da trattare secondo la presente invenzione è un mammifero. Secondo forme di realizzazione particolari, l'individuo da trattare secondo la presente invenzione è un essere umano. Secondo certe forme di realizzazione, l'individuo da trattare secondo la presente invenzione è un infante. Secondo forme di realizzazione particolari, l'individuo da trattare secondo la presente invenzione è un essere umano adolescente. Secondo forme di realizzazione particolari, l'individuo da trattare secondo la presente invenzione è un essere umano adulto.

In alcune forme di realizzazione il soggetto umano trattato ha più di 4 anni di età.

In altre forme di realizzazione, il soggetto umano trattato è ha 8 anni o più.

In altre forme di realizzazione, il soggetto umano trattato ha 10 anni o più.

In alcune forme di realizzazione, il soggetto trattato nell'uomo ha 18 anni o meno.

In alcune forme di realizzazione, il soggetto umano trattato ha 4-10 o 4-18 o 8-18 o 10-18 anni di età.

In altre forme di realizzazione, il soggetto umano trattato ha 18 anni o più.

In alcune forme di realizzazione, il soggetto umano trattato ha 18-30 anni di età.

### **Composizioni**

In alcune forme di realizzazione, la presente invenzione utilizza anche una composizione comprendente una pluralità di particelle, ciascuna avente immobilizzato sulla sua superficie almeno un primo e almeno un secondo antigene, in cui il primo antigene è GAD e il secondo antigene è un tollerogeno o un autoantigene di cellule beta, la composizione comprendendo inoltre opzionalmente adiuvanti, eccipienti, solventi e/o tamponi farmaceuticamente accettabili.

Secondo certe forme di realizzazione, la GAD viene formulata in un adiuvante. Secondo forme di realizzazione particolari, l'adiuvante è allume. In altre forme di realizzazione particolari l'almeno un antigene viene formulato in soluzione salina o in albumina sierica umana. In forme di realizzazione più particolari, l'autoantigene può essere somministrato come plasmidi o codificato da un vettore virale come i vettori di virus adeno-associati o i vettori di virus dell'herpes simplex.

Le composizioni secondo l'invenzione possono comprendere più di un autoantigene. Pertanto, secondo certe forme di realizzazione, la composizione comprende almeno due autoantigeni, uno dei quali è la GAD. Secondo certe altre forme di realizzazione, la composizione comprende almeno tre autoantigeni. Secondo certe altre forme di realizzazione, la composizione comprende almeno quattro autoantigeni.

Pertanto, secondo forme di realizzazione particolari, la composizione comprende almeno una GAD, come la GAD-65, e insulina.

Secondo altre forme di realizzazione particolari, la composizione comprende almeno una GAD, come la GAD-65, e insulina a catena B.

Secondo altre forme di realizzazione particolari, la composizione comprende almeno una GAD, come la GAD-65, e proinsulina. Secondo forme di realizzazione particolari, la composizione comprende almeno una GAD, come la GAD-65, insulina e insulina a catena B. Secondo un'altra forma di realizzazione particolare, la composizione comprende almeno una GAD, come la GAD-65, insulina e proinsulina. Secondo ancora altre forme di realizzazione particolari, la composizione comprende almeno una GAD, come la GAD-65, insulina a catena B e proinsulina.

Secondo altre forme di realizzazione particolari, la composizione comprende una GAD, come la GAD-65, insulina, insulina a catena B e insulina a catena B.

Gli autoantigeni possono essere formulati in adiuvanti come alluminio idrossiacido, MAS-1, albumina sierica umana, emulsioni lipidiche.

Secondo forme di realizzazione particolari, l'adiuvante è allume.

Viene divulgata una composizione come comprendente

i) GAD, e almeno uno di

ii) un composto induttore di IL-10 selezionato dal gruppo costituito da vitamina D, analoghi della vitamina D, inibitori della tirosina chinasi, acido gamma-ammino butirrico e analoghi dell'acido gamma-ammino butirrico; e

ii) un composto che riduce la capacità delle cellule dendritiche di attivare le cellule T CD4+ naive, come un inibitore di cicloossigenasi, un composto CTLA-4 o un inibitore del TNFalfa; e opzionalmente adiuvanti, eccipienti, solventi e/o tamponi farmaceuticamente accettabili.

La presente divulgazione fornisce anche una composizione (ad esempio una composizione farmaceutica) comprendente i) almeno una GAD e ii) almeno un composto induttore di IL-10.

La composizione divulgata può comprendere più di un composto induttore di IL-10 come almeno due, tre o quattro composti induttori di IL-10.

La composizione può comprendere almeno la vitamina D e un inibitore della tirosina chinasi.

La composizione può comprendere almeno vitamina D e dasatinib. La composizione può comprendere almeno vitamina D e bosutinib. La composizione può comprendere almeno vitamina D e saracatinib. La composizione può comprendere almeno vitamina D e imatinib. La composizione può comprendere almeno vitamina D e sunitinib.

La composizione può inoltre comprendere iii) un composto che riduce la capacità delle cellule dendritiche di attivare le cellule CD4+ naive, come un inibitore di cicloossigenasi, un composto CTLA-4 o un inibitore del TNFalfa.

Tale composto può essere un inibitore di cicloossigenasi, come un farmaco anti-infiammatorio non steroideo (FANS). Secondo forme di realizzazione più particolari, il FANS è selezionato dal gruppo costituito da Ibuprofene, Dexibuprofene, Naproxene, Fenoprofene, Ketoprofene, Dexketoprofene, Flurbiprofene, Oxaprozin, Loxoprofene, Indometacina, Tolmetina, Sulindac, Etodolac, Ketorolac, Diclofenac, Aceclofenac, Nabumetone, Aspirina (acido acetilsalicilico), Diflunisal (Dolobid), Acido salicilico, Salsalato (Disalcid), Piroxicam, Meloxicam, Tenoxicam, Droxicam, Lornoxicam, Isoxicam, Acido mefenamico, Acido meclofenamico, acido Flufenamico, acido Tolfenamico, Celecoxib, Rofecoxib, Valdecoxib, Parecoxib, Lumiracoxib, Etoricoxib e Nimesulide.

In una forma di realizzazione della presente invenzione, l'almeno una composizione comprendente l'antigene proteina/peptide GAD, o una combinazione di antigeni proteina/peptide, sarà formulata mescolando insieme le singole soluzioni di proteina/peptide prodotte da GMP in un tampone di formulazione. La soluzione proteica combinata verrà quindi filtrata sterile in un recipiente di

formulazione chiuso con miscelazione costante, dopo di che una soluzione sterile di adiuvante sarà aggiunta al recipiente di formulazione. Le particelle contenenti proteine verranno quindi aggiunte in modo asettico a fiale per iniezione di vetro sterili e deprogenate o a siringhe preriempite e sigillate. Gli articoli adsorbiti con proteine possono essere prelevati asepticamente da ciascuna fiala per l'iniezione nel tessuto del paziente o del soggetto.

Le proporzioni di proteine combinate nella formulazione possono variare sebbene la più preferita sia proporzioni uguali in grammi di peso. Se utilizzato, la percentuale di antigene influenzante dovrebbe essere almeno uguale alla massa combinata delle altre proteine o peptidi di antigene. La percentuale di antigene influenzante può essere maggiore della massa combinata degli altri antigeni. Il tampone di formulazione può essere un tampone di mannitolo tamponato con fosfato isotonic. L'adiuvante può essere idrossido di alluminio (allume), un liposoma, microparticelle di poli (lattide-co-glicolide) o soluzione salina.

I medicinali, le composizioni farmaceutiche o le combinazioni terapeutiche divulgate nel presente documento possono essere in qualsiasi forma adatta per l'applicazione su esseri umani e/o animali, preferibilmente esseri umani, compresi gli infanti, i bambini e gli adulti e possono essere prodotti mediante procedure standard note agli esperti del settore. Il medicamento, la composizione (farmaceutica) o la combinazione terapeutica possono essere prodotti mediante procedure standard note agli esperti del settore, ad esempio dal sommario di "Pharmaceutics: The Science of Dosage Forms", Second Edition, Aulton, M.E. (Ed. Churchill Livingstone, Edimburgh (2002); "Encyclopedia of Pharmaceutical Technology", Second Edition, Swarbrick, J. e Boylan 15 J.C. (Eds.), Marcel Dekker, Inc. New York (2002); "Modern Pharmaceutics", Fourth Edition, Banker G.S. e Rhodes C.T. (Eds.) Marcel Dekker, Inc. New York 2002 e "The Theory and Practice of Industrial Pharmacy", Lachman L., Lieberman H. e Kanig J. (Eds.), Lea & Febiger, Philadelphia (1986).

I termini "medicamento", "composizione farmaceutica" e "formulazioni farmaceutiche" possono essere utilizzati in modo intercambiabile.

Il medicamento, la composizione farmaceutica o la combinazione terapeutica secondo la presente invenzione possono comprendere inoltre uno o più eccipienti farmaceuticamente accettabili. I carrier, i diluenti e gli eccipienti che sono adatti per la preparazione di un medicamento, di una composizione farmaceutica o di una combinazione terapeutica secondo la presente invenzione sono ben noti agli esperti del settore, ad esempio da "Handbook of Pharmaceutical Excipients" Sixth Edition, Raymond C. Rowe, Paul J. Sheskey e Marian E Quinn (Eds.), American Pharmaceutical Association (July 2009).

### **Autoantigeni**

Gli autoantigeni adatti per l'uso nei metodi, nelle composizioni e nel kit secondo la presente invenzione sono autoantigeni di cellule beta.

Questi includono: l'acido glutammico decarbossilasi (GAD65 o GAD 67 o GAD32) (Baekkeskov et al., Nature (1990) 347: 151)); l'Insulina (Palmer et al., Science (1983) 222: 1337); compreso il peptide B9-23 comprendente gli amminoacidi 9-23 della catena B dell'insulina (Daniel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995) 93: 956-960; Wong et al., Nat. Med. (1999) 5: 1026-1031) la Proinsulina; compreso il peptide B24-C36 comprendente gli amminoacidi 24-36 che coprono la giunzione del peptide C alla catena B della proinsulina (Chen et al., J. Immunol. (2001) 167: 4926-4935; Rudy et al., Mol. Med., (1995) 1: 625-633); l'HSP60 (proteina da shock termico 60, Raz et al., Lancet (2001), 358: 1749-53); l'ICA512/IA-2 (antigene 512 delle cellule delle isole; Rabin et al., J. Immunol. (1994) 152: 3183), l'insulinoma antigene-2, lo ZnT8, la proteina correlata alla subunità catalitica glucosio-6-fosfato isole-specifica (IGRP), la cromogranina A, l'insulina a catena B, la preproinsulina, la proinsulina II, un peptide di proinsulina senza un epitopo citotossico T-linfocitario, l'insulina peptide C13-A5, l'antigene p69 delle cellule delle isole, o un qualsiasi peptide derivato comprese le forme citrullinate iDS e i corrispondenti nucleotidi dei sopra menzionati.

Per un allineamento delle sequenze di insulina tra le specie, si veda la Tabella I in Homann et al., J. Immunol. (1999) 63: 1833-1838.

Secondo l'invenzione, l'autoantigene di cellule beta è GAD, come la GAD-65 o la GAD-67, compresi i suoi frammenti, i suoi derivati o un acido nucleico che codifica per essi.

Secondo forme di realizzazione più particolari, l'autoantigene di cellule beta è la GAD-65, un suo frammento, un suo derivato o un acido nucleico che codifica per esso. Secondo forme di realizzazione più particolari, l'autoantigene di cellule beta è la GAD-65. Secondo altre forme di realizzazione particolari, l'autoantigene di cellule beta è un frammento derivato dalla GAD-65 (cioè un frammento della GAD65).

In alcune forme di realizzazione, la GAD è utilizzata in un metodo comprendente somministrare a un soggetto una composizione comprendente una pluralità di particelle, ciascuna avente immobilizzata sulla sua superficie la GAD e almeno un secondo autoantigene.

Secondo altre forme di realizzazione particolari, il secondo autoantigene di cellula beta è l'insulinoma-antigene-2.

Secondo altre forme di realizzazione particolari, il secondo autoantigene di cellula beta è ZnT8.

Secondo altre forme di realizzazione particolari, il secondo autoantigene di cellula beta è la proteina correlata alla subunità catalitica glucosio-6-fosfato isole-specifica (IGRP).

Secondo altre forme di realizzazione particolari, il secondo autoantigene di cellula beta è la cromogranina A.

Secondo certe altre forme di realizzazione, il secondo autoantigene di cellula beta è l'insulina.

Secondo certe altre forme di realizzazione, il secondo autoantigene di cellula beta è l'insulina a catena B.

Secondo certe altre forme di realizzazione, il secondo autoantigene di cellula beta è la proinsulina.

Secondo certe altre forme di realizzazione, il secondo autoantigene di cellula beta è la preproinsulina.

In alcuni aspetti della presente invenzione, un tollerogeno viene somministrato al soggetto trattato in aggiunta alla GAD. Un tollerogeno è un antigene che induce uno stato di non risposta immunologica specifica a successive dosi di sfida dell'antigene. I tollerogeni adatti per l'uso nella presente invenzione sono proteine umane endogene native e altre molecole che sono abbondantemente disponibili ed esposte al sistema immunitario e generalmente riconosciute come auto. Esempi di tollerogeni includono la IL-10, l'albumina sierica umana o emoglobina o l'acido gamma-ammino butirrico.

Gli autoantigeni o i tollerogeni per l'uso nell'invenzione possono essere somministrati come proteine a lunghezza intera, oppure possono in alternativa essere somministrati come frammenti o varianti di tali proteine a lunghezza intera, a condizione che i frammenti o le varianti di autoantigeni abbiano almeno un epitopo conservato rispetto all'autoantigene originale e siano efficaci nei metodi secondo la presente invenzione.

Un frammento di un autoantigene proteico o di un tollerogeno ha la stessa sequenza di amminoacidi dell'autoantigene o del tollerogeno originale, ma manca almeno un residuo di amminoacido N-terminale o C-terminale. Un frammento di un autoantigene dovrebbe comprendere almeno un epitopo rilevante dell'autoantigene originale. I frammenti di autoantigene e tollerogeno hanno preferibilmente una lunghezza di almeno 8 amminoacidi, come di almeno 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 amminoacidi.

Una variante di un autoantigene proteico o di un tollerogeno può avere una sequenza di amminoacidi identica per meno del 100% rispetto all'autoantigene o al tollerogeno originale, come del 99%, del 95%, del 90%, dell'85%, dell'80%, del 70%, del 60% o del 50% identica (rispetto a uno strumento di allineamento della sequenza proteica, ad esempio Clustal Omega disponibile dall'European Bioinformatics Institute, Hinxton, GB), mentre, per gli autoantigeni, allo stesso tempo con almeno un epitopo rilevante conservato rispetto all'autoantigene originale. Le varianti possono anche avere sequenze di amminoacidi più corte (cioè essere un frammento) o più lunghe rispetto all'antigene o al tollerogeno originale.

Nell'invenzione, la somministrazione di un autoantigene o di un tollerogeno può comportare un autoantigene o un tollerogeno comprendente un frammento della proteina o del peptide della proteina originale. Può anche comportare la somministrazione di una variante dell'autoantigene o del tollerogeno.

Inoltre, la proteina o il peptide possono essere introdotti in un soggetto come proteina o peptide in un carrier farmaceuticamente accettabile, oppure la proteina o il peptide possono essere codificati da un vettore di espressione, dove viene introdotto il vettore di espressione (ad esempio, si vedano gli Esempi in cui il self-antigene viene espresso in un soggetto da un vettore di espressione di pCMV).

Un tale vettore di espressione può essere un acido nucleico, come DNA o RNA, e può essere somministrato mediante iniezione ad ago, pistole genetiche, iniezione di getto o con l'aiuto della citofectina, come noto nella tecnica. L'acido nucleico può essere formulato in soluzione salina, su perle d'oro, in liposomi o in formulazioni lipidiche. Per ulteriori descrizioni sulla somministrazione di autoantigeni tramite i loro vettori di espressione (e per antigeni specifici che possono essere somministrati) si veda la pubblicazione brevettuale statunitense US 2002/0107210.

#### **Composti induttori di IL-10**

In alcuni aspetti, i metodi, le composizioni e i kit della presente invenzione utilizzano composti induttori di IL-10.

L'almeno un composto induttore di IL-10 è la vitamina D, come la 1,25-diidrossivitamina D.

#### **Inibitori della cicloossigenasi**

In alcuni aspetti, i metodi, le composizioni e i kit della presente invenzione utilizzano uno o più inibitori della cicloossigenasi.

Questi inibitori della cicloossigenasi sono selezionati dal gruppo costituito da Ibuprofene, Dexibuprofene, Naproxene, Fenoprofene, Ketoprofene, Dexketoprofene, Flurbiprofene, Oxaprozin, Loxoprofene, Indometacina, Tolmetina, Sulindac, Etodolac, Ketorolac, Diclofenac, Aceclofenac, Nabumetone, Aspirina (acido acetilsalicilico), Diflunisal (Dolobid), Acido salicilico, Salsalato (Disalacid), Piroxicam, Meloxicam, Tenoxicam, Droxicam, Lornoxicam, Isoxicam, Acido mefenamico, Acido meclofenamico, acido Flufenamico, acido Tolfenamico, Celecoxib, Rofecoxib, Valdecoxib, Parecoxib, Lumiracoxib, Etoricoxib e Nimesulide.

Secondo certe forme di realizzazione, l'inibitore di cicloossigenasi è un derivato dell'acido propionico, come Ibuprofene, Dexibuprofene, Naproxene, Fenoprofene, Ketoprofene, Dexketoprofene, Flurbiprofene, Oxaprozin o Loxoprofene.

Secondo certe forme di realizzazione, l'inibitore di cicloossigenasi è un derivato dell'acido acetico, come Indometacina, Tolmetina, Sulindac, Etodolac, Ketorolac, Diclofenac, Aceclofenac o Nabumetone.

Secondo certe forme di realizzazione, l'inibitore di cicloossigenasi è un Salicilato, come Aspirina (acido acetilsalicilico), Diflunisal (Dolobid), Acido salicilico o Salsalato.

Secondo certe forme di realizzazione, l'inibitore di cicloossigenasi è un derivato dell'acido enolico (Oxicam), come Piroxicam, Meloxicam, Tenoxicam, Droxicam, Lornoxicam o Isoxicam.

Secondo certe forme di realizzazione, l'inibitore di cicloossigenasi è un derivato dell'acido antranilico, come Acido mefenamico, Acido meclofenamico, Acido flufenamico o Acido tolfenamico.

Secondo certe forme di realizzazione, l'inibitore di cicloossigenasi è un inibitore selettivo della COX-2, come Celecoxib, Rofecoxib, Valdecoxib, Parecoxib, Lumiracoxib o Etoricoxib.

Secondo forme di realizzazione più particolari, l'inibitore di cicloossigenasi è l'Ibuprofene.



Secondo forme di realizzazione più particolari, l'inibitore di cicloossigenasi è il Dexibuprofene.

Secondo forme di realizzazione più particolari, l'inibitore di cicloossigenasi è il Naproxene.

Secondo forme di realizzazione più particolari, l'inibitore di cicloossigenasi è il Fenoprofene.

Secondo forme di realizzazione più particolari, l'inibitore di cicloossigenasi è il Ketoprofene.

Secondo forme di realizzazione più particolari, l'inibitore di cicloossigenasi è il Dexketoprofene.

Secondo forme di realizzazione più particolari, l'inibitore di cicloossigenasi è il Flurbiprofene.

Secondo forme di realizzazione più particolari, l'inibitore di cicloossigenasi è l'Oxaprozin.

Secondo forme di realizzazione più particolari, l'inibitore di cicloossigenasi è il Loxoprofene.

Secondo forme di realizzazione più particolari, l'inibitore di cicloossigenasi è l'Indometacina.

L'ibuprofene blocca principalmente la cox-2 ma in una certa misura anche la cox-1. L'ibuprofene ha un effetto un po' più ampio sul sistema immunitario rispetto a uno stretto bloccante IL-1 e un effetto anti-infiammatorio abbastanza pronunciato senza gravi rischi. L'uso dell'ibuprofene attenua l'infiammazione delle cellule beta e consente alle DC rinforzate con vitamina D di indurre tolleranza ai peptidi dagli autoantigeni presentati alle cellule T, proteggendo così le cellule beta nel soggetto.

#### **Composti CTLA4**

In alcuni aspetti, i metodi, le composizioni e i kit della presente invenzione utilizzano un composto CTLA-4, come un'immunoglobulina antigene 4 citotossica associata a linfociti-T.

Ai fini della presente invenzione, il composto CTLA-4 è l'abatacept.

Abatacept (un'immunoglobulina CTLA4 modificata da Fc) è una proteina di fusione che impoverisce e immunomodula le cellule T, costituita dalla porzione extracellulare di CTLA4 umano e dalla catena pesante di IgG1 umana. Blocca il segnale costimolatorio coinvolto nell'attivazione delle cellule T naïve. La sua ligazione con CD80/86 sulle APC può anche interferire con e ridurre la IL-6 indotta da CD80/86, che può sotto-regolare le citochine infiammatorie come la IL-1beta, l'IFNgamma e la IL-17. Un'ulteriore ligazione di Abatacept con CD80/86 può indurre indoleammina diossigenasi (IDO) nelle APC, che a loro volta possono indurre anergia nelle cellule T, nonché sotto-regolare l'attivazione di paracrina nelle cellule T naïve da parte di cellule T attivate. Il CD80/86 espresso sulle cellule B può essere ancora un ulteriore percorso in cui l'abatacept può svolgere una funzione immunomodulante.

#### **Inibitori di TNFalfa**

In alcuni aspetti, i metodi, le composizioni e i kit della presente invenzione utilizzano un inibitore di TNF alfa, selezionato dal gruppo costituito da Adalimumab, Certolizumab, Etanercept, Golimumab o Infliximab. Secondo forme di realizzazione più particolari, l'inibitore di TNF alfa è l'Adalimumab. Secondo altre forme di realizzazione più particolari, l'inibitore di TNF alfa è il Certolizumab. Secondo altre forme di realizzazione più particolari, l'inibitore di TNF alfa è l'Etanercept. Secondo altre forme di realizzazione più particolari, l'inibitore di TNF alfa è il Golimumab. Secondo altre forme di realizzazione più particolari, l'inibitore di TNF alfa è l'Infliximab.

**Kit**

La presente divulgazione fornisce anche kit relativi all'invenzione. Ad esempio, in un aspetto, un kit può comprendere: (a) un composto anti-infiammatorio ; (b) un autoantigene; e (c) vitamina D e opzionalmente d) istruzioni per il regime dell'invenzione.

Viene divulgato un kit farmaceutico come comprendente

- i) una composizione comprendente un autoantigene di cellule beta e almeno uno di
- ii) una composizione comprendente un composto induttore di IL-10 selezionato dal gruppo costituito da vitamina D, analoghi della vitamina D, inibitori della tirosina chinasi, acido gamma-ammino butirrico e analoghi dell'acido gamma-ammino butirrico; e
- iii) una composizione comprendente un composto che riduce la capacità delle cellule dendritiche di attivare le cellule T CD4+ naive, come un inibitore di cicloossigenasi, un composto CTLA-4 o un inibitore di TNF alfa.

Viene divulgato un kit farmaceutico come comprendente

- i) una composizione comprendente un autoantigene di cellule beta e almeno uno di
- ii) una composizione comprendente un composto induttore di IL-10 selezionato dal gruppo costituito da vitamina D, analoghi della vitamina D, inibitori della tirosina chinasi, acido gamma-ammino butirrico e analoghi dell'acido gamma-ammino butirrico; e
- iii) una composizione comprendente un composto che riduce la capacità delle cellule dendritiche di attivare le cellule T CD4+ naive, come un inibitore di cicloossigenasi, un composto CTLA-4 o un inibitore di TNF alfa.

Inoltre viene divulgato l'uso di composizioni comprendenti almeno due di:

- i) almeno un antigene o suoi frammenti; o acidi nucleici che codificano per tali molecole correlate ad almeno una delle malattie autoimmuni e infiammatorie nel gruppo come elencato nel presente documento; e
- ii) almeno un composto induttore di IL-10 selezionato dal gruppo: vitamina D, come la 1,25-diidrossivitamina D. Secondo certe altre forme di realizzazione, l' almeno un composto induttore di IL-10 è un analogo della vitamina D, come come il TX527. Secondo certe altre forme di realizzazione, l' almeno un composto induttore di IL-10 è un inibitore della tirosina chinasi, come dasatinib, bosutinib, saracatinib, imatinib, sunitinib o loro combinazioni; e
- iii) almeno un composto che riduce la capacità del sistema immunitario di attivare le TC e le BC naive e di richiamare le risposte dei linfociti attivati e della memoria, come un inibitore della COX; un composto CTLA-4; o un inibitore di TNF alfa; come elencati nel presente documento);

nella realizzazione di un kit comprendente almeno due composizioni farmaceutiche (vale a dire medicinali).

Una delle almeno due composizioni farmaceutiche può comprendere l' almeno un antigene formulato

in allume, in soluzione salina o in albumina sierica umana come iniettabile in una fiala o in una siringa preriempita e un'altra delle almeno due composizioni farmaceutiche può comprendere il composto induttore di IL-10 sotto forma di compresse per somministrazione orale.

Viene anche divulgato un kit comprendente almeno due composizioni farmaceutiche, comprendente i) almeno un antigene selezionato dal gruppo elencato nel presente documento e ii) almeno un composto che riduce la capacità delle cellule dendritiche di attivare linfociti naive o di richiamare linfociti attivati o della memoria selezionato dal gruppo: inibitori della COX; Composti CTLA-4; e inibitori di TNF alfa. Ad esempio, una delle almeno due composizioni farmaceutiche può comprendere l' almeno un antigene formulato in allume, in soluzione salina o in albumina sierica umana come iniettabile in una fiala o in una siringa preriempita e un'altra delle almeno due composizioni farmaceutiche può comprendere un composto selezionato dal gruppo: inibitori della COX; un composto CTLA-4; e inibitori di TNF $\alpha$ .

Viene anche divulgato un kit comprendente almeno tre composizioni farmaceutiche, comprendente i) almeno un antigene selezionato dal gruppo elencato nel presente documento; ii) almeno un composto induttore di IL-10 selezionato dal gruppo costituito da vitamina D, analoghi della vitamina D e inibitori della tirosina chinasi. e iii) almeno un composto che riduce la capacità delle cellule dendritiche di attivare linfociti naive o di richiamare linfociti attivati o della memoria selezionato dal gruppo: inibitori della COX; composti CTLA-4; e inibitori di TNF alfa. Ad esempio, una delle almeno tre composizioni farmaceutiche può comprendere l' almeno un antigene formulato in allume, in soluzione salina o in albumina sierica umana come iniettabile in una fiala o in una siringa preriempita e un'altra delle almeno tre composizioni farmaceutiche può comprendere almeno un composto induttore di IL-10 selezionato dal gruppo costituito da vitamina D, analoghi della vitamina D, acido gamma-ammino butirrico, analoghi dell'acido gamma-ammino butirrico e inibitori della tirosina chinasi e una terza delle almeno tre composizioni farmaceutiche può comprendere un composto selezionato dal gruppo: inibitori della COX; un composto CTLA-4; e inibitori di TNF $\alpha$ .

#### **Uso medico**

La composizione della presente divulgazione comprendente GAD può essere utilizzata in terapia, nella prevenzione e/o nel trattamento dei diabeti di tipo 1, dei diabeti autoimmuni e dei diabeti autoimmuni latenti. Di conseguenza, la composizione della presente divulgazione può essere una composizione farmaceutica.

Secondo certe forme di realizzazione, la composizione è per l'uso come medicinale, come ad esempio nella prevenzione e/o nel trattamento dei diabeti di tipo 1, dei diabeti autoimmuni e dei diabeti autoimmuni latenti.

Secondo particolari forme di realizzazione, la composizione è per l'uso nella prevenzione e/o nel trattamento dei diabeti di tipo 1, come il tipo 1.



Secondo altre forme di realizzazione particolari, la composizione è per uso nella prevenzione e/o nel trattamento dei diabete autoimmuni.

Secondo altre forme di realizzazione particolari, la composizione è per l'uso nella prevenzione e/o nel trattamento dei diabete autoimmuni latenti.

Secondo ancora altre forme di realizzazione particolari, la composizione è per l'uso nella prevenzione e/o nel trattamento della recidiva dei diabete autoimmuni, come la recidiva dei diabete autoimmuni in un individuo (ad esempio un essere umano) con diabete autoimmune che è stato sottoposto a trapianto di cellule delle isole o ad altre terapie cellulari, compresa la terapia con cellule staminali.

La presente invenzione fornisce in un ulteriore aspetto un autoantigene in combinazione con almeno un composto induttore di IL-10 per l'uso nella prevenzione e/o nel trattamento di una malattia autoimmune.

Più in particolare, la presente invenzione fornisce GAD, in combinazione con almeno un composto induttore di IL-10, come almeno un composto induttore di IL-10 selezionato dal gruppo costituito dalla vitamina D, per l'uso nella prevenzione e/o trattamento dei diabete di tipo 1, dei diabete autoimmuni e dei diabete autoimmuni latenti.

Secondo forme di realizzazione più particolari, la GAD è la GAD-65, un suo frammento, un suo derivato o un suo nucleotide codificante. Secondo forme di realizzazione più particolari, l'autoantigene di cellule beta è la GAD-65. Secondo altre forme di realizzazione particolari, l'autoantigene di cellule beta è un frammento derivato dalla GAD-65 (cioè un frammento della GAD65).

Secondo certe forme di realizzazione, la GAD è formulato in un adiuvante.

Secondo forme di realizzazione particolari, l'adiuvante è allume.

Secondo certe forme di realizzazione, l'almeno un composto induttore di IL-10 è la vitamina D, come la 1,25-diidrossivitamina D.

Secondo certe forme di realizzazione, l'autoantigene viene ulteriormente utilizzato in combinazione con un composto che riduce la capacità delle cellule dendritiche di attivare le cellule T CD4+ naïve, come un inibitore di cicloossigenasi, un composto CTLA-4 o un inibitore di TNF alfa.

Secondo particolari forme di realizzazione, tale composto è un inibitore di cicloossigenasi, selezionato dal gruppo costituito da Ibuprofene, Dexibuprofene, Naproxene, Fenoprofene, Ketoprofene, Dexketoprofene, Flurbiprofene, Oxaprozin, Loxoprofene, Indometacina, Tolmetina, Sulindac, Etodolac, Ketorolac, Diclofenac, Aceclofenac, Nabumetone, Aspirina (acido acetilsalicilico), Diflunisal (Dolobid), Acido salicilico, Salsalato (Disalcid), Piroxicam, Meloxicam, Tenoxicam, Droxicam, Lornoxicam, Isoxicam, Acido mefenamico, Acido meclofenamico, acido Flufenamico, acido Tolfenamico, Celecoxib, Rofecoxib, Valdecoxib, Parecoxib, Lumiracoxib, Etoricoxib e Nimesulide.

Secondo certe forme di realizzazione, l'inibitore di cicloossigenasi è un derivato dell'acido propionico, come Ibuprofene, Dexibuprofene, Naproxene, Fenoprofene, Ketoprofene, Dexketoprofene,

Flurbiprofene, Oxaprozin o Loxoprofene.

Secondo certe forme di realizzazione, l'inibitore di cicloossigenasi è un derivato dell'acido acetico, come Indometacina, Tolmetina, Sulindac, Etodolac, Ketorolac, Diclofenac, Aceclofenac o Nabumetone.

Secondo certe forme di realizzazione, l'inibitore di cicloossigenasi è un Salicilato, come Aspirina (acido acetilsalicilico), Diflunisal (Dolobid), Acido salicilico o Salsalato.

Secondo certe forme di realizzazione, l'inibitore di cicloossigenasi è un derivato dell'acido enolico (Oxicam), come Piroxicam, Meloxicam, Tenoxicam, Droxicam, Lornoxicam o Isoxicam.

Secondo certe forme di realizzazione, l'inibitore di cicloossigenasi è un derivato dell'acido antranilico, come Acido mefenamico, Acido meclofenamico, Acido flufenamico o Acido tolfenamico.

Secondo certe forme di realizzazione, l'inibitore di cicloossigenasi è un inibitore selettivo della COX-2, come Celecoxib, Rofecoxib, Valdecoxib, Parecoxib, Lumiracoxib o Etoricoxib.

Secondo forme di realizzazione più particolari, l'inibitore di cicloossigenasi è l'Ibuprofene.

Secondo forme di realizzazione più particolari, l'inibitore di cicloossigenasi è il Dexibuprofene.

Secondo forme di realizzazione più particolari, l'inibitore di cicloossigenasi è il Naproxene.

Secondo forme di realizzazione più particolari, l'inibitore di cicloossigenasi è il Fenoprofene.

Secondo forme di realizzazione più particolari, l'inibitore di cicloossigenasi è il Ketoprofene.

Secondo forme di realizzazione più particolari, l'inibitore di cicloossigenasi è il Dexketoprofene.

Secondo forme di realizzazione più particolari, l'inibitore di cicloossigenasi è il Flurbiprofene.

Secondo forme di realizzazione più particolari, l'inibitore di cicloossigenasi è l'Oxaprozin.

Secondo forme di realizzazione più particolari, l'inibitore di cicloossigenasi è il Loxoprofene.

Secondo forme di realizzazione più particolari, l'inibitore di cicloossigenasi è l'Indometacina.

Secondo altre forme di realizzazione particolari, tale composto è un abatacept.

Secondo altre forme di realizzazione particolari, tale composto è Adalimumab, Certolizumab, Etanercept, Golimumab o Infliximab. Secondo forme di realizzazione più particolari, l'inibitore di TNF alfa è l'Adalimumab. Secondo altre forme di realizzazione più particolari, l'inibitore di TNF alfa è il Certolizumab. Secondo altre forme di realizzazione più particolari, l'inibitore di TNF alfa è l'Etanercept. Secondo altre forme di realizzazione più particolari, l'inibitore di TNF alfa è il Golimumab. Secondo altre forme di realizzazione più particolari, l'inibitore di TNF alfa è l'Infliximab.

Secondo altre forme di realizzazione particolari, la GAD è per l'uso nella prevenzione e/o nel trattamento dei diabeti autoimmuni latenti, come i diabeti autoimmuni latenti in un individuo GAD-anticorpo positivo.

Secondo particolari forme di realizzazione, la malattia autoimmune è un diabete di tipo 1.

Secondo altre forme di realizzazione particolari, la malattia autoimmune è un diabete autoimmune.

Secondo altre forme di realizzazione particolari, la malattia autoimmune è un diabete autoimmune

latente.

Secondo altre forme di realizzazione particolari, la malattia autoimmune è la recidiva di un diabete autoimmune, come la recidiva di un diabete autoimmune in un individuo (ad esempio un essere umano) con diabete autoimmune che è stato sottoposto a trapianto di cellule delle isole o ad altre terapie cellulari, compresa la terapia con cellule staminali.

Pertanto, la presente invenzione fornisce una combinazione (ad esempio una combinazione terapeutica) comprendente almeno una GAD e almeno un composto induttore di IL-10.

Più in particolare, la presente invenzione fornisce una combinazione (ad esempio una combinazione terapeutica) comprendente i) almeno una GAD e ii) almeno un composto induttore di IL-10 selezionato dal gruppo costituito dalla vitamina D.

Secondo forme di realizzazione particolari, la GAD è la GAD-65, compresi i suoi frammenti, i suoi derivati o un suo nucleotide codificante.

Secondo forme di realizzazione più particolari, la GAD è la GAD-65, un suo frammento, un suo derivato o un suo nucleotide codificante. Secondo forme di realizzazione più particolari, l'autoantigene di cellule beta è la GAD-65. Secondo altre forme di realizzazione particolari, l'autoantigene di cellule beta è un frammento derivato dalla GAD-65 (cioè un frammento della GAD65).

La combinazione secondo l'invenzione può comprendere più di un autoantigene. Pertanto, secondo certe forme di realizzazione, la combinazione comprende almeno due autoantigeni. Secondo certe altre forme di realizzazione, la combinazione comprende almeno tre autoantigeni. Secondo certe altre forme di realizzazione, la combinazione comprende almeno quattro autoantigeni.

Pertanto, secondo forme di realizzazione particolari, la combinazione comprende almeno una GAD, come la GAD-65, e insulina.

Secondo altre forme di realizzazione particolari, la combinazione comprende almeno una GAD, come la GAD-65, e insulina a catena B.

Secondo altre forme di realizzazione particolari, la combinazione comprende almeno una GAD, come la GAD-65, e proinsulina.

Secondo forme di realizzazione particolari, la combinazione comprende almeno una GAD, come la GAD-65, insulina e insulina a catena B. Secondo un'altra forma di realizzazione particolare, la combinazione comprende almeno una GAD, come la GAD-65, insulina e proinsulina. Secondo ancora altre forme di realizzazione particolari, la combinazione comprende almeno una GAD, come la GAD-65, insulina a catena B e proinsulina.

Secondo altre forme di realizzazione particolari, la combinazione comprende una GAD, come la GAD-65, insulina, insulina a catena B e insulina a catena B.

Secondo certe forme di realizzazione, l'autoantigene, come gli almeno due autoantigeni o gli almeno tre autoantigeni, è formulato in un adiuvante.



Secondo forme di realizzazione particolari, l'adiuvante è allume.

Secondo forme di realizzazione particolari, l'almeno un composto induttore di IL-10 è la vitamina D.

Secondo forme di realizzazione più particolari, l'almeno un composto induttore di IL-10 è la 1,25-diidrossivitamina D.

La combinazione secondo l'invenzione può comprendere più di un composto induttore di IL-10. Pertanto, secondo alcune forme di realizzazione, la combinazione comprende almeno due composti induttori di IL-10. Secondo certe altre forme di realizzazione, la combinazione comprende almeno tre composti induttori di IL-10. Secondo certe altre forme di realizzazione, la combinazione comprende almeno quattro composti induttori di IL-10.

Secondo certe forme di realizzazione, la combinazione comprende inoltre iii) un composto che riduce la capacità delle cellule dendritiche di attivare le cellule T CD4+ naïve, come un inibitore di cicloossigenasi, un composto CTLA-4 o un inibitore di TNF alfa.

Secondo particolari forme di realizzazione, tale composto è selezionato dal gruppo costituito da Ibuprofene, Dexibuprofene, Naproxene, Fenoprofene, Ketoprofene, Dexketoprofene, Flurbiprofene, Oxaprozin, Loxoprofene, Indometacina, Tolmetina, Sulindac, Etodolac, Ketorolac, Diclofenac, Aceclofenac, Nabumetone, Aspirina (acido acetilsalicilico), Diflunisal (Dolobid), Acido salicilico, Salsalato (Disalcid), Piroxicam, Meloxicam, Tenoxicam, Droxicam, Lornoxicam, Isoxicam, Acido mefenamico, Acido meclofenamico, acido Flufenamico, acido Tolfenamico, Celecoxib, Rofecoxib, Valdecoxib, Parecoxib, Lumiracoxib, Etoricoxib e Nimesulide.

Secondo certe forme di realizzazione, l'inibitore di cicloossigenasi è un derivato dell'acido propionico, come Ibuprofene, Dexibuprofene, Naproxene, Fenoprofene, Ketoprofene, Dexketoprofene, Flurbiprofene, Oxaprozin o Loxoprofene.

Secondo certe forme di realizzazione, l'inibitore di cicloossigenasi è un derivato dell'acido acetico, come Indometacina, Tolmetina, Sulindac, Etodolac, Ketorolac, Diclofenac, Aceclofenac o Nabumetone.

Secondo certe forme di realizzazione, l'inibitore di cicloossigenasi è un Salicilato, come Aspirina (acido acetilsalicilico), Diflunisal (Dolobid), Acido salicilico o Salsalato.

Secondo certe forme di realizzazione, l'inibitore di cicloossigenasi è un derivato dell'acido enolico (Oxicam), come Piroxicam, Meloxicam, Tenoxicam, Droxicam, Lornoxicam o Isoxicam.

Secondo certe forme di realizzazione, l'inibitore di cicloossigenasi è un derivato dell'acido antranilico, come Acido mefenamico, Acido meclofenamico, Acido flufenamico o Acido tolfenamico.

Secondo certe forme di realizzazione, l'inibitore di cicloossigenasi è un inibitore selettivo della COX-2, come Celecoxib, Rofecoxib, Valdecoxib, Parecoxib, Lumiracoxib o Etoricoxib.

Secondo forme di realizzazione più particolari, l'inibitore di cicloossigenasi è l'Ibuprofene.

Secondo forme di realizzazione più particolari, l'inibitore di cicloossigenasi è il Dexibuprofene.

Secondo forme di realizzazione più particolari, l'inibitore di cicloossigenasi è il Naproxene.

Secondo forme di realizzazione più particolari, l'inibitore di cicloossigenasi è il Fenoprofene.

Secondo forme di realizzazione più particolari, l'inibitore di cicloossigenasi è il Ketoprofene.

Secondo forme di realizzazione più particolari, l'inibitore di cicloossigenasi è il Dexketoprofene.

Secondo forme di realizzazione più particolari, l'inibitore di cicloossigenasi è il Flurbiprofene.

Secondo forme di realizzazione più particolari, l'inibitore di cicloossigenasi è l'Oxaprozin.

Secondo forme di realizzazione più particolari, l'inibitore di cicloossigenasi è il Loxoprofene.

Secondo forme di realizzazione più particolari, l'inibitore di cicloossigenasi è l'Indometacina.

Secondo altre forme di realizzazione particolari, tale composto è Adalimumab, Certolizumab, Etanercept, Golimumab o Infliximab. Secondo forme di realizzazione più particolari, l'inibitore di TNF alfa è l'Adalimumab. Secondo altre forme di realizzazione più particolari, l'inibitore di TNF alfa è il Certolizumab. Secondo altre forme di realizzazione più particolari, l'inibitore di TNF alfa è l'Etanercept.

Secondo altre forme di realizzazione più particolari, l'inibitore di TNF alfa e il Golimumab. Secondo altre forme di realizzazione più particolari, l'inibitore di TNF alfa è l'Infliximab.

La combinazione della presente invenzione può essere utilizzata in terapia secondo l'invenzione. Di conseguenza, la combinazione della presente invenzione può essere una combinazione terapeutica.

Secondo certe forme di realizzazione, la combinazione è per l'uso come medicamento come divulgato nel presente documento.

Secondo particolari forme di realizzazione, la combinazione è per l'uso nella prevenzione e/o nel trattamento dei diabete di tipo 1.

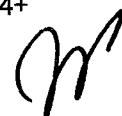
Secondo altre forme di realizzazione particolari, la combinazione è per l'uso nella prevenzione e/o nel trattamento dei diabete autoimmuni.

Secondo altre forme di realizzazione particolari, la combinazione è per l'uso nella prevenzione e/o nel trattamento dei diabete autoimmuni latenti.

Secondo ancora altre forme di realizzazione particolari, la combinazione è per l'uso nella prevenzione e/o nel trattamento della recidiva dei diabete autoimmuni, come la recidiva dei diabete autoimmuni in un individuo (ad esempio un essere umano) con diabete autoimmune che è stato sottoposto a trapianto di cellule delle isole o ad altre terapie cellulari, compresa la terapia con cellule staminali.

La presente invenzione fornisce in un ulteriore aspetto GAD per l'uso nel/i metodo/i per la prevenzione e/o il trattamento dei diabete di tipo 1, dei diabete autoimmuni e dei diabete autoimmuni latenti, in un individuo che ne necessita, il/i metodo/i comprende somministrare a detto individuo una GAD come dettagliato sopra; e somministrare a detto individuo almeno un composto induttore di IL-10, come almeno un composto induttore di IL-10 come dettagliato sopra.

Secondo certe forme di realizzazione, i metodi comprendono inoltre la somministrazione a detto individuo di un composto che riduce la capacità delle cellule dendritiche di attivare le cellule T CD4+



naive, come un composto che riduce la capacità delle cellule dendritiche di attivare le cellule T CD4+ naive come dettagliato sopra.

Secondo certe forme di realizzazione, l'individuo da trattare secondo la presente invenzione è un mammifero.

Secondo forme di realizzazione particolari, l'individuo da trattare secondo la presente invenzione è un essere umano.

Secondo certe forme di realizzazione, l'individuo da trattare secondo la presente invenzione è un adulto.

Secondo forme di realizzazione particolari, l'individuo da trattare secondo la presente invenzione è un essere umano adulto.

I medicinali, le composizioni farmaceutiche o le combinazioni terapeutiche secondo la presente divulgazione possono essere in qualsiasi forma adatta per l'applicazione su esseri umani e/o animali, preferibilmente esseri umani che comprendono gli infanti, i bambini e gli adulti e possono essere prodotti mediante procedure standard note agli esperti del settore. Il medicamento, la composizione (farmaceutica) o la combinazione terapeutica possono essere prodotti mediante procedure standard note agli esperti del settore, ad esempio dal sommario di "Pharmaceutics: The Science of Dosage Forms", Second Edition, Aulton, M.E. (Ed. Churchill Livingstone, Edimburgh (2002); "Encyclopedia of Pharmaceutical Technology", Second Edition, Swarbrick, J. e Boylan 15 J.C. (Eds.), Marcel Dekker, Inc. New York (2002); "Modern Pharmaceutics", Fourth Edition, Banker G.S. e Rhodes C.T. (Eds.) Marcel Dekker, Inc. New York 2002 e "The Theory and Practice of Industrial Pharmacy", Lachman L., Lieberman H. e Kanig J. (Eds.), Lea & Febiger, Philadelphia (1986). I termini "medicamento", "composizione farmaceutica" e "formulazioni farmaceutiche" possono essere usati in modo intercambiabile. L' almeno un composto induttore di IL-10 utilizzato secondo la presente invenzione può ad esempio essere somministrato per via parenterale, includendo l'iniezione intramuscolare, intraperitoneale o endovenosa, per via transmucosale o sublinguale; o per via orale, compresa la somministrazione in forma di compresse, pellet, granuli, capsule, losanghe, soluzioni acquose o oleose, sospensioni, emulsioni, spray o come forma in polvere secca ricostituita con un mezzo liquido. Il medicamento, la composizione farmaceutica o la combinazione terapeutica secondo la presente invenzione possono comprendere ulteriormente uno o più eccipienti farmaceuticamente accettabili. I carrier, i diluenti e gli eccipienti che sono adatti per la preparazione di un medicamento, di una composizione farmaceutica o di una combinazione terapeutica secondo la presente invenzione sono ben noti agli esperti del settore, ad esempio da secondo la presente invenzione sono ben noti agli esperti del settore, ad esempio da "Handbook of Pharmaceutical Excipients" Sixth Edition, Raymond C. Rowe, Paul J. Sheskey e Marian E Quinn (Eds.), American Pharmaceutical Association (July 2009).



La GAD e l'almeno un composto induttore di IL-10 possono essere somministrati contemporaneamente o separatamente. Secondo certe forme di realizzazione, la GAD e l'almeno un composto induttore di IL-10 vengono somministrati contemporaneamente. Secondo certe forme di realizzazione, la GAD e l'almeno un composto induttore di IL-10 vengono somministrati separatamente.

Secondo certe forme di realizzazione, l'almeno un composto induttore di IL-10 viene somministrato prima della somministrazione dell'almeno un autoantigene. Secondo forme di realizzazione particolari, l'almeno un composto induttore di IL-10 viene somministrato almeno un giorno, come ad esempio almeno due giorni, almeno tre giorni, almeno quattro giorni, almeno cinque giorni, almeno sei giorni o almeno una settimana, prima della prima somministrazione dell'almeno un autoantigene. Quindi, secondo tali forme di realizzazione, un ciclo di uno o più composti induttori di IL-10 viene iniziato almeno un giorno, come almeno due giorni, almeno tre giorni, almeno quattro giorni, almeno cinque giorni, almeno cinque giorni, almeno sei giorni o almeno una settimana, prima della prima somministrazione dell'almeno un autoantigene.

Secondo forme di realizzazione più particolari, l'almeno un composto induttore di IL-10 viene somministrato almeno una settimana, come almeno due settimane, prima della prima somministrazione dell'almeno un autoantigene. Quindi, secondo tali forme di realizzazione, un ciclo di uno o più composti induttori di IL-10 viene iniziato almeno una settimana, come almeno due settimane, prima della prima somministrazione dell'almeno un autoantigene.

Il composto che riduce la capacità delle cellule dendritiche di attivare le cellule T CD4+ naïve può essere somministrato contemporaneamente o separatamente con l'almeno un autoantigene e/o l'almeno un composto induttore di IL-10. Secondo certe forme di realizzazione, l'abatacept viene somministrato contemporaneamente all'almeno un autoantigene. Secondo certe altre forme di realizzazione, il composto che riduce la capacità delle cellule dendritiche di attivare le cellule T CD4+ naïve viene somministrato separatamente dall'almeno un autoantigene.

Secondo certe forme di realizzazione, l'almeno un composto induttore di IL-10 e il composto che riduce la capacità delle cellule dendritiche di attivare le cellule T CD4+ naïve vengono somministrati contemporaneamente. Secondo certe forme di realizzazione, l'almeno un composto induttore di IL-10 e il composto che riduce la capacità delle cellule dendritiche di attivare le cellule T CD4+ naïve sono somministrati separatamente.

Secondo particolari forme di realizzazione, il composto che riduce la capacità delle cellule dendritiche di attivare le cellule T CD4+ naïve, come ad esempio 10 mg/kg di abatacept, viene somministrato +/- 7 giorni intorno al momento della prima somministrazione di GAD.

Secondo certe forme di realizzazione, la somministrazione di GAD e la somministrazione del composto che riduce la capacità delle cellule dendritiche di attivare le cellule T CD4+ naïve viene

ripetuta il giorno 14, 28 e 45 +/- una settimana, a seconda dei casi per assicurare il blocco del CD28 sulle cellule T.

Secondo certe forme di realizzazione, almeno una dose da 2-20ug di GAD, come ad esempio di GAD-65, opzionalmente formulata in allume, viene somministrata per occasione di trattamento.

Secondo certe forme di realizzazione, almeno una dose da 1000-2000 UI di vitamina D, come ad esempio di vitamina D3, viene somministrata per occasione di trattamento.

Secondo certe forme di realizzazione, le APC sono rese più tollerogene somministrando tra 7000-70000 UI di vitamina D, come ad esempio di vitamina D3, a settimana per tra 1-10 settimane prima della prima somministrazione dell'almeno un autoantigene e per 4 settimane dopo l'ultima somministrazione dell'almeno un autoantigene.

Secondo certe forme di realizzazione, le somministrazioni di GAD, come di GAD-65, opzionalmente formulata in allume, vengono effettuate circa una settimana dopo ciascuna somministrazione del composto che riduce la capacità delle cellule dendritiche di attivare le cellule T CD4+ naïve.

Secondo certe forme di realizzazione, l'almeno una dose da 400 mg di FANS, come ad esempio di Ibuprofene, viene somministrata per occasione di trattamento.

L'invenzione presuppone la comprensione dei metodi convenzionali di biologia molecolare che includono tecniche per manipolare i polinucleotidi che sono ben noti a coloro che possiedono una ordinaria esperienza nel settore della biologia molecolare. Esempi di tali tecniche ben note si possono trovare in *Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd Edition*, Sambrook et al., Cold Spring Harbor, N.Y. (1989). Esempi di tecniche convenzionali di biologia molecolare includono, ma non sono limitate a, la ligazione in vitro, la digestione endonucleasica di restrizione, la PCR, la trasformazione cellulare, l'ibridazione, l'elettroforesi, il sequenziamento del DNA e simili.

L'invenzione presuppone anche la comprensione dei metodi immunobiologici convenzionali che sono ben noti a coloro che possiedono una ordinaria esperienza nel settore dell'immunologia. Informazioni e metodi di base sono disponibili in *Current Protocols in Immunology*, editori Bierer et al., 4 volumi, John Wiley & Sons, Inc., comprendente insegnamenti riguardanti: la cura e manipolazione di animali da laboratorio, l'induzione di risposte immunitarie, i saggi in vitro per la funzione dei linfociti, i saggi in vivo per la funzione dei linfociti, l'immunofluorescenza e cernita cellulare, le citochine e i loro recettori cellulari, gli studi immunologici sugli esseri umani, l'isolamento e l'analisi di proteine e peptidi, la biologia molecolare, la biochimica dell'attivazione cellulare, il complemento, l'immunità innata, i modelli animali per le malattie autoimmuni e infiammatorie (comprendente capitoli sul modello murino NOD, sul modello murino SLE (per il lupus) e l'induzione della malattia autoimmune mediante impoverimento delle cellule T regolatorie), l'elaborazione e la presentazione dell'antigene, l'ingegnerizzazione di molecole e recettori immunitari, le interazioni ligando-recettori nel sistema immunitario, la microscopia e abbreviazioni e terminologia per i geni e le proteine comuni del sistema

immunitario, compreso il sistema CD per le molecole di superficie dei leucociti.

### **Esempi**

I seguenti esempi divulgano studi che possono essere eseguiti al fine di stabilire la sicurezza e l'efficacia di vari aspetti della presente invenzione. L'autoantigene di cellule beta utilizzato negli esempi è l'acido glutammico decarbossilasi (GAD).

### **Esempio 1**

#### ***Studio pilota per preservare la secrezione residua di insulina negli adulti con diabete di tipo 1 di insorgenza recente somministrando una terapia di antigene-GAD (Diamyd®) nei linfonodi. (DIAGNODE)***

##### **1.1 Contesto e razionale**

L'incidenza dei diabete di tipo 1 (T1D) nei bambini è nel mondo, dopo la Finlandia, più alta in Svezia, e sta aumentando rapidamente. Il T1D è di gran lunga la più comune malattia cronica, grave, potenzialmente letale tra i bambini e gli adolescenti nel nostro paese e l'incidenza dei diabete di tipo 1 è elevata anche nei giovani adulti. La malattia tende a diventare un problema globale estremamente grave. La malattia è caratterizzata dalla mancanza di insulina. Anche se diversi pazienti alla diagnosi hanno una funzione beta cellulare residua piuttosto ragguardevole (1), la carenza diventa presto molto pronunciata e infine completa (2,3). La secrezione residua di insulina è di importanza cruciale. In rari casi la funzione delle cellule beta migliora così tanto poco dopo la diagnosi che il metabolismo del glucosio si normalizza e non è necessaria insulina per qualche tempo, ovvero il paziente entra nella cosiddetta remissione completa (4). Finché il paziente è in remissione completa non è necessario un trattamento attivo, al più forse qualche raccomandazione di un sano stile di vita per quanto riguarda l'esercizio fisico e la dieta. Non ci sono sintomi, nessuna complicanza acuta e se qualcuno è rimasto in remissione completa, è improbabile che un tale individuo possa mai sviluppare complicazioni tardive. Una leggera anomalia del metabolismo del glucosio o dei lipidi potrebbe aumentare il rischio di complicanze macrovascolari allo stesso modo delle persone con diabete chimico o ridotta tolleranza al glucosio. La remissione completa è rara, ma non lo è una remissione parziale (4). Durante questo periodo il paziente di solito ha valori glicemici quasi normali, nemmeno una lieve ipoglicemia e nessun episodio di chetoacidosi. La qualità della vita è molto buona poiché il paziente si sente bene, i bambini crescono normalmente, sono necessarie poche restrizioni, se del caso per quanto riguarda il cibo, i pazienti possono esercitarsi con grandi variazioni senza arrivare a ipoglicemia e sperimentare ottimi test della glicemia casalinghi. È sufficiente solo una certa secrezione residua di insulina per ridurre il rischio di chetoacidosi (5). Inoltre, nello studio DCCT è stato dimostrato che anche una modesta secrezione residua di insulina, una risposta a una stimolazione delle cellule beta con C-peptide sierico  $>0.20$  pmol/l/ml, svolge un ruolo importante nella prevenzione delle complicanze (6). Questo effetto può essere dovuto al fatto che la secrezione residua di insulina dovrebbe

ragionevolmente facilitare il raggiungimento di un buon equilibrio glicemico, ma è anche possibile che il C-peptide di per sé abbia una funzione fisiologica. È stato infatti riportato che il C-peptide influenza la permeabilità vascolare, diminuisce la perdita nel vaso retinico e non da ultimo ha un effetto positivo sulla funzione nervosa (7), sebbene l'effetto del C-peptide in sé sia ancora in discussione.

### **1.1.1 Fattori che influenzano il decorso naturale**

Alla diagnosi di T1D è stato affermato che l'80-90% delle cellule beta nel pancreas sono state distrutte. Tuttavia, la prova di ciò è scarsa e può darsi che il problema principale sia il deterioramento della funzione. Inoltre c'è una grande differenza tra i pazienti, poiché alcuni hanno una discreta secrezione residua di insulina e altri no. Poco dopo la diagnosi, specialmente quando viene somministrato un trattamento attivo con insulina, si verifica un aumento della produzione del peptide-C e allo stesso tempo un miglioramento della sensibilità all'insulina. Un buon controllo metabolico sembra migliorare l'ambiente e il metabolismo delle cellule beta e la funzione delle cellule beta viene preservata, il che a sua volta contribuisce a un migliore controllo metabolico e viceversa. L'intensità del processo autoimmune gioca un ruolo e sembra evidente che i bambini abbiano un processo immunitario più aggressivo rispetto agli adulti con un diabete di tipo 1, ma è ancora difficile prevederne il decorso. Alcuni studi hanno suggerito che alte concentrazioni di autoanticorpi sono seguite da una più rapida perdita della secrezione di insulina, mentre altri non hanno trovato una tale relazione, o addirittura hanno trovato il contrario. Finora non sono stati dimostrati segni speciali di immunità cellulo mediata per prevedere la perdita di cellule beta, ma i nostri stessi studi hanno dimostrato che il processo patologico è correlato a una deviazione T-helper-1 (Th-1) del sistema immunitario, con aumenti di alcune citochine come l'IFN $\gamma$  e la riduzione di IL-10 e di IL-13.

### ***L'effetto del trattamento con insulina sulla funzione delle cellule beta.***

Il trattamento attivo con insulina durante il primo periodo della malattia ha prolungato la remissione parziale molto tempo fa e questa scoperta potrebbe essere confermata e validata da una migliore secrezione residua di insulina (2). Il trattamento intensivo sembra migliorare la funzione delle cellule beta residue almeno per qualche tempo (8), ma può anche avere effetti positivi a lungo termine (9). È stato dimostrato che il trattamento attivo non solo previene o rimanda il diabete negli animali da esperimento, ma studi hanno indicato che tale trattamento potrebbe prevenire il diabete in soggetti ad alto rischio (10). Tuttavia, quando è stato provato su larga scala in Studi di Prevenzione del Diabete, il trattamento con insulina parenterale non ha impedito il diabete (11). Il trattamento orale con insulina potrebbe avere un effetto (12) e pertanto sono necessari ulteriori studi.

### **1.1.2 Interventi**

Negli anni '70 divenne chiaro che il T1D era una malattia autoimmune e quindi furono tentati interventi immunitari. Abbiamo eseguito i primi studi di intervento immunitario nel mondo su bambini diabetici quando già 30 anni fa usavamo la plasmaferesi in bambini e adolescenti di nuova diagnosi con alcuni

effetti positivi (13). Come effetto collaterale di quel trattamento è stata trovata una nuova proteina con peso di 64kD nel plasma (14), che in seguito ha dimostrato di essere l'acido glutammico decarbossilasi (GAD). La svolta, presa come prova del concetto di intervento immunitario, fu la ciclosporina, che senza dubbio rallentò il processo distruttivo autoimmune e fornì una migliore secrezione residua di insulina, mentre altri studi con soppressione immunitaria avevano un effetto minimo, specialmente nei bambini (15, 16, 17) o mostravano eventi avversi o rischi troppo gravi (18, 19). Nel tentativo di modulare il sistema immunitario abbiamo usato la fotoforesi. Sebbene siano stati dimostrati chiari effetti sul sistema immunitario in uno studio in doppio cieco controllato con placebo (20), l'effetto clinico è stato minimo e non si è potuto osservare quasi alcun miglioramento della funzionalità residua delle cellule beta (21). Pertanto, senza alcun intervento immunitario riuscito, il nostro interesse è stato rivolto ad agenti protettivi come la Nicotinammide e il Diazossido, con nessun effetto o un effetto transitorio (22, 23, 24).

Con la crescente conoscenza del processo immunitario che porta alla distruzione delle cellule beta, è diventato possibile dirigere più precisamente l'intervento immunitario per colpire le cellule T importanti. Sono stati condotti studi promettenti utilizzando anticorpi anti-CD3 nel tentativo di bloccare il processo immunitario distruttivo. I risultati di studi sia nordamericani che francesi con anti-CD3 hanno dimostrato che è possibile bloccare il processo autoimmune distruttivo e quindi almeno posporre il declino della funzione delle cellule beta (25,26). Il declino della secrezione residua di insulina è stato significativamente rallentato, ma sfortunatamente sembra che il declino sia stato solo ritardato di un anno e, successivamente, la curva di declino del peptide C è andata parallelamente alla curva di declino nel gruppo placebo. Inoltre, la maggior parte dei pazienti manifesta una sindrome da rilascio di citochine (CRS), che può essere abbastanza grave, e inoltre sono stati osservati numerosi effetti collaterali nella maggior parte dei pazienti. Abbiamo partecipato a uno dei due recenti studi di fase III (studio Protegé), che non è riuscito a raggiungere l'endpoint primario, sebbene il braccio con il trattamento più intenso abbia effettivamente mostrato una certa conservazione della secrezione residua di insulina e un fabbisogno di insulina inferiore per raggiungere un buon HbA1c (27; Sherry, Hagopian, Ludvigsson et al Lancet 2011). Sono necessari nuovi studi, ma è difficile credere che questo tipo di trattamento da solo sarà la soluzione accettata per un uso clinico generale. Ancora meno probabile è un tale trattamento accettato come trattamento preventivo in soggetti altrimenti sani, molti dei quali non svilupperebbero mai il diabete.

### **1.1.3 Terapia immunitaria con auto-antigeni**

Nel trattamento delle malattie allergiche, l'immunoterapia con una piccola quantità di antigene specifico per la malattia è stata utilizzata in modo efficace per molti anni. Il meccanismo per questo trattamento rimane poco chiaro, sebbene sia stata suggerita la modulazione immunitaria delle risposte immunitarie e l'induzione di cellule regolatorie. Nelle malattie autoimmuni nessun tale

trattamento ha avuto successo, ma dovrebbe essere provato (28). Esperimenti su animali predisposti al diabete hanno dimostrato che il trattamento con una proteina da shock termico potrebbe ritardare o posticipare lo sviluppo del diabete. L'uso del peptide Diapep277 in uno studio condotto negli adulti ha mostrato una significativa conservazione della secrezione di insulina senza quasi alcun evento avverso (29). Studi successivi su bambini e adolescenti con T1D (30), tuttavia, non hanno mostrato alcun effetto. Sono in corso studi con il trattamento con Diapep277 nel cosiddetto LADA (diabete autoimmune latente nell'adulto) e i risultati preliminari (rapporto all'IDF, Dubai, dicembre 2011 e all'ADA giugno 2012) suggeriscono che il trattamento con Diapep277 può preservare la funzione delle cellule beta negli adulti con lieve diabete di tipo 1. Tuttavia, i risultati sono un po' poco chiari, poiché si è osservata solo una debole conservazione del peptide-C dopo la stimolazione con glucagone, ma nessun effetto dopo il test di tolleranza ai pasti misti e non vi sono state differenze nei marcatori dell'immunità tra il gruppo trattato attivamente e il gruppo placebo. È stato dimostrato che il trattamento attivo con insulina non solo previene o rimanda il diabete negli animali da esperimento, ma studi preliminari aperti hanno indicato che tale trattamento potrebbe prevenire il diabete in soggetti ad alto rischio (10). L'insulina, chiaramente un autoantigene specifico delle cellule beta, è stata somministrata in modo parenterale (DPT) per prevenire il diabete in soggetti ad alto rischio senza alcun effetto, mentre la somministrazione orale di insulina con lo stesso scopo può avere un leggero effetto (12).

#### **1.1.4 Precedenti studi clinici con GAD-Alum**

##### **1.1.4.1 GAD-vaccinazione**

La GAD (glutammico decarbossilasi), può essere considerata un self-antigene, poiché viene prodotta nelle isole con rilascio maggiore come risposta alla stimolazione delle cellule beta. Questa proteina ha dimostrato di influenzare profondamente il processo immunitario autoimmune (31,32,33,34). Diversi studi hanno dimostrato che effettivamente la GAD può prevenire il diabete negli animali da esperimento (35-42). La somiglianza della GAD con le proteine virali può essere importante per l'azione terapeutica. L'effetto osservato, anche dopo l'inizio del processo immunitario, suggerisce che potrebbe essere possibile aspettarsi lo stesso effetto nell'uomo dopo l'inizio del processo immunitario. In uno studio di fase II su pazienti affetti da LADA, la somministrazione di una sola dose bassa, 20 µg di Diamyd, ha portato a un miglioramento della funzione delle cellule beta fino a 2 anni rispetto al gruppo trattato con placebo, senza effetti collaterali. Sono state anche provate altre dosi: 4 µg non hanno mostrato alcun effetto, 100 µg hanno mostrato un effetto simile a 20 µg, mentre 500 µg non hanno mostrato alcun effetto. Nessuna delle dosi ha mostrato eventi avversi, ancora così dopo diversi anni di follow-up (43). È stata trovata un'associazione con il cambiamento nel rapporto tra cellule CD4+ CD25+/CD4- CD25-, indicando un meccanismo per l'effetto. Con questo promettente contesto abbiamo iniziato uno studio di Fase II su pazienti diabetici di tipo 1 da 10 a 18 anni con esordio recente. Sulla base dell'idea che il trattamento in precedenza avesse avuto effetto nei pazienti con LADA



lentamente progressivi, abbiamo incluso pazienti con durata fino a 18 mesi del diabete T1D all'intervento. I pazienti sono stati randomizzati a 20 µg di GAD-allume (Diamyd) sc al giorno 1 e 30 o placebo. L'effetto ancora dopo 30 mesi è stato notevole, e chiaramente sia statisticamente che clinicamente significativo (44), con circa la metà del declino di peptide C nel gruppo trattato con GAD rispetto al gruppo placebo. I pazienti con una durata del diabete <3 mesi hanno avuto un effetto straordinariamente buono con nessun o con un minimo declino della funzione delle cellule beta durante il follow-up dei primi 15 mesi. Quasi tutti gli effetti sono stati osservati in pazienti con durata inferiore a 6 mesi alla vaccinazione. Inoltre, a differenza di altri trattamenti di intervento, questo effetto è stato ottenuto senza alcun evento avverso, rendendo il trattamento molto incoraggiante! Ancora dopo 48 mesi i pazienti trattati con durata <6 mesi hanno mantenuto in modo significativo il peptide C e ancora nessun evento avverso (45). Finora il trattamento con GAD è sembrato molto promettente. Sono stati condotti due studi di fase III, uno europeo con Johnny Ludvigsson (JL) come PI, e uno negli Stati Uniti con Jerry Palmer come PI e JL come coinvestigatore. Nello studio europeo 334 pazienti sono stati reclutati in tre bracci, un braccio con GAD-allume (Diamyd) 20 µg al giorno 1,30, 90 e 270, un altro braccio con GAD-allume 20 µg al giorno 1 e 30 e placebo al giorno 90 e 270 e un terzo braccio con placebo al giorno 1,30,90 e 270. L'endpoint primario, l'AUC sierica di C-peptide dopo un test di tolleranza ai pasti misti (MMTT) a 15 mesi, non è stato raggiunto! (AUC di peptide-C p=0.1; peptide-C a digiuno p=0.07) (46). Questo ha spinto la società (Diamyd Medical + Johnson & Johnson) a chiudere anticipatamente le prove di fase III. Tuttavia, lo studio di fase III ha mostrato diversi effetti positivi. Pertanto, l'efficacia statisticamente significativa è stata osservata in diversi sottogruppi predefiniti. Inoltre, 45 pazienti svedesi avevano superato la visita dei 30 mesi quando lo studio è stato interrotto e quei 15 pazienti che avevano ricevuto due dosi di 20 µg di GAD-allume (Diamyd) hanno mostrato una conservazione significativa del peptide-C dopo 30 mesi rispetto al placebo! Questo è particolarmente notevole in quanto i pazienti svedesi erano quelli senza efficacia dopo 15 mesi, mentre l'efficacia è stata trovata dopo 15 mesi nei paesi non nordici.

#### **1.1.4.2 Possibili ragioni per i diversi risultati della Fase II e della Fase III**

Nella randomizzazione della fase III, i pazienti che assumevano farmaco attivo erano più spesso nella fascia di età di 10-11 anni rispetto alla fascia di età di 16-18 anni, mentre il placebo era più frequente del farmaco attivo nella fascia di età superiore. Questo potrebbe aver influenzato il risultato. I pazienti della fase II sono stati trattati in marzo-aprile e quei pazienti della Fase III che sono stati trattati in marzo-aprile hanno avuto anche un effetto significativo del trattamento con GAD. Nello studio di Fase II non sono state accettate vaccinazioni, ma nella Fase III è stata consentita la vaccinazione contro l'influenza. Purtroppo un'epidemia di influenza H1N1 ha portato a che quasi tutti i pazienti sono stati vaccinati, molti dei quali in connessione con le vaccinazioni-GAD.

In Svezia e Finlandia il vaccino conteneva squalene, sospettato di influenzare il sistema immunitario

verso l'auto-immunità, e in questi due paesi non c'è stata alcuna efficacia del trattamento con GAD, mentre l'efficacia è stata significativa in altri paesi europei. I pazienti in Svezia che non hanno ricevuto la vaccinazione antinfluenzale vicino al trattamento con GAD, hanno avuto una migliore efficacia del trattamento con GAD (46).

#### **1.1.4.3 Andamento dello studio DIABGAD-1**

Da gennaio 2013 è in corso in Svezia lo studio di fase II DIABGAD-1. Questo è uno studio su 60 pazienti, di età compresa tra 10 e 18 anni, con diabete di tipo 1 di insorgenza recente, che sono stati trattati in uno studio randomizzato in doppio cieco controllato con placebo con 20 µg e 40 µg di GAD-allume somministrato due volte con intervallo di 30 giorni, in combinazione con vitamina D, 2000 unità al giorno per 450 giorni e Ibuprofen, 400 mg al giorno per 90 giorni. Il reclutamento è stato completo e ora chiuso. 60 pazienti sono stati randomizzati e altri 4 pazienti sono stati sottoposti a screening, in attesa dei risultati di screening. Finora non ci sono eventi avversi gravi giudicati correlati al farmaco in studio e eventi avversi molto lievi, non correlati al trattamento, tranne che lievi reazioni transitorie sul sito di iniezione del GAD-allume. Un'analisi intermedia è pianificata già dopo 6 mesi di follow-up di tutti i pazienti, mentre analisi più estese verranno eseguite dopo 15 e 30 mesi.

#### **1.1.5. Immunoterapia intra-linfonodale**

La terapia antigenica mira a presentare l'antigene alle cellule T nei linfonodi per ottenere un nuovo equilibrio del sistema immunitario e tolleranza nei confronti dell'antigene. Finora nel trattamento delle malattie autoimmuni è stato somministrato antigene per via orale, intranasale o sottocutanea, al fine di presentare l'antigene alle cellule presentanti/dendritiche che a loro volta dovrebbero presentare l'antigene alle cellule T del sistema immunitario. Tuttavia, studi sugli animali hanno dimostrato che le iniezioni intralinfatiche inducono una risposta forte e rilevante delle cellule T (47,48) e in campo allergologico studi clinici hanno dimostrato che la presentazione dell'antigene/allergene direttamente nei linfonodi sembra essere più efficace della somministrazione tradizionale (49). Possono essere utilizzate dosi più basse di allergene, il numero di trattamenti può essere radicalmente ridotto e non si sono verificati eventi avversi correlati al trattamento. I linfonodi inguinali sono facilmente accessibili nei pazienti e il dolore associato all'iniezione è valutato come inferiore a quello della puntura venosa (50). In questo contesto, il nostro obiettivo ambisce a studiare se lo stesso approccio può essere utilizzato in pazienti con la forma autoimmune del diabete di tipo 1. Per motivi etici faremo il primo studio pilota negli adulti.

#### **1.2 Ipotesi**

I risultati incoraggianti dello studio con GAD di fase II e i risultati parzialmente positivi dello studio europeo di fase III, supportano il concetto secondo cui la somministrazione di GAD-allume (Diamyd) può ridurre il processo autoimmune e contribuire alla conservazione della secrezione residua di insulina. Dal momento che gli studi precedenti hanno indicato che la dose deve essere compresa tra

20 e 100 µg di Diamyd, una dose più bassa di 3 µg somministrata tre volte dovrebbe essere adeguata quando somministrata direttamente nei linfonodi. L'iniezione di GAD-allume (Diamyd) direttamente nei linfonodi non darà eventi avversi gravi, avrà gli effetti immunologici desiderati e (mostrato in studi futuri) migliorerà l'efficacia.

## **2. Analisi rischio-beneficio**

L'incidenza del diabete di tipo 1 è dopo la Finlandia più alta in Svezia che in qualsiasi altro paese del mondo. L'incidenza è in costante aumento da decenni. La malattia non può essere curata e non può essere prevenuta. Nonostante un trattamento molto pesante, intenso e costoso, molti pazienti hanno complicazioni acute e tardive potenzialmente letali e la mortalità è molto aumentata. Alla diagnosi molti pazienti hanno una certa leggera secrezione residua di insulina. Fintanto che è così, è molto più facile mantenere stabile la glicemia, diminuisce l'incidenza dell'ipoglicemia così come il rischio di chetoacidosi. La qualità della vita per il paziente e per i genitori di bambini diabetici è migliore fino a che vi è una secrezione residua di insulina.

Il diabete di tipo 1 negli adulti differisce dalla malattia nei bambini e negli adolescenti poiché il processo patologico è spesso più lieve, il declino della secrezione residua di insulina più lento ed è più facile controllare la glicemia. Tuttavia, ci sono ancora grandi somiglianze, trattamenti e complicazioni simili e la conservazione della funzione delle cellule beta è molto importante anche negli adulti.

È evidente che esiste un grande vantaggio nella conservazione della secrezione residua di insulina, e quindi le terapie volte alla conservazione di questa funzione giustificano trattamenti abbastanza pesanti, persino pericolosi e costosi. Pertanto, è stato ritenuto giustificato trattare l'insorgenza del diabete di tipo 1 con farmaci come gli anticorpi monoclonali contro il recettore CD3, che causano eventi avversi principalmente in tutti i pazienti, alcuni perfino eventi avversi e rischi piuttosto gravi. Sono stati utilizzati anche citostatici puri.

Nel nostro studio proposto utilizziamo 4µg x 3 di GAD-allume (Diamyd), un trattamento che è stato utilizzato in dosi molto più elevate somministrate a bambini e adulti senza quasi eventi avversi osservati durante il follow-up di migliaia di anni di pazienti. Nel nostro studio intendiamo utilizzare una dose molto bassa, il che significa che il rischio generale può essere addirittura inferiore, ma la somministrazione sarà direttamente in un linfonodo, il che potrebbe dare reazioni locali. L'effetto sul sistema immunitario può diventare più pronunciato ma non dovrebbe comportare alcun effetto avverso. Precedenti studi sull'allergia (in cui uno dei co-investigatori, Helene Zachrisson ha effettuato iniezioni intra linfonodali di allergeni formulati in allume) non hanno mostrato alcun effetto avverso, né in generale né localmente). Per motivi di sicurezza, poiché si tratta della prima sperimentazione pilota di sempre con questo tipo di trattamento con autoantigeni nei linfodi, proviamo prima negli adulti che possono dare il loro libero consenso informato. Anche se il diabete di tipo 1 negli adulti è in qualche modo più blando rispetto ai pazienti più giovani, è di grande valore preservare la funzione delle cellule

beta, e quindi il trattamento proposto può avere un grande valore terapeutico anche per i pazienti adulti.

Riassumendo i pro ei contro, esiste una chiara possibilità di beneficio terapeutico di grande importanza, sia per i pazienti partecipanti, sia per i pazienti in studi futuri, mentre il rischio è molto piccolo. Se questi studi contribuiscono allo sviluppo di un buon trattamento, questo sarà di enorme valore per un gran numero di pazienti.

### **3. Scopo del presente studio**

Il nostro scopo del presente studio pilota è ottenere informazioni sul fatto che il GAD-allume possa essere somministrato nei linfonodi senza eventi avversi gravi correlati al trattamento, per consentire futuri studi di Fase II con la stessa tecnica per migliorare l'efficacia nel preservare la secrezione residua di insulina nel diabete di tipo 1. Pertanto, vogliamo vedere se questo trattamento provochi eventi avversi e in che modo i regimi di trattamento influenzano il sistema immunitario, causino la deviazione desiderata di Th-2, aumentino le cellule T-regolatrici e, si spera, diano indicazioni della conservazione della funzione residua delle cellule beta. Sulla base dei risultati a breve termine di questo studio pilota (follow-up di 6 mesi), potremmo quindi voler progettare uno studio di fase II più ampio, per includere pazienti più giovani e ottenere informazioni più solide. L'obiettivo principale a lungo termine è quindi quello di trovare un trattamento all'insorgenza del diabete di tipo 1 nei pazienti giovani che sia tollerabile per i pazienti, sicuro e che possa preservare la secrezione residua di insulina e dare ai pazienti una migliore qualità di vita, con complicazioni meno acute e, a lungo termine, meno rischi di complicazioni tardive.

### **4. Obiettivi**

Obiettivi:

Valutare la sicurezza di somministrare il Diamyd direttamente nelle ghiandole linfatiche e valutare la risposta immunitaria (51-54) e l'effetto sulla conservazione della secrezione endogena di insulina, misurata al basale e dopo 6, 15 e 30 mesi.

### **5. Popolazione**

I pazienti adulti con recente insorgenza di diabete di tipo 1 all'ospedale universitario di Linköping hanno ricevuto informazioni sullo studio e sono stati invitati a partecipare alla sperimentazione.

#### **5.1 Criteri di inclusione**

1. Consenso informato dato dai pazienti e tutori/genitori
2. Diabete di tipo 1 secondo la classificazione ADA con durata del diabete <6 mesi
3. Età di 18.00-29.99 anni alla diagnosi del diabete di tipo 1
4. C-peptide a digiuno  $\geq 0.12$  nmol/ml
5. Pos GADA ma <50000 unità casuali
6. Le femmine devono concordare di evitare la gravidanza e avere un test di gravidanza sulle urine

negativo

7. I pazienti devono concordare di utilizzare un'adeguata contraccezione, fino a 1 anno dopo l'ultima somministrazione di GAD-Alum/Placebo

## **5.2 Criteri di esclusione**

1. Trattamento precedente o attuale con terapia immunorepressiva (sebbene siano accettati steroidi topici o inalatori)
2. Trattamento continuo con un qualsiasi farmaco infiammatorio (il trattamento sporadico, ad esempio a causa di mal di testa o in connessione con la febbre per pochi giorni sarà accettato)
3. Trattamento con un qualsiasi farmaco antidiabetici orali o iniettato diverso dall'insulina
4. Una storia di anemia o risultati ematologici significativamente anormali allo screening
5. Una storia di epilessia, trauma cranico o incidente cerebro-vascolare o caratteristiche cliniche dell'attività motoria continua nei muscoli prossimali
6. Storia clinicamente significativa di reazione acuta ai vaccini o ad altri farmaci in passato
7. Trattamento con un qualsiasi vaccino, incluso il vaccino antinfluenzale, entro 4 mesi prima della prima dose programmata del farmaco dello studio o trattamento programmato con un qualsiasi vaccino fino a 4 mesi dopo l'ultima iniezione con il farmaco dello studio.
8. Partecipazione ad altri studi clinici con una nuova entità chimica nei 3 mesi precedenti
9. Incapacità o riluttanza a rispettare le disposizioni del presente protocollo
10. Una storia di abuso di alcol o droghe
11. Una malattia significativa diversa dal diabete entro 2 settimane prima della prima somministrazione
12. Virus dell'immunodeficienza umana (HIV) o epatite noti
13. Donne in allattamento o in gravidanza (la possibilità di una gravidanza deve essere esclusa dal  $\beta$ HCG nelle urine in loco entro 24 ore prima del trattamento con GAD-allume)
14. I maschi o le femmine non disposti a utilizzare un'adeguata contraccezione fino a 1 anno dopo l'ultimo trattamento con GAD-allume
15. Presenza di condizioni o patologie gravi associate, comprese le infezioni cutanee attive che impediscono l'iniezione sottocutanea, che secondo l'opinione dello sperimentatore rendono il paziente non idoneo allo studio
16. Ritenuto dal ricercatore non essere in grado di seguire le istruzioni e/o di seguire il protocollo dello studio

## **5.3 Reclutamento e screening**

Ai soggetti ammissibili verrà spiegato lo studio e riceveranno le informazioni scritte per il paziente. Dopo aver avuto il tempo di rivedere la natura dello studio, avranno l'opportunità di porre domande al team investigativo. Se, successivamente, i soggetti accettano di partecipare, firmeranno e dateranno

personalmente il modulo di consenso informato scritto. I pazienti riceveranno quindi una copia del modulo di consenso informato/informazioni del paziente firmato e datato.

#### **5.4 Rinuncia del paziente**

In conformità con la Dichiarazione di Helsinki, l'investigatore deve spiegare ai pazienti che hanno il diritto di ritirarsi dallo studio in qualsiasi momento e che ciò non pregiudicherà in alcun modo il loro trattamento futuro. Tuttavia, a meno che non si verifichino problemi di sicurezza, intendiamo seguire i pazienti per l'intera durata dello studio al fine di analizzare l'efficacia e le variabili di sicurezza anche per quei pazienti che si ritirano dallo studio. Il motivo di un qualsiasi tipo di rinuncia deve essere registrato sul CRF appropriato.

Esistono diverse categorie per le rinunce allo studio: Ritiro completo (ovvero interruzione del prodotto in fase di sperimentazione e anche dalla valutazione continua di efficacia e sicurezza)

Le ragioni standard per ritirarsi dall'ulteriore partecipazione allo studio e dalle visite di follow-up (e <ad esempio dagli esami del sangue>) possono essere:

- Decisione del paziente (revoca del consenso alla partecipazione)
- Il paziente ha perso il follow-up
- I motivi standard derivati dal recedere dall'assumere ulteriore prodotto sperimentale, ma continuare le visite di follow-up e le valutazioni di sicurezza possono essere:
  - Eventi avversi inaccettabili
  - Richiesta del paziente
  - La discrezione dello sperimentatore
  - Il paziente ha perso il follow-up/mancata presenza
  - Malattia intercorrente
  - La paziente rimane incinta

Pertanto il GAD-allume intra-linfonodale non deve essere somministrato al paziente se il paziente dopo l'inclusione nello studio ha ottenuto

- un danno cerebrale, una epilessia, un trauma cranico, malattie neurologiche
- una qualsiasi malattia ormonale attiva e grave diversa dal diabete di tipo 1
- un'altra grave malattia autoimmune (tranne la celiachia accettata per l'inclusione)
- un trattamento immunorepressivo
- un cancro, un trattamento del cancro
- un qualsiasi altro farmaco per il diabete, diverso dall'insulina
- una qualsiasi vaccinazione
- abuso di droghe/alcol

o se il paziente

- rimanere incinta o non è più disposto a usare contraccettivi sicuri durante lo studio

Tuttavia, ogni volta che un paziente si ritira da uno studio, o se per qualsiasi motivo non viene a ulteriori visite, una valutazione finale dello studio deve essere completata per quel paziente (visita <>) - indicando l'uno o più motivi per cui il paziente si è ritirato dallo studio. Tutta la documentazione relativa al paziente deve essere il più completa possibile. I ritiri per mancata frequenza devono essere seguiti dall'investigatore per ottenere il motivo della mancata presenza. I ritiri dovuti a malattie intercorrenti o ad eventi avversi devono essere completamente documentati nel modulo di registrazione del caso, con l'aggiunta di informazioni supplementari se disponibili e/o appropriate.

## 6. Procedure di trattamento

### 6.1 Progettazione dello studio e trattamento

Lo studio è un studio pilota, in aperto, in un singolo centro, in pazienti T1D GADA positivi di entrambi i sessi, di età compresa tra 18.00 e 29.99 anni, con diagnosi di T1D entro 6 mesi al momento dello screening (Visita 1) e livelli di peptide-C a digiuno pari o superiori 0.12 nmol/L. In totale, saranno reclutati circa 5 pazienti in un sito a Linköping, in Svezia. I pazienti saranno valutati per l'idoneità alla visita di screening (Visita 1) da 10 a 21 giorni prima dell'inizio del trattamento. Ai pazienti sottoposti a screening verrà assegnato un numero di screening sequenziale e questo numero di screening verrà utilizzato come identificazione del paziente durante lo studio.

I pazienti che si qualificano per l'inclusione nello studio saranno quindi arruolati nello studio per ricevere il farmaco dello studio sperimentale nelle visite successive secondo la Tabella 1 che segue. I pazienti saranno seguiti per un periodo di studio totale di 30 mesi, comprendente 8 visite al sito.

Si ved la Tabella 1 che segue per una panoramica delle visite di studio.

**Tabella 1 Pianificazione di Visite Pazienti, Finestre di Visite e Somministrazione di Farmaco dello Studio**

Studio	Screening	Intervento				Follow-up		
		Giorno 1 Baseline	Giorno 30 ± 3	Giorno 60 ± 3	Giorno 180 ± 14 Mese 6	Giorno 450 ± 14 Mese 15	Giorno 900 ± 30 Mese 30	
	Giorno dal -10 al 21 Screening	Visita 1	Visita 2	Visita 3	Visita 4	Visita 6	Visita 7	Visita 8
GAD- Alum/ Placebo		Trattam. GAD-alum	Trattam. GAD-alum	Trattam. GAD-alum				

### 6.2 Valutazioni e procedure

1. Trattamento insulinico standard, educazione e supporto psicosociale per pazienti con diabete di tipo 1 di nuova diagnosi.
2. Normalizzazione del bilancio dei fluidi, elettrolitico e acido-base.
3. Successivamente informazioni sullo studio.

4. Quando i pazienti hanno dato il loro consenso informato, al più tardi 120 giorni dopo la diagnosi, lo screening viene eseguito con un campione venoso a digiuno di pazienti idonei secondo criteri diversi dalle concentrazioni di peptide-C e di GADA (Visita 1).

5. Al basale (visita 2), 6, 15 e 30 mesi, valutazione della secrezione residua di insulina endogena mediante MMTT. HbA1c, sicurezza (ematologia e chimica), titolazioni di autoanticorpi (GAD65, IA-2), immunologia, sono seguiti mediante campioni di sangue ad ogni visita di studio. Dose di insulina esogena/24 ore, Aes e farmaci concomitanti sono registrati ad ogni visita di studio.

6. Ipoglicemia auto-segnalata (definita come bisogno di aiuto da parte di altri e/o convulsioni e/o incoscienza) registrata ad ogni visita di studio.

7. Eventuali sintomi o segni di altri problemi medici devono essere trattati a discrezione del medico clinico.

Gli esami saranno eseguiti secondo la Tabella 2 nella Sezione 7 che segue e nell'ordine indicato nel modulo di registrazione dei casi (CRF).

#### **6.2.1 Tutte le visite, dalla visita 1 alla 7**

Si noti che il paziente deve partecipare a tutte le visite di studio al mattino dopo un digiuno notturno (> 10 ore, acqua consentita). Per i pazienti con evidenza di infezione (inclusa la febbre), la visita completa deve essere posticipata di 5 giorni o fino al recupero del paziente.

#### **6.2.2 Somministrazione di GAD-Allume, Visite 2, 3 e 4**

Dopo la somministrazione, il paziente deve rimanere nelle vicinanze del sito di studio per l'ora successiva e il sito di somministrazione sarà esaminato dallo sperimentatore/infermiere dello studio 1 ora dopo l'iniezione.

#### **6.2.3 Test di tolleranza ai pasti misti (MMTT), visite 2, 5, 6 e 7**

- L'MMTT deve essere eseguito secondo le istruzioni nel CRF. Il paziente dovrebbe:
- Recarsi nel sito di studio dopo un digiuno notturno (> 10 ore), cioè il paziente dovrebbe non mangiare, ma è autorizzato a bere acqua
- Non assumere insulina ad azione breve/ad azione diretta entro 6 ore prima dell'MMTT. Al paziente è consentito assumere insulina base il giorno/notte prima, ma non la mattina prima dell'MMTT.
- I pazienti con CSII (pompa per insulina) devono continuare con la loro dose basale di insulina, ma non aggiungere dose in bolo nelle ultime 6 ore prima dell'MMTT
- Avere un livello di glucosio nel plasma a digiuno nell'intervallo definito da 4-12 mmol/l sul glucometro domestico del paziente la mattina del test. Se il paziente non soddisfa tutti i criteri sopra indicati, è necessario riprogrammare l'MMTT e il paziente dovrebbe tornare al sito di studio entro 5 giorni, se possibile.

Se per motivi di sicurezza, i soggetti devono mangiare o assumere insulina, anche la visita deve essere riprogrammata.

### **6.3 Test ed esami di laboratorio:**

1. Test immunologici:
  - a. Autoanticorpi (Anti-GAD65, Anti-Insulina, Anti-IA-2, ZnT8)
  - b. Vengono determinate le citochine e le chemochine rilevanti (si veda di seguito)
  - c. Le cellule T sono classificate e studiate (si veda sotto)
2. Genetica:
  - a. Viene effettuata la determinazione dell'HLA e dei geni correlati allo sviluppo del diabete
  - b. Studi di saggio per chiarire l'importanza dei geni correlati al diabete
3. Test dei virus:
  - a. Possono essere utilizzati test genetici, immunologici e microbiologici.
4. Stato del diabete:
  - a. HbA1c
  - b. Glucosio a digiuno e peptide-C a digiuno
  - c. Glucosio e peptide-C pasto stimolati.
5. Prelievo di sangue per la sicurezza:
  - a. Ematologia
  - b. Chimica

### **6.4 Storia medica**

Lo sperimentatore effettuerà una revisione completa della storia medica passata del soggetto e documentata sul CRF della storia medica.

Tutte le condizioni/malattie preesistenti saranno riportate nella pagina del CRF relativa alla storia medica durante la visita di screening (Visita 1).

Verranno inoltre documentate la data di diagnosi del diabete di tipo 1 del soggetto e la storia familiare di diabete di tipo 1.

### **6.5 Esame fisico incluso l'Esame Neurologico**

Alla visita di screening (Visita 1) il paziente sarà sottoposto a un esame fisico generale e a un esame neurologico e tutti i risultati saranno riportati come condizioni preesistenti nella pagina del CRF di anamnesi medica.

Durante le successive visite di studio il paziente verrà esaminato per eventuali nuove condizioni mediche o peggioramento di quelle preesistenti. Qualsiasi cambiamento nelle condizioni preesistenti o le nuove condizioni devono essere inseriti nella pagina AE del CRF e qualsiasi farmaco somministrato nelle pagine dei farmaci concomitanti.

I pazienti, oltre al limitato esame fisico da parte del medico, saranno sottoposti a un esame neurologico clinico standardizzato allo screening, e a 0, 6, 15 e 30 mesi. I test neurologici vengono eseguiti al fine di rilevare possibili lievi segni di malattia neuromuscolare, come disturbi della forza, dell'equilibrio e

della coordinazione.

L'esame neurologico comprende:

- Riflessi delle estremità
- Romberg (equilibrio e coordinamento)
- Camminare su una linea, 2 metri (equilibrio e coordinazione)
- In piedi su 1 gamba, sinistra e destra, 15 secondi per gamba (equilibrio e coordinazione)
- Dito-naso (coordinazione)
- Mimico (nervi cranici)
- riflesso di Babinski (funzione centrale)
- Forza muscolare (agitare le mani) di bicipiti, tricipiti, estensori distali e flessori

Questi esami possono anche essere ripetuti tra le visite programmate a discrezione dello sperimentatore. Lo screening per la malattia neurologica con elettroencefalogramma (EEG) non è incluso a causa della bassa sensibilità e specificità. Tuttavia, se vengono rilevati segni di disfunzione neurologica, il paziente deve essere indirizzato a un neurologo per ulteriori valutazioni.

#### 6.7 Farmaci Concomitanti

Qualsiasi farmaco concomitante utilizzato durante lo studio, considerato rilevante o meno per lo studio dallo sperimentatore, deve essere riportato nel registro dei farmaci concomitanti del CRF. Si veda anche la sezione 8.5, di seguito.

#### 7. Pianificazione delle procedure

**Tabella 1 Studio pilota DIAGNODE-1, Pianificazione degli Eventi di Studio, pazienti T1D**

Periodo di studio	Screening	Intervento					Follow-up	
	1	2	3	4	5	6	7	
Numero di visita	1	2	3	4	5	6	7	
Tempo (Giorno/settimana/mese)	D da -10 a -21	D1 Baseline	D30 ±3	D60 ±3	M 6 (D180 ± 14)	M 15 (D450 ± 14)	M 30 (D900 ± 30)	
Consenso informato	X							
Trattamento con GAD-allume (Diamyd)		X	X	X				
Storia Medica	X							
Esame Fisico	X	X	X	X	X	X	X	
Valutazione Neurologica	X	X	X	X	X	X	X	
Farmaci Concomitanti	X	X	X	X	X	X	X	
Altezza	X							
Peso, BMI	X	X	X	X	X		X	
Test di gravidanza delle urine (femmine)		X	X	X				
Ispezione del sito di iniezione <sup>a</sup>		X	X	X				
Dose di insulina	X	X	X	X	X	X	X	
Ipoglicemia auto-riferita <sup>b</sup>		X	X	X	X	X	X	
Eventi Avversi		X	X	X	X	X	X	

Periodo di studio	Screening	Intervento				Follow-up	
Prelievo di sangue per la sicurezza:							
* <i>Ematologia</i>	X	X	X	X	X	X	X
* <i>Chimica</i>	X	X	X	X	X	X	X
Auto-anticorpi:							
* <i>GADA</i>	X	X	X	X	X	X	X
* <i>autoanticorpi correlati al diabete</i>	X	X	X	X	X	X	X
Prelievo di sangue per lo stato del diabete:							
* <i>HbA1c</i>	X	X	X	X	X	X	X
* <i>Glicemia /peptide-C a digiuno</i>	X	X	X	X	X	X	X
* <i>Glucosio/peptide-C MMTT<sup>a</sup></i>		X			X	X	X
Prelievo di sangue per, genetica, immunologia		X	X	X	X	X	X
Vitamina D nel siero	X						
Prelievo di sangue per biobanca	X	X	X	X	X	X	X

<sup>a</sup> Ispezione del sito di iniezione prima e 60 minuti dopo l'iniezione da parte del medico investigatore o dell'infermiere

<sup>b</sup> Ipoglicemia definita come bisogno di aiuto da parte di altri e/o convulsioni e/o incoscienza

## 7.1 Visite

La prima visita, la visita di screening (Visita 1) deve essere eseguita da 10 a 21 giorni prima della Visita 2 pianificata (baseline). Le visite 3 e 4 devono quindi essere programmate con una finestra di visita di  $\pm 3$  giorni (seconda e terza somministrazione di GAD-Allume) e di  $\pm 14$  giorni per la visita 5, 6 e  $\pm 30$  giorni per la visita 7. Si noti che tutte le visite devono essere calcolate dalla visita di base (Visita 2) in base alla pianificazione delle visite. Si noti inoltre che le visite devono essere eseguite all'interno delle finestre di visita per rispettare il protocollo di studio.

Si prega di consultare le Tabelle 1 e 2 sopra riportate, per la pianificazione delle visite dei pazienti, le finestre di visita e la somministrazione del farmaco dello studio.

## 8. Medicinale dello studio

### 8.1 Medicinale dello studio

Le seguenti forniture di medicinali saranno utilizzate nello studio:

Medicinale di studio: GAD-Allume (Diamyd), 4  $\mu\text{g}$  x 3 (somministrato tre volte con un intervallo di un mese)

Fornitore IMP: Diamyd Medical AB, Stoccolma, Svezia.

### 8.2 Fornitura

Il GAD-allume (Diamyd) è una formulazione fornita da Diamyd Medical. Sarà fornito come medicinale preconfezionato da Diamyd Medical alla farmacia locale. Tutti i dosaggi verranno effettuati in ospedale e gestiti solo da personale di studio addestrato e autorizzato. Il medicinale in studio verrà etichettato con le informazioni secondo le normative locali. Il GAD-allume sarà conservato in frigorifero a 2-8 °C

in un'area protetta (ad esempio un armadio chiuso a chiave o un stanza adibita a farmacia), protetto da un uso non intenzionale. Tutti i medicinali dello studio saranno etichettati con informazioni secondo le normative locali.

### **8.3 Dosaggio e somministrazione**

GAD-Allume: 4 µg somministrati nel linfonodo nell'area inguinale (con l'aiuto della tecnica a ultra suoni) tre volte con un intervallo di un mese

### **8.4 Durata del trattamento**

Si veda 8.3

### **8.5 Medicinali concomitanti**

Non sono ammessi medicinali per la modulazione immunitaria sistemica e nessun altro medicinale per il diabete diverso dall'insulina, commercializzato o meno.

## **9. Variabili della risposta e risultati**

### **9.1 Valutazione esplorativa dell'efficacia**

#### **9.1.1. Variabili di efficacia**

Poiché si tratta di uno studio pilota in fase I, non esiste un endpoint primario di efficacia, ma seguiremo comunque

- La variazione del peptide.C a digiuno e del peptide-C (valore a 90 minuti e AUCmedia 0-120 min) durante un MMTT dal basale al mese 6, 15 rispetto al mese 30.
- La deviazione di Th2 della risposta immunitaria cellulo-mediata osservata ad esempio come rapporto aumentato di IL-5, 10, 13 rispetto a IFN-gamma, TNF-alfa, IL-1beta, IL-17 e aumento delle cellule T-regolatorie. La variazione tra la linea di base e le visite successive.
- I marcatori infiammatori, ad esempio TNF-alfa, IL-1 beta, IL-2, IL-17. La variazione tra la linea di base e le visite successive.
- Emoglobina A1c (HbA1c), variazione tra la linea di base e le visite successive.
- Dose di insulina esogena per kg di peso corporeo e 24 ore, variazione tra la linea di base e le visite successive.

## **10. Metodologia statistica e gestione dei dati**

### **10.1 Progettazione dello studio**

Lo studio DIAGNODE-1 è uno studio di intervento di fase I pilota in aperto.

Partecipanti allo studio: pazienti diabetici di tipo 1 di nuova diagnosi classici: N = 5. Età 18-29.99 anni.

Reclutati da una clinica di endocrinologia in Svezia

### **10.2 Stima della dimensione del campione**

Analisi di potenza: per questo studio pilota non vengono condotte analisi formali di potenza.

### **10.3 Piano di analisi statistica**

In breve sono previste le seguenti analisi:

Tutte le variabili continue avranno le seguenti statistiche descrittive visualizzate: numero di osservazioni (n), valore medio, deviazione standard, minimo, mediana e massimo. Tutte le variabili di natura categorica verranno visualizzate con frequenze e percentuali. La tabulazione delle statistiche descrittive sarà suddivisa per visita. Se del caso, saranno incluse anche le statistiche descrittive di base (screening).

#### **Caratteristiche demografiche e altre di base**

I dati demografici e le caratteristiche di base saranno presentati utilizzando statistiche descrittive (tabelle riassuntive).

#### **Variabili di sicurezza e dati di Efficacia**

I dati AE/SAE saranno presentati utilizzando una tabulazione standardizzata della frequenza e del tasso di incidenza di tutti gli AE/SAE osservati. Le frequenze e i tassi di incidenza sono calcolati per paziente. Gli eventi avversi saranno riassunti in base al sistema corporeo, alla causalità e alla gravità. Altri dati sulla sicurezza saranno presentati mediante statistiche descrittive.

I dati di efficacia riguardanti il peptide-C e il sistema immunitario, nonché gli eventi avversi e altri dati sulla sicurezza saranno riassunti in modo descrittivo.

Dopo 6 mesi, analisi dei dati di sicurezza. (I risultati verranno utilizzati per la progettazione di uno studio DIAGNODE di fase II).

### **10.4 Popolazioni dello studio**

#### **Popolazione intenzionale da trattare**

I pazienti saranno inclusi nella popolazione con intenzione di trattamento primaria per l'analisi dell'efficacia se ricevono almeno 1 dose di tutti i farmaci in studio in quel braccio e vengono valutati in una visita successiva.

#### **Per protocollo di popolazione**

Al fine di qualificarsi per la popolazione rigorosa per protocollo, i soggetti devono aver seguito il protocollo di studio senza gravi violazioni. Eventuali esami persi verranno sostituiti con l'ultima osservazione effettuata, ma possono essere persi gli esami di non più di 1 visita.

#### **Popolazione totale**

Qualsiasi paziente che si ritira dopo aver ricevuto almeno un trattamento (visita 2) sarà incluso nell'analisi di sicurezza (eventi avversi e parametri di sicurezza). Verranno elencati i dati per tutti i pazienti e verrà fornito un elenco di pazienti ritirati, con tutti i motivi per la rinuncia.

### **10.5 Raccolta dati/moduli di segnalazione casi**

Verranno forniti moduli per il caso clinico (CRF) per la registrazione dei dati di ciascun paziente. Poiché è importante disporre di un'adeguata raccolta dei dati in modo tempestivo, l'investigatore o il designato assegnato completano prontamente i CRF. Quando il monitor richiede ulteriori dati o chiarimenti per il CRF, la richiesta deve ricevere una risposta soddisfacente a tempo debito.

È responsabilità dello sperimentatore assicurarsi che questi moduli di segnalazione dei casi siano correttamente compilati. L'investigatore firmerà le pagine della firma designata per confermare che il modulo di segnalazione del caso sia accurato e completo.

Per garantire la leggibilità, i CRF devono essere completati in stampatello con una penna a sfera nera o blu (non matita, pennarello o penna stilografica). Eventuali correzioni ai CRF devono essere eseguite dall'investigatore o dal suo designato. È necessario tracciare un singolo tratto attraverso la voce originale. La correzione deve essere datata e siglata. Le voci errate non devono essere coperte con liquido correttore, né cancellate, né rese illeggibili in alcun modo. Anche se non vi sono cambiamenti rispetto a un precedente esame, nell'interesse della completezza dell'acquisizione dei dati, le domande, che sono ripetute in ciascuna sezione dei CRF, dovrebbero ricevere una risposta completa. L'investigatore deve fornire una spiegazione ragionevole per tutti i dati mancanti.

#### **10.6 Gestione dei dati**

I dati saranno codificati e inseriti in un database di un computer. Il trattamento dei dati, compreso il controllo della qualità dei dati, sarà conforme alle linee guida normative (ad esempio Conferenza internazionale sull'armonizzazione [ICH] e Good Clinical Practice [GCP]).

#### **11. Procedure normative e amministrative**

Eventuali requisiti normativi devono essere stati soddisfatti prima di iniziare lo studio. Lo sponsor chiederà l'approvazione normativa alle autorità competenti. I siti di studio, le strutture, i laboratori e tutti i dati (compresi i dati di origine) e la documentazione devono essere resi disponibili per l'ispezione da parte delle autorità.

#### **11.2 Informazioni paziente/Consenso informato**

Il ricercatore è responsabile di fornire ai pazienti informazioni verbali e scritte complete e adeguate sulla natura, lo scopo, i possibili rischi e i benefici dello studio. I pazienti devono inoltre essere informati che sono liberi di ritirarsi dallo studio in qualsiasi momento. I pazienti dovrebbero avere un tempo ragionevole per leggere e comprendere le informazioni prima di firmare. L'investigatore è responsabile di ottenere il consenso informato firmato da tutti i pazienti prima di includere il paziente in qualsiasi procedura correlata allo studio. Una copia delle informazioni del paziente e del modulo di consenso informato verrà consegnata ai pazienti.

#### **11.4 Piano di trattamento del paziente**

Tutti i pazienti continueranno a ricevere cure standard per il diabete di tipo 1 durante lo studio. Dopo il completamento individuale dello studio, il paziente tornerà al trattamento standard ricevuto prima della partecipazione allo studio.

#### **Esempio 2, esempio di riferimento**

Il regime terapeutico di questo esempio ha un'azione "ortogonale" e mitiga l'autoimmunità del T1D a lungo termine. Il sistema immunitario è sottoregolato mediante etanercept, che a sua volta sotto-

regola l'infiammazione attorno alle cellule beta, contemporaneamente a un autoantigene di cellule beta (GAD) presentato da cellule dendritiche, la cui capacità di indurre tolleranza è stata migliorata dal trattamento con vitamina D.

Studio: studio in aperto per valutare la tollerabilità di una terapia di combinazione composta da GAD-allume (Diamyd®), etanercept e vitamina D in bambini e adolescenti di nuova diagnosi di diabete di tipo 1

Ingredienti attivi: acido glutammico decarbossilasi umana ricombinante (rhGAD65), calciferolo (vitamina D), Etanercept.

Fase di sviluppo: Fase IIa

**Obiettivi:**

- Valutare la tollerabilità di una terapia di combinazione con rhGAD65, vitamina D ed etanercept
- Valutare come i trattamenti sopramenzionati influenzano il sistema immunitario e la secrezione endogena di insulina

**Progettazione dello Studio:**

Lo studio è uno studio clinico pilota multicentrico, in aperto, pilota. Tutti i pazienti dal giorno 1 riceveranno 2 000 UI di vitamina D per os al giorno, per 15 mesi, e dai giorni 1-90 riceveranno etanercept (Enbrel) iniettato per via sottocutanea a 0.8 mg/kg di peso corporeo (max 50 mg) una volta alla settimana e riceveranno 2 iniezioni sottocutanee di 20 µg di Diamyd in regime di innesco e stimolazione nei giorni 30 e 60. I pazienti saranno valutati per la tollerabilità per 6 mesi (periodo di studio principale, 6 visite) e seguiti per ulteriori 24 mesi (periodo di studio di estensione, 3 visite). Il periodo di studio totale è di 30 mesi.

Selezione dei soggetti: i pazienti devono avere un'età compresa tra 8.00 e 17.99 anni e essere diagnosticati per il diabete di tipo 1 (T1D) nei 100 giorni precedenti il momento dello screening. I pazienti avranno diritto all'arruolamento se il peptide-C a digiuno è  $\geq 0.12$  nmol/l (0.36 ng/ml) e sono presenti livelli elevati di anticorpi GAD65.

Numero di soggetti pianificati: saranno arruolati circa 20 pazienti.

**Descrizione dei gruppi di trattamento:**

C'è un solo gruppo di trattamento. I pazienti saranno valutati per l'idoneità alla visita di screening (Visita 1) da 2 a 4 settimane prima dell'inizio del trattamento. Alla visita 2 (giorno 1), i pazienti eleggibili per lo studio inizieranno il trattamento come indicato sopra.

**Endpoint**

**Endpoint primari:**

Valutare la tollerabilità di una terapia di combinazione con Diamyd, vitamina D ed etanercept al mese 6 (periodo di studio principale), 9, 15 e 30 (periodo di studio di estensione)

**Variabili per valutare la tollerabilità:**

- Reazioni al sito di iniezione
- Infezioni
- Occorrenza di eventi avversi (AE)
- Occorrenza di eventi avversi gravi
- Valutazioni fisiologiche e neurologiche
- Misurazioni di laboratorio (biochimica ed ematologia), inclusi calcio e vitamina D nel siero
- Titolazione di GAD65AB (GADA)

**Endpoint secondari:**

Per valutare come i trattamenti sopramenzionati influenzino il sistema immunitario e la secrezione endogena di insulina al Mese 6 (Periodo di studio principale), 9, 15 e 30 (Periodo di studio di estensione)

**Variabili per valutare l'influenza sul sistema immunitario:**

- Marcatori infiammatori, in particolare TNF-alfa, IL-1 beta, IL-2, IL-17
- Deviazione di Th2 della risposta immunitaria cellulo-mediata osservata ad esempio come rapporto aumentato di IL-5, 10, 13 rispetto a IFN-gamma, TNF-alfa, IL-1 beta e IL-17
- Aumento delle cellule T regolatorie

**Variabili per valutare l'effetto della secrezione endogena di insulina:**

- C-peptide (valore a 90 minuti e AUCmedia a 0-120 min) durante un MMTT
- Proporzione di pazienti con un livello massimo di peptide-C stimolato superiore a 0.2 nmol/l
- Peptide-C a digiuno
- Emoglobina A1c (HbA1c)
- Dose di insulina esogena per kg di peso corporeo e 24 ore

**Dimensione del campione:**

Non viene eseguito alcun calcolo reale della dimensione del campione in quanto si tratta di uno studio pilota in aperto, solo per vedere se il trattamento è tollerabile e non causa effetti negativi sulla funzione delle cellule beta e/o sul sistema immunitario.

Tutte le variabili saranno riassunte in modo descrittivo

**Esempio 3, esempio di riferimento**

Titolo dello studio: Effetto di GABA o della combinazione GABA/GAD sulla progressione del diabete mellito di tipo 1 nei bambini

Fase di sviluppo: studio pilota sull'uomo

**Obiettivi:**

- Valutare la sicurezza e l'influenza del trattamento con GABA sulla conservazione della secrezione residua di insulina nel diabete di tipo 1 di insorgenza recente.

- Valutare la sicurezza e l'influenza del trattamento con due dosi di GAD-allume (Diamyd®) più GABA sulla conservazione della secrezione residua di insulina nel diabete di tipo 1 di insorgenza recente.

Progettazione dello studio: lo studio è uno studio clinico a 3 bracci, randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo. I pazienti riceveranno entrambi di

- i) GABA orale, dosato per kg, due volte al giorno per 12 mesi più 2 iniezioni sottocutanee di 20 µg di Diamyd in un regime di innesco e potenziamento per un periodo di 30 giorni
- ii) GABA orale, dosato per kg, due volte al giorno per 12 mesi
- iii) placebo.

I pazienti saranno seguiti per un totale di 12 mesi.

Selezione dei soggetti: i pazienti devono avere un'età compresa tra 4 e 17 anni e essere stati diagnosticati per un diabete di tipo 1 (T1D) nelle 4 settimane precedenti di randomizzazione. I pazienti avranno diritto all'arruolamento se sono presenti livelli elevati di anticorpi GAD65.

Numero di soggetti pianificati: saranno arruolati circa 75 pazienti.

#### **Descrizione dei gruppi di trattamento:**

I pazienti saranno valutati per l'idoneità prima della randomizzazione. Alla Visita 1 (Giorno 1, basale), i pazienti eleggibili per lo studio saranno randomizzati in 1 su 3 gruppi di trattamento:

- 25 i pazienti saranno assegnati a ricevere GABA orale due volte al giorno, dosato per kg, dal 1° giorno al 12° mese. Inoltre verranno somministrate 2 iniezioni sottocutanee con 20 µg di Diamyd (GAD-allume) al 1° giorno e al 1° mese, ovvero 1 dose di innesco e 1 dose di rafforzamento (che fornisce una dose totale di 40 µg di Diamyd).
- 25 i pazienti saranno assegnati a ricevere GABA orale due volte al giorno, dosato per kg, dal 1° giorno al 12° mese. Inoltre, verranno somministrate 2 iniezioni sottocutanee con Placebo Diamyd al giorno 1 e al mese 1
- 25 i pazienti saranno assegnati a ricevere Placebo GABA per via orale due volte al giorno, dosato per kg, dal giorno 1 al mese 12. Inoltre, verranno somministrate 2 iniezioni sottocutanee con Placebo Diamyd al giorno 1 e al mese 1

#### **Endpoint primario:**

- Valutare l'effetto della combinazione GABA e GABA + GAD-allume sulla funzione delle cellule beta pancreatiche, misurata mediante i livelli di secrezione di peptide-C stimolato dai pasti rispetto ai controlli placebo corrispondenti all'età, prima e dopo un anno di trattamento.

#### **Endpoint secondari:**

- Valutare l'effetto della combinazione GABA e GABA + GAD-allume sugli autoanticorpi dei diabeti autoimmuni: GAD-65, ICA512 e Zinc Transporter 8 (ZnT8A) e l'effetto su HbA1c, i livelli di glucosio e di glucagone a digiuno e stimolati, il peptide-C a digiuno e la quantità di utilizzo giornaliero di

insulina da parte dei partecipanti, dal basale alle visite successive

- Valutare la sicurezza della combinazione GABA e GABA/GAD-allume

#### **Sicurezza**

La valutazione della sicurezza comprende l'osservazione delle reazioni nel sito di iniezione, il verificarsi di eventi avversi (AE), le misurazioni di laboratorio, le valutazioni neurologiche e gli esami fisici limitati.

#### **Dimensione del campione:**

La dimensione del campione per lo studio proposto è di 75 bambini; 50 nei gruppi di trattamento e 25 nel gruppo placebo. Per il confronto primario delle misurazioni di 12 mesi post-basali del peptide-C tra questi gruppi, ipotizzando un  $\alpha$  di 0.05 e una AUC del peptide-C media (SD) di 1.0 (0.4), questa dimensione del campione fornisce una potenza del ~40% di rilevare una differenza del 25% e il ~97% di potenza di rilevare una differenza del 50%. Gli eventi avversi e altri dati saranno riassunti in modo descrittivo.

#### **Esempio 4, esempio di riferimento**

Titolo dello studio: uno studio randomizzato in doppio cieco, avviato da un ricercatore per determinare la sicurezza e l'effetto di Diamyd® in combinazione con vitamina D sulla progressione del diabete di tipo 1 nei bambini con autoanticorpi multiple di cellule delle isole

Nome dell'ingrediente attivo: Acido glutammico decarbossilasi umana ricombinante (rhGAD65), Calciferolo (Vitamina D3)

#### **Obiettivi:**

- L'obiettivo primario è valutare se Diamyd®, nei bambini trattati con una dose relativamente elevata di vitamina D, può ritardare o arrestare il processo autoimmune che porta al diabete clinico di tipo 1 nei bambini con autoimmunità di cellule beta persistente in corso, come indicato da autoanticorpi multipli positivi a cellule delle isole.
- L'obiettivo secondario è dimostrare che Diamyd® è sicuro nei bambini a rischio di diabete di tipo 1.

#### **Progettazione dello studio:**

Lo studio è uno studio clinico a due bracci, randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo, a centro singolo. I partecipanti allo studio riceveranno 2 iniezioni sottocutanee di Diamyd® 20 µg o placebo in un regime di innesco e rafforzamento per un periodo di 30 giorni. Tutti i partecipanti allo studio saranno integrati con vitamina D alla dose giornaliera di 2000 IE durante il periodo di studio totale (indipendentemente dal gruppo di trattamento a cui sono randomizzati). I partecipanti allo studio saranno seguiti per 5 anni.

#### **Protocollo di intervento post diagnosi (PDIP)**

In attesa della durata di conservazione del farmaco in studio, ai bambini con diagnosi di diabete clinico

di tipo 1 durante il periodo di studio può essere offerto di continuare la sperimentazione in un protocollo di intervento post diagnosi (PDIP) per ricevere ulteriormente 2 iniezioni di Diamyd® indipendentemente dal gruppo di trattamento al quale sono stati randomizzati nella parte di prevenzione dello studio. Tutti i bambini che sono iscritti al PDIP saranno interrotti dal protocollo di prevenzione originale per essere seguiti a fondo per la sicurezza e l'efficacia secondo il PDIP o 15 mesi dopo la prima iniezione di Diamyd® nel PDIP

**Selezione di soggetti:**

I soggetti devono avere un'età compresa tra 4.00 e 17.99 anni, essere GADA positivi e positivi ad almeno un autoanticorpo associato al diabete di tipo 1 aggiuntivo (IA-2A, ZnT8RW/QA o IAA).

Numero di soggetti pianificati: saranno arruolati circa 80 pazienti.

**Descrizione dei gruppi di trattamento:**

I pazienti saranno valutati per l'idoneità alla visita di screening (Visita 0) circa 30 giorni prima della prima iniezione. Alla visita 1 (giorno 1), i pazienti eleggibili per lo studio saranno randomizzati a 1 di 2 gruppi di trattamento:

- Circa 40 pazienti saranno assegnati a ricevere 2 iniezioni sottocutanee con 20 µg di Diamyd® nei giorni 1 e 30, ovvero 1 dose di innesco e 1 dose di rafforzamento.
- Circa 40 pazienti saranno assegnati a ricevere 2 iniezioni sottocutanee di placebo, 1 ciascuna nei giorni 1 e 30.

Entrambi i gruppi di trattamento saranno integrati con vitamina D3 a una dose giornaliera di 2000 IE durante il periodo di studio totale di 5 anni.

**Protocollo di intervento post diagnosi (PDIP)**

- Entro 4 mesi dalla diagnosi clinica del diabete di tipo 1, i partecipanti riceveranno un'iniezione di Diamyd® 20 µg il giorno 1 nel PDIP, seguita da una seconda iniezione di Diamyd® il giorno 30, in modo di innesco e rafforzamento, indipendentemente dal gruppo di trattamento a cui sono stati randomizzati nella parte di prevenzione dello studio (prima della diagnosi)

**Endpoint:**

**Endpoint primario:**

La percentuale di soggetti con diagnosi di diabete clinico di tipo 1 nel gruppo trattato con Diamyd®, confrontata al gruppo trattato con placebo a cinque anni dopo la prima iniezione.

**Endpoint secondari:**

Valutare la sicurezza e il cambiamento dello stato metabolico dal metabolismo del glucosio normale a quello alterato nel gruppo di bambini con metabolismo normale del glucosio al basale, nonché la progressione dello stato metabolico nei bambini con metabolismo del glucosio alterato allo screening di base, nei bambini non diabetici con autoanticorpi multipli delle isole trattati con Diamyd® rispetto a quelli trattati con placebo.

**Variabili per valutare la sicurezza:**

- Reazioni al sito di iniezione
- Occorrenza di eventi avversi (AE)
- Misurazioni di laboratorio (biochimica ed ematologia, incluso l'emocromo completo), inclusi calcio e vitamina D3 nel siero
- Analisi delle urine
- Esami fisici, comprese le valutazioni neurologiche
- Titolazioni di GADA epitopo-specifiche, isotipi e sottotipi, nonché come autoanticorpi antiidiotipici verso GADA

**Stato metabolico:**

- Passaggio del metabolismo del glucosio da normale a alterato, definito come uno qualsiasi di
  - a) F-glucosio  $\geq 6.1$  mmol/L
  - b) p-glucosio massimo a 30, 60, 90 minuti  $\geq 11.1$  mmol/l nell'OGTT
  - c) p-glucosio a 120 min  $\geq 7.8$  mmol/l su OGTT
  - d) HbA1c  $\geq 39$  mmol/mol

Il metabolismo del glucosio alterato deve essere confermato in una seconda visita. Questo endpoint verrà utilizzato nel gruppo di bambini con normale metabolismo del glucosio allo screening di base

- Progressione del metabolismo del glucosio alterato da una o più delle suddette variabili ad ulteriori segni di metabolismo del glucosio ridotto, confermato in una seconda visita. Questo endpoint verrà utilizzato nel gruppo di bambini con alterato metabolismo del glucosio al basale.

**Endpoint esplorativi:**

- Proporzione di soggetti con diagnosi di diabete di tipo 1 clinico a 1, 2, 3 e 4 anni di follow-up.
- Tempo dalla visita di base alla diagnosi clinica del diabete di tipo 1
- Variazione rispetto al basale delle seguenti variabili metaboliche chiave in vari punti temporali: HbA1c, risposta insulinica di prima fase e valore K da lvGTT, AUC di p-glucosio e di peptide-C da OGTT, glucosio e peptide-C a 120 minuti dopo OGTT, peptide-C, insulina e glucosio a digiuno
- Variazione di altre variabili metaboliche rispetto al basale: AUC di peptide-C, glucosio e insulina di lvGTT, AUC di insulina di OGTT, variazione di p-glucosio max su OGTT.

**Dimensione del campione:**

A DIAPREV-IT 2 verrà chiesto di partecipare fino a 80 bambini. Si prevede che il 50% dei bambini non trattati con autoanticorpi multipli svilupperà il diabete di tipo 1 entro 5 anni. Questa frequenza era stata precedentemente riportata uguale tra i parenti dei pazienti diabetici e nella popolazione generale. Se il 20% dei bambini trattati svilupperà il diabete di tipo 1 nello stesso periodo di tempo, avremo un potere dell'82% con  $\alpha = 5\%$  con un gruppo di  $40 + 40 = 80$  bambini. Il valore  $P < 0.05$  verrà utilizzato come livello di significatività.

**Analisi:**

Verranno condotte analisi dei dati di studio per affrontare sia la sicurezza che l'efficacia del trattamento. Un piano statistico analitico (SAP) sarà sviluppato prima delle analisi statistiche.

Le analisi verranno eseguite utilizzando statistiche parametriche. Se i criteri di normalità delle variabili non vengono soddisfatti (ad esempio Test di Kolmogorov-Smirnov) verranno utilizzate statistiche non parametriche di tipo Wilcoxon. Le tabelle a quattro campi verranno analizzate utilizzando il test esatto di Fisher. Il tempo per il diabete verrà analizzato utilizzando l'analisi della tabella di vita, come la regressione di Kaplan-Meier e Cox. Le analisi di efficacia saranno eseguite sia su protocollo (PP) che su base da trattare (ITT). In ITT verrà applicata l'ultima osservazione portata avanti.

Gli eventi avversi e altri dati sulla sicurezza saranno riassunti in modo descrittivo.

**Esempio 5, esempio di riferimento**

Titolo dello studio: uno studio multicentrico di fase II, a 2 bracci, randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo, di dosi crescenti multiple di Diamyd®, in combinazione con vitamina D, per valutare la sicurezza, la risposta immunitaria e lo stato del diabete nei giovani adulti con nuova diagnosi con diabete di tipo 1.

Nome degli ingredienti attivi: acido glutammico decarbossilasi umana ricombinante (rhGAD65) e calciferolo (vitamina D)

**Obiettivi:**

**Obiettivo primario**

- Valutare la sicurezza della somministrazione di dosi crescenti multiple di Diamyd® in combinazione con vitamina D

**Obiettivi secondari**

- Valutare l'influenza sul sistema immunitario della somministrazione di dosi crescenti multiple di Diamyd® in combinazione con vitamina D
- Confrontare le variabili dello stato del diabete tra Diamyd e Placebo prima e dopo la somministrazione di dosi crescenti multiple di Diamyd® in combinazione con vitamina D

**Progettazione dello studio:**

Lo studio è uno studio clinico a 2 bracci, randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo, multicentrico. I pazienti eleggibili riceveranno vitamina D per os al giorno per 1 mese prima della prima iniezione di Diamyd®. A partire dal mese 1 (basale) tutti i pazienti riceveranno una dose di mantenimento di vitamina D per ulteriori 5 mesi.

Le iniezioni sottocutanee settimanali di dosi crescenti di Diamyd® (o Placebo) verranno somministrate dal mese 1 (basale) per un periodo di 13 settimane (aumento della dose) dove dopo la dose massima verrà somministrata a intervalli di 2, 4 e 8 settimane (dalla settimana 15 alla settimana 27) (dose di mantenimento). La dose di mantenimento verrà quindi somministrata ogni 8-12 settimane per 1 anno.

I pazienti saranno valutati per la sicurezza e i parametri immunologici al 6° mese e saranno quindi valutati per le variabili dello stato del diabete al mese 15 e al 30. Il periodo di studio totale è di 30 mesi. Selezione dei soggetti: i pazienti devono avere un'età compresa tra 18 e 30 anni e essere diagnosticati per un diabete di tipo 1 (T1D) nei 6 mesi precedenti al momento dello screening. I pazienti avranno diritto all'arruolamento se il peptide-C a digiuno è  $\geq 0.12$  nmol/l (0.36 ng/ml) e sono presenti livelli elevati di anticorpi GAD65.

Numero di soggetti pianificati: saranno arruolati circa 40 pazienti.

**Descrizione dei gruppi di trattamento:**

I pazienti saranno valutati per l'idoneità alla visita di screening (giorno -14-28) da 2 a 4 settimane prima della randomizzazione. Tutti i pazienti idonei riceveranno dal 1° giorno 7000 UI di vitamina D per os al giorno per 1 mese giorni per garantire che i livelli di vitamina D siano superiori a  $> 70$  nM/l prima della prima iniezione di Diamyd®/Placebo. A partire dal mese 1 (basale) tutti i pazienti riceveranno una dose di mantenimento di vitamina D di 2000 UI al giorno per ulteriori 5 mesi.

Il primo giorno, i pazienti idonei allo studio saranno randomizzati in 1 su 2 gruppi di trattamento:

- Circa 20 pazienti saranno assegnati a ricevere iniezioni sottocutanee di dosi crescenti di Diamyd®, a partire dal basale (mese 1) come segue: 0.4; 0.8; 2; 3.2; 4; 6.4; 8; 12; 16; 20; 24, 32, 40  $\mu$ g di Diamyd® settimanalmente, dove dopo 40  $\mu$ g di Diamyd® verranno somministrati dalla settimana 15 alla 27 settimana a intervalli di 2, 4 e 8 settimane. 40  $\mu$ g di Diamyd® verranno successivamente somministrati ogni 8-12 settimane per 1 anno. La vitamina D verrà somministrata come descritto sopra (dal primo giorno).
- Circa 20 pazienti saranno assegnati a ricevere iniezioni sottocutanee di Placebo nello stesso periodo pianificato come sopra. La vitamina D verrà somministrata come descritto sopra (nessun placebo per la vitamina D).

I pazienti saranno seguiti per tre visite di follow-up al mese 6, 15 e 30

**Endpoint:**

**Endpoint primario:**

Valutare la sicurezza della somministrazione di dosi crescenti multiple di Diamyd® in combinazione con il trattamento con vitamina D ai mesi 6, 15 e 30.

**Variabili per valutare la sicurezza:**

- Reazioni del sito di iniezione
- Occorrenza di eventi avversi (AE)
- Misurazioni di laboratorio (biochimica ed ematologia)
- Analisi delle urine (microalbuminuria, creatinina)
  - Esami fisici, comprese le valutazioni neurologiche
  - Titolazione di GAD65AB (GADA)

**Endpoint secondari:**

Valutare l'influenza del sistema immunitario e delle variabili dello stato del diabete tra Diamyd e Placebo prima e dopo la somministrazione di dosi crescenti multiple di Diamyd® in combinazione con il trattamento con vitamina D al 15 e 30 mese.

**Variabili per valutare l'influenza sul sistema immunitario:**

- Marcatori infiammatori (TNF-alfa, IL-1 beta, IL-2, IL-17)
- Deviazione di Th2 della risposta immunitaria cellulo-mediata (vista come rapporto aumentato di IL-5, 10, 13 rispetto a IFN-gamma, TNF-alfa, IL-1 beta e IL-17)
- Aumento delle cellule T regolatorie

**Variabili per valutare l'effetto della secrezione endogena di insulina:**

- Emoglobina A1c (HbA1c), variazione tra la baseline e le visite successive
- Dose di insulina esogena per kg di peso corporeo e 24 ore, variazione tra basale e visite successive
- Numero di episodi auto-riportati di ipoglicemia
- Peptide-C a digiuno, variazione tra basale e visite successive
- AUC del C-peptide a 0-120 min durante MMTT, variazione tra basale e visite successive
- Peptide-C misurato a 30, 60, 90 e 120 minuti durante l'MMTT
- Peptide-C massimo durante l'MMTT, variazione tra basale e visite successive
- Proporzione di pazienti con un livello massimo di peptide-C stimolato superiore a 0.2 nmol/l

**Dimensione del Campione:**

Non viene eseguito alcun calcolo reale della dimensione del campione in quanto questo è uno studio solo per vedere se i diversi trattamenti sono sicuri e non causano effetti negativi sulla funzione delle cellule beta e/o sul sistema immunitario. Gli eventi avversi e altri dati sulla sicurezza saranno riassunti in modo descrittivo. I parametri immunologici e le variabili di stato del diabete saranno riassunti in modo descrittivo.

## RIVENDICAZIONI

1. Acido glutammico decarbossilasi (GAD) per l'uso in un metodo per la prevenzione e/o il trattamento di una malattia autoimmune selezionata tra i diabete di tipo 1, i diabete autoimmuni e i diabete autoimmuni latenti, comprendente somministrare a un soggetto una composizione, detta composizione comprendendo l'acido glutammico decarbossilasi mediante iniezione direttamente in un linfonodo.
2. Acido glutammico decarbossilasi per l'uso secondo la rivendicazione 1, in cui la GAD viene somministrata in una quantità di 1 - 15 µg, più preferito tra 2 - 10 µg e il più preferito tra 2 - 5 µg per iniezione.
3. Acido glutammico decarbossilasi per l'uso secondo la rivendicazione 1 o 2, il metodo comprendente somministrare la composizione comprendente acido glutammico decarbossilasi almeno 2 volte, più preferito almeno 3 volte e il più preferito almeno 4 volte, essendo ciascuna somministrazione a distanza di almeno 14 giorni, più preferibilmente a distanza di almeno 30 giorni.
4. Acido glutammico decarbossilasi per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-3, il metodo comprendente inoltre somministrare un inibitore di cicloossigenasi al soggetto, in cui l'inibitore di cicloossigenasi è selezionato dal gruppo costituito da Ibuprofene, Dexibuprofene, Naproxene, Fenoprofene, Ketoprofene, Dexketoprofene, Flurbiprofene, Oxaprozin, Loxoprofene, Indometacina, Tolmetina, Sulindac, Etodolac, Ketorolac, Diclofenac, Aceclofenac, Nabumetone, Acido acetilsalicilico, Difunisal (Dolobid), Acido salicilico, Salsalato (Disalcid), Piroxicam, Meloxicam, Tenoxicam, Droxicam, Lomoxicam, Isoxicam, Acido mefenamico, Acido meclofenamico, acido Flufenamico, acido Tolfenamico, Celecoxib, Rofecoxib, Valdecoxib, Parecoxib, Lumiracoxib, Etoricoxib e Nimesulide.
5. Acido glutammico decarbossilasi per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-4, il metodo comprendente inoltre somministrare abatacept al soggetto.
6. Acido glutammico decarbossilasi per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-5, il metodo comprendente inoltre somministrare un inibitore di TNF-alfa al soggetto, in cui l'inibitore di TNF-alfa è selezionato dal gruppo costituito da Adalimumab, Certolizumab, Etanercept, Golimumab e Infliximab.
7. Acido glutammico decarbossilasi per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-6, il metodo comprendente ulteriormente somministrare vitamina D o acido gamma-ammino-butirrico al soggetto e/o esporre il soggetto a radiazioni UVB.
8. Acido glutammico decarbossilasi per l'uso secondo la rivendicazione 7, in cui la somministrazione di vitamina D e/o l'esposizione alla luce UVB, viene eseguita per un periodo da 7 a 90 giorni prima della somministrazione della composizione comprendente almeno un autoantigene di cellule beta a detto soggetto.
9. Acido glutammico decarbossilasi per l'uso secondo la rivendicazione 7 o 8, in cui il metodo

comprende la somministrazione di vitamina D in una quantità di 7000-70000 UI/settimana per 3-48 mesi.

**10.** Acido glutammico decarbossilasi per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-9, in cui l'acido glutammico decarbossilasi è formulata in idrossido di alluminio (allume).

**11.** Acido glutammico decarbossilasi per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-9, in cui il metodo comprende somministrare al soggetto una composizione comprendente una pluralità di particelle, ciascuna avente immobilizzato sulla sua superficie almeno un primo e almeno un secondo antigene, in cui il primo antigene è l'acido glutammico decarbossilasi e il secondo antigene è o un tollerogeno o un autoantigene di cellule beta, la composizione inoltre comprendendo opzionalmente adiuvanti, eccipienti, solventi e/o tamponi farmaceuticamente accettabili.

**12.** Acido glutammico decarbossilasi per l'uso secondo la rivendicazione 11, in cui l'acido glutammico decarbossilasi (GAD) è la GAD-65.

**13.** Acido glutammico decarbossilasi per l'uso secondo la rivendicazione 11 o 12, in cui il secondo antigene è un tollerogeno, come una proteina umana nativa, come la IL-10, l'albumina sierica umana o l'emoglobina; o acido gamma-ammino butirrico.

**14.** Acido glutammico decarbossilasi per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 11-13, in cui ciascuna particella ha immobilizzati sulla sua superficie 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 antigeni diversi selezionati dal gruppo costituito da tollerogeni e autoantigeni di cellule beta.

**15.** Acido glutammico decarbossilasi per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-14, in cui la malattia autoimmune è un diabete di tipo 1.

Rep. San Marino, 23 luglio 2020

Si certifica che detta traduzione è perfettamente conforme al testo originale.

Dr. Diego Pallini Gervasi

