

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 807 787**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 38/51</b>	(2006.01)
<b>A61K 39/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/592</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/593</b>	(2006.01)
<b>A61P 37/06</b>	(2006.01)
<b>A61P 3/10</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.06.2015 PCT/SE2015/050651**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.12.2015 WO15187087**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.2015 E 15802815 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 3151853**

54 Título: **Descarboxilasa de ácido glutámico (GAD) para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria**

30 Prioridad:

**04.06.2014 SE 1450678**  
**04.11.2014 SE 1451315**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**24.02.2021**

73 Titular/es:

**DIAMYD MEDICAL AB (100.0%)**  
**Kungsgatan 29**  
**111 56 Stockholm, SE**

72 Inventor/es:

**ESSEN-MÖLLER, ANDERS y**  
**LUDVIGSSON, JOHNNY**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 807 787 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Descarboxilasa de ácido glutámico (GAD) para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria

**5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere, en general, al campo de la inmunología y en particular a la inmunoterapia. Más particularmente, la presente invención se refiere a la prevención y/o el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, tales como la diabetes de tipo 1 o la diabetes autoinmunitaria. La presente invención proporciona composiciones y combinaciones que son particularmente útiles en la prevención y/o el tratamiento de dicha enfermedad. También se proporcionan métodos para terapias de combinación para el tratamiento y/o la prevención de enfermedad autoinmunitaria.

**15 Antecedentes de la invención**

El sistema de defensa inmunitario, como muchos sistemas de defensa, consiste en numerosas partes y principalmente partes interactivas. Existe el sistema innato, que se cree básicamente que reacciona mediante receptores de reconocimiento de patrones, tales como receptores del tipo toll, con antígenos (ag) microbianos bastante bien conocidos y comunes; y existe el sistema adquirido, que se puede adaptar para responder a una gran variedad de invasores extraños y además crear y mantener células de memoria que reaccionan rápidamente en el caso de que ocurran nuevos encuentros con el mismo ag.

En la enfermedad autoinmunitaria, el sistema inmunitario adaptativo reacciona comúnmente con al menos un auto-antígeno, (auto-antígeno, aag). Aunque no se entiende completamente, la autoinmunidad puede ser desencadenada de diversas formas. Los ejemplos de los posibles desencadenantes tratados incluyen, pero no se limitan a, respuestas innatas a virus, dietas, vitaminas, estrés, microbiomas, vacunas, antibióticos y otros fármacos. La disposición genética es un factor importante adicional.

En el caso de autoantígenos endógenamente producidos, éstos se procesan dentro de una célula y los péptidos de la misma se transportan a la superficie celular en asociación con moléculas del MHC-I y se presentan a diversas células que incluyen linfocitos T CD8+ intactos; linfocitos T CD8+ citotóxicos ya maduros; y/ o linfocitos T efectores de memoria CD8+. Para activar un linfocito T CD8+ intacto para que madure en un linfocito T citotóxico, se necesita una señal coestimulante secundaria asociada a CD28.

Un autoantígeno que no está dentro de una célula se recoge normalmente por una célula presentadora de antígenos (APC) tal como una célula dendrítica (DC) o macrófago, y los péptidos procesados se transportarán en asociación con moléculas de MHC-II y se presentarán a linfocitos T CD4+ intactos, maduros o de memoria. Aquí también hay una segunda señal de coestimulación que implica CD28 necesario para activar el linfocito T CD4+ intacto en una forma de linfocito T cooperador (Th). Normalmente, se tratan dos formas de linfocitos Th: Th1; Th2.

Qué tipo de linfocito Th se genera tras el encuentro entre el complejo APC-MHCII-aag y el receptor de linfocitos T CD4+ (TCR) depende de varios factores que incluyen la madurez de la DC y el medio circundante, que incluye, pero no se limita a, la disponibilidad de IL-10, en el momento de la presentación. Mientras que un linfocito Th1 secreta citocinas inflamatorias que incluyen IFN $\gamma$ , y estimula una respuesta mediada por células inflamatorias, los linfocitos Th2 normalmente secretan IL4 y estimulan una respuesta humoral donde BCs producen anticuerpos no citolíticos y neutralizantes. Los anticuerpos para el "recubrimiento" y fijación del complemento (toxicidad celular dependiente de anticuerpo) se estimulan normalmente por el sistema innato.

Cada linfocito B (BC) expresa su receptor único y específico de linfocitos B (BCR) en forma de una molécula de anticuerpo inmovilizado. Mientras que los TCs reconocen ag relacionados – como un péptido procesado en el contexto de una molécula del MHC, los linfocitos B reconocen antígenos en su forma nativa (dichos antígenos no procesados no interactúan normalmente con la activación de linfocitos T), y con la ayuda de la mayoría de la señalización de Th2 se diferencian en células plasmáticas productoras de anticuerpos de vida corta, 10 % de las cuales se cree que llegan a BCs de memoria específicos de antígenos de vida corta.

Se cree comúnmente en el campo que la insulina y las moléculas asociadas a la insulina son moléculas tempranas que están implicadas en el proceso que conduce a la diabetes autoinmunitaria que incluye diabetes de tipo 1 y diabetes autoinmunitaria latente del adulto. Se han realizado grandes ensayos clínicos y se están realizando actualmente usando diferentes formulaciones derivadas de insulina para inducir tolerancia y detener o prevenir la progresión de la enfermedad. Se han probado para el mismo fin muchas otras moléculas de antígeno de linfocitos beta y péptidos de las mismas que incluyen, pero no se limitan a, GAD65, y están siendo preparadas otras, no limitadas a la cadena B de insulina y pro-insulina y variaciones de la misma, para desarrollo clínico.

Durante el desarrollo del sistema inmunitario en el hombre, se cree que los linfocitos reactivos de auto-antígeno son clonalmente delecionados para discriminar propios de no propios. Los linfocitos T reactivos no propios se rescatan y continúan diferenciándose en linfocitos T CD4+ o CD8+ intactos, que se pueden activar tras el encuentro con su

antígeno específico. Algunos linfocitos auto-reactivos escapan, sin embargo, del proceso de delección. Más aún si el auto-antígeno es secuestrado como, por ejemplo, dentro de una célula. En el caso de la insulina, sin embargo, como un ejemplo de una molécula abundante, relativamente pocos linfocitos reactivos con insulina escapan del proceso de delección y como consecuencia existen relativamente pocos linfocitos T CD4+ o CD8+ intactos reactivos con insulina.

5 Las moléculas abundantes que existen de forma natural, tales como, por ejemplo, la insulina, no son normalmente adsorbidas y presentadas por DCs, a menos que este proceso se inicie por linfocitos T CD8+ activados y/o señalización de TLR. Por tanto, y lo que puede no haber sido observado en el campo, el proceso autoinmunitario que conduce a la diabetes se puede iniciar en muchos casos por linfocitos CD8+ intactos escapados reactivos con insulina que reconocen aag directamente asociados a la clase 1 del MHC sobre células de los órganos diana. En el caso de los genéticamente predispuestos, un timocito CD8+ intacto "escapado" reactivo con insulina puede desencadenar, por consiguiente, un proceso inflamatorio que incluye la generación de células citotóxicas CD8+ que a su vez pueden inducir citocinas que alertan al sistema innato que incluye elevar causando que los BCs produzcan anticuerpos de insulina. Algunas células beta sucumbirán y liberarán antígenos secuestrados, tales como por ejemplo GAD65, para los que existen una cantidad abundante de TCs CD4+ y CD8+ intactos. GAD65 puede tener además puntos en común con ciertas estructurales virales que estimula además la señalización de tipo TLR.

Mientras se procesa la reacción autoinmunitaria, se desarrollan mecanismos contra-inflamatorios, tales como, por ejemplo, expresión de moléculas de CTLA4 y secreción de IL-10. Puesto que en el caso de la insulina la contribución de ADC-MHCII a la enfermedad autoinmunitaria emergente es débil, dichos mecanismos de compensación inducen tolerancia a la insulina en un modo específico de autoantígenos. Sin embargo, se recogen las moléculas de GAD, las DCs procesadas y los péptidos GAD se presentan a TCs CD4+ intactas, activándolos en linfocitos T cooperadores. Así, una reacción con inmunidad transitoria a la insulina se sustituye por una reacción más robusta hacia GAD. Esto explica por qué en muchos niños pequeños genéticamente predispuestos el primer autoanticuerpo frecuentemente es contra la insulina, y por qué dichos anticuerpos desaparecen frecuentemente a medida que avanza la enfermedad.

Mocellin, Cytokine Growth Factor Rev. 2004, The multifaceted relationship between IL-10 and adaptive immunity: putting together the pieces of a puzzle, describe cómo la interleucina-10 (IL-10) es una citocina pleiotrópica que modula la función de varias células relacionadas con la inmunidad. Aunque, en general, se considera una molécula inmunosupresora, la IL-10 posee propiedades inmunoestimulantes en modelos *in vivo*. Como un ejemplo, la IL-10 localmente producida por células de los islotes pancreáticos estimulan la progresión de autoinmunidad en el ratón NOD, mientras que la administración sistémica puede tener un efecto de preservación de células beta y antiinflamatorio. Se proporciona un resumen sobre la relación entre IL-10 y enfermedades infecciosas, autoinmunidad, alergia, cáncer y trasplante que implica inmunidad adaptativa.

Russel et al., Islets. 2014, The impact of anti-inflammatory cytokines on the pancreatic  $\beta$ -cell, presentaron más recientemente evidencia de que las moléculas antiinflamatorias, tales como interleucina (IL)-4, IL-10 e IL-13, pueden ejercer una influencia directa de la función de linfocitos  $\beta$  y la viabilidad y que los niveles circulantes de estas citocinas se pueden reducir en diabetes de tipo 1 y propusieron que la selección de vías antiinflamatorias podría ofrecer potencial terapéutico en diabetes de tipo 1.

Calcinaro et al., Diabetologia. 2005, Oral probiotic administration induces interleukin-10 production and prevents spontaneous autoimmune diabetes in the non-obese diabetic mouse, llegaron a la conclusión de que la administración temprana por vía oral de bacterias probióticas previno el desarrollo de diabetes en ratones NOD y se asoció a la elevada expresión de IL-10 en el páncreas, donde se detectaron células mononucleares infiltrantes de islotes IL-10-positivas.

Van Dongen et al., 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), informan que los tumores tratados con los inhibidores de tirosina cinasas imatinib y sunitinib indujeron la secreción de IL-10 antiinflamatoria en cultivos de macrófago, que indica que el tratamiento con estos inhibidores podría contribuir a un microentorno inmunosupresor en GIST. En general, los datos revelaron GIST como un sitio activo de interacción tumor-célula inmunitaria en el que los mecanismos supresores anulan las posibles respuestas antitumorales. Los inhibidores de tirosina cinasas podrían promover este equilibrio negativo.

Louvet et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2008, Tyrosine kinase inhibitors reverse type 1 diabetes in nonobese diabetic mice, informan cómo los inhibidores de tirosina cinasas (TK) ofrecen oportunidades para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias. El tratamiento con imatinib (Gleevec) previno y revirtió T1D en ratones NOD. Se observaron resultados similares con sunitinib (Sutent). Otro inhibidor de TK, PLX647, solo mostró eficacia marginal, mientras que una forma soluble del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), PDGFRbeta1g, invirtió rápidamente la diabetes. El tratamiento con imatinib condujo a remisión duradera y eficacia a largo plazo y es probable que la tolerancia dependa de inhibir una combinación de tirosina cinasas que respaldan el uso de inhibidores selectivos de cinasas para el tratamiento de T1D.

Agostino et al., 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, describen cómo los inhibidores de tirosina cinasas (TKIs) influyeron en las concentraciones de glucosa en sangre (BG) en pacientes tratados con dasatinib, imatinib, sorafenib y sunitinib. Todos mostraron disminuciones significativas en BG. Aunque el mecanismo para el efecto hipoglucémico de estos fármacos no está claro, c-kit y PDGFR $\beta$  fueron cinasas diana comunes.

Adorini, Ann N Y Acad Sci. 2003, Tolerogenic dendritic cells induced by vitamin D receptor ligands enhance regulatory T cells inhibiting autoimmune diabetes, informan que la 1,25-dihidroxitamina D(3) induce DCs con un fenotipo tolerogénico, caracterizada por una disminución de la expresión de moléculas coestimulantes CD40, CD80 y CD86, baja secreción de IL-12 y potenciada de IL-10. El tratamiento con 1,25-(OH)(2)D(3) indujo tolerancia a los aloinjertos de islotes de ratón asociados a desarrollo alterado de células CD4(+) y CD8(+) de tipo 1 y un aumento del porcentaje de células reguladoras CD4(+)CD25(+) y también inhibió el desarrollo de diabetes a dosis no hipercalcémicas, que sugiere la vitamina D como un enfoque para el tratamiento de diabetes de tipo 1.

Heine et al., Eur J Immunol. 2008, 1,25-dihydroxyvitamin D(3) promotes IL-10 production in human B cells, informan que la 1,25-dihidroxitamina D(3) (calcitriol) inhibe la expresión de IgE por linfocitos B y potencia la expresión de IL-10 por células dendríticas y linfocitos T. El enlace molecular en linfocitos B activados entre la señalización de vitamina D, expresión de IL-10 y su capacidad para producir calcitriol de su precursor sugieren que la 25-hidroxitamina D(3) se puede usar como un modulador de las respuestas inmunitarias.

Niirio et al., Biochem Biophys Res Commun. 1998, MAP kinase pathways as a route for regulatory mechanisms of IL-10 and IL-4 which inhibit COX-2 expression in human monocytes, describen cómo las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPKs) se activan y desempeñan una función importante en la regulación de la expresión de moléculas pro-inflamatorias en monocitos/macrófagos. Los monocitos humanos estimulados por lipopolisacárido (LPS) inducen la expresión de la proteína COX-2 y de ARNm de COX-2, así como la proteína cinasa regulada por señales (ERK)2 y p38 MAPK en monocitos. La inducción de ARNm de COX-2, proteína COX-2 y prostaglandina (PGE)2 por LPS se inhibió por los inhibidores específicos de ERK y p38 MAPK. La interleucina (IL)-10 inhibió similarmente la expresión de COX-2. La fosforilación inducida por LPS y la activación de ERK2 y p38 MAPK fueron significativamente inhibidas por IL-10, que sugiere que la inhibición por IL-10 de la expresión inducida por LPS de moléculas proinflamatorias se podría atribuir a los efectos reguladores de ambas citocinas tras la activación de MAPK.

Obermajer et al., Blood. 2011, Positive feedback between PGE2 and COX2 redirects the differentiation of human dendritic cells toward stable myeloid-derived suppressor cells, describen cómo las células dendríticas (DCs) y las células supresoras derivadas de mieloides (MDSCs) muestran funciones opuestas en el sistema inmunitario.

La ciclooxigenasa 2 (COX2) es el regulador clave de la síntesis de PGE(2) y un factor determinante en el redireccionamiento del desarrollo de DCs CD1a(+) a MDSCs monocíticas CD14(+)CD33(+)CD34(+). PGE(2) exógeno y dichos diversos activadores de COX2 como lipopolisacárido, IL-1 $\beta$  e IFN $\gamma$  inducen la expresión de monocitos de COX2, bloqueando su diferenciación en DCs CD1a(+) e induciendo PGE(2) endógeno, IDO1, IL-4R $\alpha$ , NOS2 e IL-10, factores supresores típicos asociados a MDSC. La alteración de la retroalimentación de COX2-PGE(2) usando inhibidores de COX2 o antagonistas de EP2 y EP4 suprime la producción de factores supresores típicos asociados a MDSC y la función inhibidora de CTL de MDSCs completamente desarrolladas de pacientes con cáncer. La función central de la retroalimentación de COX2-PGE(2) en la inducción y persistencia de MDSCs subraya las posibilidades de su manipulación para potenciar o suprimir respuestas inmunitarias en cáncer, autoinmunidad o trasplante.

Lieb, Med Hypotheses. 2007, Antidepressants, prostaglandins and the prevention and treatment of cancer, informan que un supuesto mecanismo de carcinogénesis es la regulación por incremento de ciclooxigenasa, la síntesis y expresión de oncogenes, activación viral, alteración de señales, fallo de la apoptosis, inicio y promoción del tumor, angiogénesis, metástasis, inmunosupresión, actividad de telomerasa y autoinmunidad. Todos están regulados por prostaglandinas. Se ha documentado regresión observable y radiográfica del cáncer en pacientes que toman fármacos no esteroideos anti-prostaglandinas tales como indometacina e ibuprofeno.

Kim, et al., Immune Netw. 2010, Cyclooxygenase Inhibitors, Aspirin and Ibuprofen, Inhibit MHC-restricted Antigen Presentation in Dendritic Cells, informan que los AINEs tiene efectos inmunomoduladores sobre los linfocitos T y B y que el ibuprofeno inhibe la presentación de antígeno restringida a la clase I y a la clase II del MHC en células dendríticas (DCs). El ibuprofeno no inhibió la actividad fagocítica de DCs, el nivel de expresión de moléculas totales de MHC y moléculas coestimulantes en DCs. El ibuprofeno más bien aumentó el nivel de expresión de moléculas de MHC total y moléculas coestimulantes en DCs. Los resultados demuestran que el ibuprofeno inhibe el procesamiento intracelular del antígeno fagocitado, y sugieren que la administración prolongada de AINEs a altas dosis puede alterar la capacidad de las DCs para presentar antígenos en asociación con moléculas del MHC.

Gribben et al., Immunology 1994, CTLA4 mediates antigen-specific apoptosis of human T cells, describen cómo la molécula CTLA4 es una molécula restringida a linfocitos T inducida por la activación de TCR o CD28. Durante una respuesta inmunitaria en curso, existe un equilibrio entre señales proinflamatorias y no proinflamatorias. La

5 reticulación de CD28 o la región de unión común de CD28/CTLA4 por mabs o los ligandos naturales B7-1 y 2 proporciona una señal coestimulante positiva que da como resultado la regulación por incremento proinflamatoria de IL-2. De hecho, la reticulación de CTLA4 puede proporcionar una débil señal coestimulante a CD28. Después de la activación de linfocitos T CD28, la expresión se regula por disminución y CTLA4 se reguló por incremento. A dichos tiempos, la reticulación de CTLA4 en ausencia de coestimulación de CD28 puede inducir la delección de linfocitos T previamente activados, que indica que CTLA4 puede tanto estimular como inducir la delección dependiendo del estado de activación del linfocito T.

10 Posadas et al., *Clinical Immunology* 2009, Abatacept in the treatment of rheumatoid arthritis, describen que en la artritis reumatoide (AR), los linfocitos T y varias otras células que incluyen células dendríticas DCs, macrófagos y fibroblastos expresan marcadores de activación tales como CD28 y antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA4). En los linfocitos T intactos de sangre periférica se necesitan dos señales para llegar a ser activadas a su potencial funcional completo: i) un antígeno en el contexto de una molécula de MHC en la célula presentadora de antígenos (APC) presentada al receptor de linfocitos T (TCR) específicos de antígeno correspondientes sobre el linfocito T; y ii) 15 ligación de CD28 en el linfocito T con CD80/86 en APCs. La estimulación de linfocitos T intactos por antígeno relacionado sin coestimulación da como resultado la anergia de linfocitos T, mientras que la ligación de moléculas coestimulantes en los linfocitos T en ausencia de antígeno relacionado no tiene efecto sobre el linfocito T.

20 Una de las moléculas superficiales que están reguladas por incremento sobre el linfocito T activado después de la estimulación satisfactoria con las dos señales es CTLA4. Se une a CD80/86 con mayor avidéz que CD28. Esto no solo bloquea la unión de CD28, sino que CTLA4 también induce señales inhibitoras en el linfocito T recién activado.

25 Abatacept (una CTLA4-inmunoglobulina modificada en Fc) es una proteína de fusión inmunomoduladora que empobrece en linfocitos T, que consiste en la porción extracelular de CTLA4 humana y la cadena pesada de IgG1 humana. Bloquea la señal coestimulante implicada en la activación de linfocitos T intactos. Su ligación con CD80/86 sobre APCs también puede interferir y reducir la IL-6 inducida por CD80/86, que puede regular por disminución las citocinas inflamatorias, tales como IL-1beta, IFNgamma e IL-17. La ligación adicional de abatacept con CD80/86 puede inducir la indolamina dioxigenasa (IDO) en APCs, que a su vez puede inducir la anergia en linfocitos T, así como regular por disminución la activación paracrina de linfocitos T intactos por linfocitos T activados. 30

Se han presentado opiniones contradictorias con respecto a la capacidad de abatacept para influir en el recuerdo, reestimulación, linfocitos T CD4+ de memoria. CD80/86 expresado sobre linfocitos B todavía puede ser una vía adicional donde abatacept puede llevar a cabo una función inmunomoduladora.

35 Patakas et al., *Resumen N° 723 ACR/ARHP, 2013*, Abatacept is Highly Effective At Inhibiting T cell Priming and Induces a Unique Transcriptional Profile In CD4+ T Cells, mostró como la sensibilización sc con ovoalbúmina en presencia de abatacept produjo grandes cantidades de IL-2, pareciéndose así a linfocitos T intactos expuestos al antígeno por primera vez. Estas células de linfocitos T incluyeron menos linfocitos Tregs y T CD4+ que otras poblaciones de linfocitos T (no sensibilizados o intactos), y su estado se acompañó por una inhibición de la 40 activación de células dendríticas al nivel transcripcional. Patakas llegó a la conclusión de que mientras que abatacept modulaba significativamente la comunicación T-DC dando como resultado la sensibilización de las células defectuosas, esto es distinto de la tolerancia anérgica.

45 Orban et al., *Lancet* 2011, Co-stimulation modulation with abatacept in patients with recent-onset type 1 diabetes: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial, informan que abatacept preserva significativamente la secreción de insulina endógena como se mide por el péptido C estimulado, durante los 6 meses iniciales en comparación con el placebo, luego disminuye en paralelo con el grupo de placebo. Se cree que el efecto beneficioso temprano es debido a que abatacept bloquea la señal coestimulante B80/86-CD28, previniendo la activación de linfocitos T intactos. Se especuló que la disminución sucesiva después de 6 meses en la función de células beta era debida a 50 que la activación continua de linfocitos T disminuyó a medida que progresó la enfermedad.

Aunque Orban menciona que la activación de linfocitos T intactos necesita dos señales, mientras que una está comprendida por un antígeno presentado en el contexto de una molécula del MHC sobre una APC; y la otra es una señal coestimulante que implica a la molécula CD28 sobre el linfocito T, no se usó antígeno específico en el ensayo. 55 Esto puede ser motivo de especulación, que mientras que abatacept previene inicialmente y satisfactoriamente la activación de linfocitos T intactos en linfocitos T citotóxicos, esto se puede contrarrestar con el tiempo y/o compensar con otras partes del sistema inmunitario, tales como, por ejemplo, elevada secreción de IL-2, y cuando esto ha ocurrido, se pierde la ventana para inducir la tolerancia a un antígeno específico.

60 Orban et al., *Diabetes Care* 2013, Costimulation Modulation With Abatacept in Patients With Recent-Onset Type 1 Diabetes: Follow-up 1 Year After Cessation of Treatment posteriormente, informaron del efecto beneficioso continuado un año después del cese de la administración de fármacos, aunque disminuyeron las diferencias entre el grupo activo y el placebo. Así, 35 % de pacientes en el grupo activo tienen un péptido C estimulado pico - >0,2 nmol/l en comparación con 30 % para los sujetos de placebo 36 meses después del comienzo del tratamiento. 65 Se señaló que hubo una ausencia de efecto con el tratamiento con abatacept en pacientes DR3-negativos.

Los dos estudios de Orban mencionados anteriormente indican que la regulación inmunitaria de abatacept como terapia independiente en pacientes con diabetes de tipo 1 de aparición reciente no es suficiente para tener un efecto duradero de la preservación de la función de células beta.

- 5 Verhagen et al., PLOS 2014, CTLA-4 Modulates the Differentiation of Inducible Foxp3+ Treg Cells but IL-10 Mediates Their Function in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, llegan a la conclusión de que la presencia de IL-10 es un factor importante para potenciar el efecto supresor de Tregs.

10 GAD65 (la isoforma de 65 kd de la descarboxilasa de ácido glutámico), es un auto-antígeno importante de células beta, como se produce en los islotes con elevada liberación como respuesta a la estimulación de células beta. Se ha mostrado que esta proteína influye profundamente en el proceso autoinmunitario inmunitario. Numerosos estudios han mostrado que GAD puede prevenir la diabetes en animales experimentales. La similitud de GAD con proteínas virales puede ser importante para la acción terapéutica. El efecto observado, incluso después del comienzo del proceso inmunitario, sugiere que podría ser posible esperar el mismo efecto en seres humanos. Se formuló GAD  
 15 recombinante en hidróxido de aluminio (alumbre) y en un estudio de fase II en pacientes con LADA, la administración de una baja dosis, Diamyd 20 µg, condujo a la mejoría de la función de células beta durante hasta 2 años en comparación con el grupo tratado con placebo, sin efectos secundarios. También se probaron otras dosis: 4 µg no mostraron efecto, 100 µg mostraron un efecto similar a 20 µg, mientras que 500 µg no mostraron efecto. Se encontró asociación con cambio en la relación de células CD4+CD25+/ CD4- CD25-, que indica un mecanismo para el efecto. Con estos antecedentes, se realizó un estudio de fase II en pacientes con diabetes de tipo 1 de aparición reciente de 10-18 años. Los pacientes se aleatorizaron a cualquiera de 20 µg de GAD-alumbre (Diamyd) sc en el Día 1 y 30, o placebo. El efecto fue sorprendente aún después de 30 meses, y claramente significativo tanto estadística como clínicamente, con aproximadamente la mitad de la disminución del péptido C en el grupo tratado con GAD en comparación con el grupo de placebo. Los pacientes con una duración de la diabetes < 3 meses tuvieron un efecto  
 20 sorprendentemente bueno sin disminución o disminución mínima de la función de células beta durante el seguimiento de los primeros 15 meses. Aún después de 48 meses, los pacientes tratados con < 6 meses de duración tuvieron péptido C significativamente preservado y sin acontecimientos adversos.

30 Posteriormente, se iniciaron ensayos de fase III en europeos en los EE. UU. En el ensayo europeo se reclutaron 334 pacientes en tres grupos, un grupo con GAD-alumbre (Diamyd) 20 µg en el Día 1, 30, 90 y 270, otro grupo con GAD-alumbre 20 µg en el Día 1 y 30, y placebo en el Día 90 y 270 y un tercer grupo con placebo en el Día 1, 30, 90 y 270. Aunque se observó una tendencia positiva (16 % de eficacia, p=0,1), no se cumplió el criterio de evaluación principal, ABC de péptido C en suero después de una prueba de tolerancia a alimentos mixtos (MMTT) en 15 meses. Esto dio lugar al cierre prematuro de los ensayos de fase III. Sin embargo, el ensayo europeo de fase III mostró  
 35 eficacia estadísticamente significativa en algunos subgrupos previamente especificados. Además, 45 pacientes suecos habían pasado la visita de 30 meses cuando se detuvo el estudio, y los 15 pacientes que habían recibido dos dosis de GAD-alumbre (Diamyd) 20 µg mostraron una preservación significativa de péptido C después de 30 meses en comparación con el placebo. Se observó que estos pacientes suecos fueron aquellos sin eficacia a los 15 meses, mientras se encontró la eficacia a los 15 meses en los pacientes no nórdicos. Se llegó a la conclusión de que mientras que era parcialmente eficaz, GAD-alumbre puede necesitar ser combinado con otros compuestos para llegar a ser parte de una asignación de tratamiento clínicamente eficaz para diabetes de tipo 1.

45 Denes et al., Diabetes Technol Ther. 2010, Autoantigens plus interleukin-10 suppress diabetes autoimmunity, informaron que mientras que cepas del virus recombinante de la variolovacuna (rVV) que expresan la subunidad B de la toxina del cólera inmunomoduladora (CTB) fusionada con un fragmento del autoantígeno descarboxilasa de ácido glutámico (GAD65) o la citocina inmunosupresora interleucina-10 (IL-10) fueron independientemente capaces de generar solo bajos niveles de supresión inmunitaria de diabetes mellitus de tipo 1 (T1DM) en el ratón NOD, una combinación mediada por el virus de la variolovacuna (VV) de la fusión CTB::GAD y proteínas IL-10 mostró que era una estrategia inmunoterapéutica más eficaz y duradera para T1DM.

50 Robert et al., Diabetes. 2014, Oral delivery of glutamic acid decarboxylase (GAD)-65 and IL10 by Lactococcus lactis reverses diabetes in recent-onset NOD mice, mostraron más recientemente que la administración oral de bacterias *Lactococcus lactis* (LL) vivas para la secreción de controlada del autoantígeno de T1D el péptido GAD65370-575 y la citocina antiinflamatoria interleucina-10, en combinación con anti-CD3 de baja dosis de corta duración, preservó la masa de células β funcionales en ratones NOD de aparición reciente.

55 Skyler et al., Diabetes 2011, Stopping Type 1 Diabetes, Attempts to Prevent or Cure Type 1 Diabetes in Man, un régimen de combinación que implica un modulador inmunitario y una terapia específica de antígeno proporciona una lógica para un tratamiento de larga duración de T1D.

60 Staeva et al., DIABETES, VOL. 62, ENERO de 2013, Recent Lessons Learned from Prevention and Recent-Onset Type 1 Diabetes Immunotherapy Trials, informan el estado de la técnica del pensamiento actual y recomiendan evaluar terapias de combinación que incluyen auto-antígenos y compuestos antiinflamatorios.

65 Skyler, DIABETES TECHNOLOGY & THERAPEUTICS, Volumen 16, Suplemento 1, 2014, Immune Intervention for Type 1 Diabetes, 2012-2013, revisa ensayos recientes en el campo.

Rigby et al., Current Opinion Endocrinol Diabetes Obes 2014, 21:271-278, Targeted immune interventions for type 1 diabetes: not as easy as it looks! describen muchos de los esfuerzos para combatir la diabetes autoinmunitaria y llegan a la conclusión de que a pesar de casi una docena de ensayos con muchos cientos de participantes, no se ha encontrado monoterapia y que: a) diferentes subpoblaciones de pacientes con T1D parecen responder de forma diferente a intervenciones inmunitarias, sugiriendo una heterogeneidad significativa; b) una terapia eficaz debe combinar la inhibición de linfocitos Tef (por empobrecimiento, supresibilidad potenciada, o ambos), con la estimulación de Tregs (por elevada frecuencia o función, que incluye ablación del medio proinflamatorio); y esto puede requerir combinaciones que comprenden un agente que empobrece Tef, un agente de refuerzo de Treg y un antígeno.

Como se referenció anteriormente, varias monoterapias y pautas combinadas que incluyen una variedad de compuestos han mostrado efectos prometedores en la prevención y el tratamiento de diabetes autoinmunitaria en el modelo de ratón. Sin embargo, la transferencia de dichas pautas al hombre ha fallado todas en mostrar un efecto clínicamente significativo. Así, sigue existiendo una necesidad formidable de aliviar sociedades y pacientes de la devastadora enfermedad de la diabetes autoinmunitaria y sus complicaciones a largo plazo. Es un objeto de la presente invención desvelar métodos y composiciones para la prevención y el tratamiento del componente autoinmunitario de T1D y LADA, allanando el camino para el aumento endógeno, o por realizado por otros métodos, de la masa funcional de células beta.

## Sumario de la invención

La presente invención se refiere a descarboxilasa de ácido glutámico (GAD) para su uso en un método para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria seleccionada de diabetes de tipo 1, diabetes autoinmunitaria y diabetes autoinmunitaria latente, que comprende administrar a un sujeto una composición, comprendiendo dicha composición la descarboxilasa de ácido glutámico, por inyección directamente en un ganglio linfático.

Realizaciones preferidas de la invención se explican en las reivindicaciones dependientes.

## Definiciones

Todos los términos y las expresiones que se usan en el presente documento pretenden tener el significado que le ha dado el experto en la técnica en la fecha de presentación de la presente solicitud, a menos que cualquier otra expresión sea evidente del contexto de la presente divulgación. Sin embargo, en aras de claridad, algunos términos y expresiones se definen explícitamente a continuación.

Un "autoantígeno" o "auto-antígeno" es un constituyente de tejido endógeno que tiene la capacidad de interactuar con autoanticuerpos y provocar una respuesta inmunitaria. Un "autoantígeno de células beta" es un autoantígeno que se origina de células beta pancreáticas.

Un "autoanticuerpo" es un anticuerpo que reacciona con autoantígenos del organismo que los produce.

El término "vitamina D" incluye vitamina D<sub>2</sub> y vitamina D<sub>3</sub>. "Análogos de vitamina D" incluyen sin perjuicio ergocalciferol, dihidrotaquisterol, alfacalcidol, calcitriol, colecalciferol y calcifediol, y combinaciones de los mismos, así como cualquier otro análogo de vitamina D clasificado en el grupo A11CC del Sistema de Clasificación Anatómica, Terapéutica y Química.

El término "inhibidores de la ciclooxigenasa", o "inhibidor de la cox", se refiere a compuestos que se combinan con ciclooxigenasa y así previenen su combinación sustrato-enzima con ácido araquidónico y la formación de eicosanoides, prostaglandinas y tromboxanos. Un subgrupo de inhibidores de la ciclooxigenasa es los inhibidores de la ciclooxigenasa-2, que tienen especificidad por la ciclooxigenasa-2.

El término "inhibidor de TNF alfa" se refiere a compuestos que inhiben la acción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF alfa), e incluyen adalimumab, certolizumab, etanercept, golimumab, infliximab, así como cualquier otro compuesto clasificado en el grupo L04AB del Sistema de Clasificación Anatómica, Terapéutica y Química.

Un "epítipo" es la porción superficial de un antígeno capaz de provocar una respuesta inmunitaria y de combinarse con el anticuerpo producido para contrarrestar esa respuesta, o un receptor de linfocitos T.

El término "análogos de ácido gamma-aminobutírico" incluye vigabatrina y baclofeno.

Las expresiones que usan el singular "un", "una" y similares se deben interpretar como que incluyen el plural.

Como se usa en el presente documento, "coadministración" se refiere a administrar los compuestos del régimen de la presente invención de manera que se solapen sus pautas posológicas. No necesitan ser administrados al mismo tiempo.

La abreviatura "T1D" representa "diabetes de tipo 1".

### Descripción detallada de la invención

5 En el momento en el que un primer autoanticuerpo contra la insulina aparece en un individuo genéticamente predispuesto, tal como, por ejemplo, pero no se limita a, un individuo de haplotipo DR3 y no se detectan otros autoanticuerpos, esto puede significar que TCs CD8+ y CD4+ reactivos con GAD no han sido todavía activados, que ofrece una ventana de oportunidad para detener completamente la enfermedad con inhibidores antiinflamatorios y/o de diferenciación de linfocitos solos sin el uso de un antígeno de células beta, ya que es probable que la autoinmunidad a la insulina sea auto-eliminada contrarrestando los mecanismos. En esta situación con algunos linfocitos T cooperadores CD4+ activados reactivados con GAD, si las hay, aún producidas, es importante dirigir la activación lejos del tipo Th1 pro-inflamatorio. En los individuos positivos para anticuerpos GAD y/o pacientes con diabetes, se puede añadir GAD y otros antígenos de células beta formuladas en alumbre, normalmente considerado un adyuvante impulsor de Th2, para fines de tolerización específica de antígenos. Mientras que esto puede producir más linfocitos Th2 y Tregs que células pro-inflamatorias, varios factores que incluyen factores ambientales internos pueden invalidar los efectos tolerizantes. Por tanto, puede no ser suficiente usar formulaciones impulsoras de Th2 de autoantígenos como monoterapias y la presente invención desvela composiciones y pautas combinadas para potenciar los protocolos de tolerización de las células beta.

20 Intentos previos para inducir la regulación inmunitaria en enfermedades autoinmunitarias administrando monoterapias tales como GAD y antígenos de insulina; compuestos antiinflamatorios tales como anticuerpos contra CD3, CD20; timoglobulina, abatacept, alefacept o inhibidores de TNFalfa tales como etanercept, han mostrado cierta eficacia, pero la duración de estos efectos o su eficacia después de la presentación de la enfermedad son limitaciones para llevar estos enfoques a la clínica. La presente invención desvela una estrategia novedosa para el tratamiento y la prevención de enfermedades autoinmunitarias en DCs impuestas por Vit D que actúan sinérgicamente con autoantígeno y antiinflamatorios para proporcionar diversos grados de efecto.

25 Así, la presente invención proporciona medios (por ejemplo, métodos, composiciones y combinaciones) para la prevención y/o el tratamiento de diabetes de tipo 1, diabetes autoinmunitaria y diabetes autoinmunitaria latente.

30 La presente invención utiliza el conocimiento de que la vitamina D (Vit D) impone que las células dendríticas inmaduras (DCs) sean más tolerogénicas, que hasta la fecha no se ha demostrado que sea suficiente para alterar el curso de cualquier enfermedad autoinmunitaria, y combina la administración de Vit D con la administración de un auto-antígeno, asociado a dicha enfermedad autoinmunitaria, en un modo oportuno, imponiendo así la inmunomodulación tolerogénica del auto-antígeno administrado.

35 Para potenciar adicionalmente el medio tolerogénico en el que las DCs presentan auto-antígenos al sistema inmunitario en un sujeto con concentración adecuada de Vit D en suero, la presente invención desvela el hallazgo que una pauta combinada que usa un compuesto antiinflamatorio común junto con un autoantígeno es adecuada para el tratamiento y la prevención de T1D.

40 Más allá de sus posibles efectos sinérgicos, otra ventaja de la coadministración de los compuestos de la presente invención se refiere al problema de que los trastornos autoinmunitarios frecuentemente incluyen respuestas autoinmunitarias contra múltiples auto-antígenos. Puede ser difícil intentar anergizar o deleccionar todos los linfocitos autoagresivos usando tolerización directa específica de antígeno con todos sus antígenos relacionados, debido a que todos los antígenos relacionados pueden no ser conocidos. Por ejemplo, se cree que la diabetes de tipo 1 (T1D) se provoca por linfocitos autoagresivos que entran en los islotes de Langerhans, donde destruyen las células beta. Es probable que la activación de dichas células sea multifactorial, que implica una predisposición genética, desencadenantes medioambientales tales como virus y quizás daño al páncreas (células de los islotes), por ejemplo provocado por una reacción pro-inflamatoria local.

45 Puesto que el proceso autoagresivo es normalmente bastante avanzado cuando se identifican individuos humanos pre-diabéticos por cribado para anticuerpos contra células de los islotes, se puede asumir que respuestas agresivas a más de un antígeno de los islotes estarán en desarrollo durante esta etapa de la enfermedad. Además, no se considera una opción la supresión inmunitaria sistémica no específica crónica, puesto que la diabetes afecta frecuentemente a los individuos jóvenes y la inmunosupresión para toda la vida está asociada con efectos secundarios que son inaceptables comparados con incluso la terapia con insulina sola.

50 Por tanto, es muy deseable una intervención curativa de base inmunitaria con especificidad y bajos efectos secundarios sistémicos. Los presentes métodos evitan el problema de múltiples dianas auto-antigénicas, debido a que la coadministración de los compuestos de la presente invención puede ser suficiente para restablecer la tolerancia a múltiples auto-antígenos que son dianas en un trastorno autoinmunitario.

55 Los presentes métodos también evitan los problemas de inmunosupresión sistémica no específica crónica, debido a que la coadministración de los compuestos de la presente invención puede restablecer la tolerancia a largo plazo sin la necesidad de la administración continua de por vida.

Sin desear quedar ligado a teoría, la invención proporciona que la coadministración de los compuestos de la invención tiene el potencial de establecer sinérgicamente la tolerancia a largo plazo, induciendo en parte la activación / expansión de linfocitos T reguladores (y también células presentadoras de antígenos (APCs) reguladoras).

5 Se han descrito varios fenotipos diferentes de linfocitos T reguladores. Pueden surgir después de la timectomía y se pueden inducir después de la inmunomodulación sistémica. Sus funciones efectoras no son completamente conocidas. Parecen ser parte del equilibrio intrínseco del sistema inmunitario y su pérdida da como resultado la intensa desregulación inmunitaria y autoinmunidad. Se han descrito reguladores de tipo Th2 con especificidad  
10 definida por antígenos. Se cree que actúan de supresores colaterales y surgen después de la inmunización específica de antígeno. Homann et al., J. Immunol. (1999) 163:1833-8. Dependiendo de su función efectora se han denominado Th3 (productores de TGF-beta). Estas células son linfocitos específicos de antígeno con funciones efectoras especializadas y no se comportan como linfocitos Th2. Por tanto, puede ser erróneo aplicar el denominado  
15 paradigma Th1/Th2 a estas células.

La supresión colateral se refiere al fenómeno de diseminación antigénica. Se cree que la diseminación antigénica es un componente esencial durante la progresión de los procesos autoinmunitarios locales. Por tanto, se puede suponer que cuando los pacientes tienen varios autoanticuerpos, la respuesta autoagresiva puede implicar muchos auto-antígenos (o "autoantígenos"). Puesto que la mayoría de los autoantígenos no se podría identificar para un trastorno autoinmunitario particular, no es posible tolerizar cada especificidad autoagresiva con una pauta terapéutica que implicara el conocimiento del elemento de restricción del MHC respectivo y péptido. La inducción de células reguladoras por los presentes métodos tiene varias ventajas en esta situación. Se conoce, por ejemplo, que los linfocitos T reguladores en T1D pueden actuar localmente en los ganglios linfáticos e islotes como supresores colaterales, que significa que pueden suprimir los linfocitos agresivos con otras especificidades auto-antigénicas.  
20 Esto puede ocurrir modulando células presentadoras de antígenos (APCs), por ejemplo, por secreción de citocinas con función moduladora inmunitaria. Así, dichos linfocitos reguladores T de supresores colaterales pueden amortiguar la autoagresión a varios otros autoantígenos sin conocer su especificidad precisa.

La presencia de un primer autoanticuerpo contra un 1º antígeno abundante o auto-antígeno, tal como por ejemplo insulina en un individuo genéticamente predispuesto, mientras que no se detectan autoanticuerpos contra al menos uno o más 2º auto-antígeno(s) secuestrados (menos abundantes), puede ofrecer una ventana de oportunidad para detener un posible proceso de enfermedad emergente en sus trayectorias usando medios antiinflamatorios y/o inhibidores de la diferenciación de linfocitos solos. De hecho, como la respuesta inflamatoria a dicho 1º auto-antígeno débil puede ser alimentada por relativamente pocos, del proceso de delección clonal en linfocitos T (TCs) CD8+ y CD4+ autorreactivos específicos de insulina escapados del timo, la inflamación puede disminuir y dicho 1º antígeno se puede usar en algunas realizaciones como un tolerógeno que induce tolerancia a otros autoantígenos, quizás más secuestrados o poco comunes, para los que están disponibles para la activación más linfocitos T (TCs) CD8+ y CD4+ autorreactivos intactos escapados.

En situaciones donde la autoinmunidad se ha disparado a autoantígenos más potentes tales como, por ejemplo, GAD65 en el caso de diabetes autoinmunitaria, y que es capaz de impulsar el proceso de enfermedad, puede no ser suficiente usar medios antiinflamatorios y/o inhibidores de la diferenciación de linfocitos solos, sin el uso de dichos potentes autoantígenos para la inducción de tolerización activa. Por otra parte, el uso de un potente autoantígeno solo, por ejemplo GAD65, formulado en un adyuvante tal como hidróxido de aluminio (aquí "alumbre"), normalmente considerado un adyuvante impulsor de Th2, puede dar como resultado la activación de no solo componentes reguladores, sino también de moléculas y células proinflamatorias y/o citotóxicas, no limitadas a moléculas que pertenecen al sistema inmunitario innato, macrófagos, células dendríticas, linfocitos B (BCs), linfocitos T (TCs) u otros factores que incluyen factores ambientales que pueden contribuir a contrarrestar la tolerización. Además, se pueden usar otras formulaciones de adyuvante menos impulsoras de Th2, tales como solución salina o albúmina de suero humano. Por tanto, puede ser suficiente usar formulaciones de autoantígenos individuales como monoterapias y la presente invención desvela composiciones y métodos que usan al menos dos autoantígenos para potenciar el efecto de tolerización específico de autoantígenos administrados formulados en alumbre, solución salina o albúmina de suero humano.

La presente invención proporciona en un aspecto al menos una composición farmacéutica que comprende al menos un antígeno. La al menos una composición farmacéutica según la invención puede comprender, por tanto, en algunas realizaciones al menos dos antígenos. Según ciertas otras realizaciones, la al menos una composición comprende al menos tres autoantígenos. Según ciertas otras realizaciones, la al menos una composición comprende al menos cuatro autoantígenos. Según ciertas otras realizaciones, los antígenos se pueden formular en composiciones separadas. Lo más preferido es que todos los antígenos según la invención se formulen en la misma composición. En algunas realizaciones, todos los antígenos son autoantígenos, en algunas otras realizaciones algunos o todos los antígenos son antígenos (tolerógenos) a los que el sistema inmunitario ha desarrollado una respuesta reguladora y así son capaces de influir en la reacción con otros autoantígenos de una forma tolerante.

Es un objeto de la presente invención desvelar composiciones, pautas y métodos que permitan la inducción de tolerancia a estructuras propias que son atacadas en la enfermedad autoinmunitaria. En una realización específica,

al menos dos antígenos están asociados con una partícula de vehículo, exponiendo así una célula inmunitaria del sistema inmunitario adaptativo a al menos dos antígenos con diversas influencias en dicha célula inmunitaria, dando como resultado una respuesta modificada a la estructura propia sometida al ataque autoinmunitario.

5 Por adsorción, unión o recubrimiento de un antígeno de proteína o péptido a una partícula de vehículo con la que reacciona el sistema inmunitario, e insertando las partículas en tejido humano por, por ejemplo, inyección subcutánea, la proteína o péptido pueden ser modificados para ingestión por el sistema inmunitario. Probablemente, esta ingestión se realiza por células dendríticas o macrófagos (células presentadoras de antígenos, APCs). Algunas de las proteínas o péptidos ingeridos en este proceso se presentarán al sistema inmunitario adaptativo por las proteínas del HLA (MHC) y seguirá una reacción inmunitaria adaptativa. La respuesta adaptativa se influirá por los niveles de actividad del sistema inmunitario innato, y por respuestas inmunitarias que existen hacia cualquier antígeno que se presenta por las proteínas HLA en el proceso. Estas proteínas de influencia pueden ser los péptidos o proteínas unidos a partículas, o proteínas nativas, autoantígenos o tolerógenos (antígenos con los que el sistema inmunitario reacciona de una forma tolerogénica) que son ingeridos y presentados en el mismo proceso. Si estas proteínas son ingeridas por la misma célula inmunitaria, se presentarán juntas por las proteínas HLA sobre la superficie celular.

La presentación de péptidos no nativos al sistema inmunitario puede ser de carácter Th2 por influencia de señales del sistema inmunitario innato en respuesta a la rotura de tejido. Antígenos endógenos que incluyen autoanticuerpos y nucleótidos de ARN, etc., pueden hacer lo mismo. Una proteína nativa, o una proteína a la que ya existe una respuesta, ocasionará señalización por las células inmunitarias adaptativas, que influirán en la respuesta inmunitaria total, y podrían activar señales tolerogénicas o una reacción Th1 preexistente. Si la señalización inducida por un procedimiento de inyección y por la interacción de células inmunitarias intactas y células inmunitarias presentadoras de antígeno es más fuerte que la respuesta preexistente, se formará una nueva respuesta inmunitaria que incluye memoria.

Si se inyectan e ingieren una combinación de proteínas que descansan sobre los mismos vehículos en partículas y presentados por la misma APC, los efectos serán aditivos por expansión del número de posibles células inmunitarias adaptativas con las que interaccionan, que conduce a un aumento de la probabilidad de formar una reacción inmunitaria novedosa, a pesar de una posible reacción preexistente con una de las proteínas.

Si se inyecta un autoantígeno de proteína junto con otra proteína (nativa o extraña) sobre el mismo vehículo en partículas al que ya existe una respuesta inmunitaria, la respuesta inmunitaria al antígeno estará ampliamente influida por la respuesta que el sistema inmunitario ya ha establecido a los antígenos adjuntos. Si los antígenos adjuntos son proteínas nativas para las que existen linfocitos T reguladores centrales (tales como, por ejemplo, IL10, insulina, albúmina de suero humano, hemoglobina), la respuesta se conducirá hacia la tolerancia. Si estas proteínas son antígenos con los que la persona ya ha sido inmunizada, tal como es frecuentemente el caso con difteria o toxoide tetánico, la respuesta inmunitaria se influirá por estas reacciones existentes (que son principalmente reacciones inflamatorias).

En el presente documento se desvela el tratamiento de autoinmunidad y/o el establecimiento o la inducción de tolerancia por la coadministración de los compuestos de la invención. Además de las enfermedades autoinmunitarias, se puede establecer tolerancia a alérgenos, donde los péptidos o proteínas alérgicas se coadministran con compuestos de la invención donde los antígenos en lugar de ser auto-antígenos son alérgenos (antígenos) específicos para la enfermedad alérgica.

Se entiende que los detalles dados en el presente documento con respecto a un aspecto, en particular detalles sobre los autoantígenos, antígenos de influencia, el compuesto inductor de IL-10 y el compuesto que reduce la capacidad del sistema inmunitario para activar TCs y BCs intactos y respuestas de recuerdo de linfocitos activados y de memoria, el momento exacto y el modo de administración, se aplican cambiando lo que haya que cambiar a todos los otros aspectos de la invención.

#### GAD para su uso en métodos terapéuticos

55 Según la presente invención, GAD se administra por inyección directamente en un ganglio linfático.

En una realización, la presente invención se refiere a GAD para su uso en un método para la prevención y/o el tratamiento de diabetes de tipo 1, diabetes autoinmunitaria y diabetes autoinmunitaria latente, que comprende administrar una composición, comprendiendo dicha composición al menos GAD, a un sujeto que tiene un nivel de vitamina D en suero superior a 50 nanomol/litro. Cada una de las al menos dos moléculas puede así influir en la reacción de la célula inmunitaria adaptativa a la que se presentan los antígenos.

El sujeto puede tener un nivel de vitamina D en suero entre 50-150 nanomol/litro, tal como 60-100 nanomol/litro, 75-100 nanomol/litro o 100-150 nanomol/litro.

65 El método puede comprender un pretratamiento del sujeto para ajustar el nivel de vitamina D en suero, y dicho

pretratamiento puede comprender la administración de vitamina D y/o análogos de vitamina D, y/o exposición a radiación UVB, preferentemente durante entre 7 y 90 días antes de la administración de la composición que comprende al menos un autoantígeno de células beta a dicho sujeto.

5 El método puede comprender además la administración de vitamina D y/o análogos de vitamina D en una cantidad de 7000-70000 UI/semana durante 3-48 meses.

El método puede comprender además la administración de un inhibidor de ciclooxigenasa, como se trata más adelante en el encabezamiento "Inhibidores de la ciclooxigenasa".

10 El método puede comprender además la administración de un compuesto de CTLA4, como se trata más adelante en el encabezamiento "Compuestos de CTLA4".

15 El método puede comprender además la administración de un inhibidor de TNFalfa, como se trata más adelante en el encabezamiento "inhibidores de TNFalfa".

La presente divulgación se refiere a la prevención y/o el tratamiento de diabetes de tipo 1, diabetes autoinmunitaria y diabetes autoinmunitaria latente en un individuo en necesidad del mismo, que comprende administrar a dicho individuo:

20 a) para fines de tolerización de antígenos específicos, al menos GAD. En una realización, GAD se administra cuando los niveles de vitamina D en suero son entre 50 y 150 nM/l, más preferentemente entre 75 y 100 nM/l y lo más preferentemente entre 100 - 150 nM/l; y

25 b) para interferir con la capacidad de APCs para madurar, administrar a dicho individuo al menos un compuesto inductor de IL-10 seleccionado del grupo que consiste en vitamina D, análogos de vitamina D, ácido gamma-aminobutírico, análogos de ácido gamma-aminobutírico e inhibidores de tirosina cinasas; como se enumeró anteriormente. En una realización, la inducción de IL-10 se potencia o realiza por el uso de exposición a luz UVB; y

30 c) para interferir con la capacidad del sistema inmunitario para activar TCs y BCs intactos y respuestas de recuerdo de linfocitos activados y de memoria, administrar un compuesto tal como un compuesto AINE; un compuesto de CTLA-4; o un inhibidor de TNFalfa; como se enumeró anteriormente.

en el presente documento se desvela un método para el tratamiento de diabetes de tipo 1, diabetes autoinmunitaria y diabetes autoinmunitaria latente, que comprende administrar a un sujeto con dicha enfermedad:

35 (a) un ciclo de Vit D para imponer la capacidad de células dendríticas presentadoras de antígeno a presentar péptidos de antígeno al sistema inmunitario en un modo tolerizante;

b) GAD, tal como GAD65, formulada en un vehículo farmacéutico administrado en una cantidad suficiente para restaurar o inducir tolerancia a GAD; y opcionalmente

40 c) una dosis terapéutica de un compuesto antiinflamatorio, por ejemplo un inhibidor de la ciclooxigenasa tal como ibuprofeno, o un inhibidor de la cox-2 o cox-1 más pronunciado.

El ciclo de Vit D empieza preferentemente 15 a 90 días antes de la administración del autoantígeno, o 7 a 90 días antes de la administración del autoantígeno, y se administra en forma líquida o de comprimido en dosis correspondientes a 7000 a 70000 UI por semana durante un periodo de 3 a 48 meses.

50 El pretratamiento con vitamina D tiene como objetivo elevar los niveles de vitamina D en suero del sujeto tratado hasta por encima de aproximadamente 50 nanomol/litro, o superior a 60, 75 o 100 nanomol/litro. Se puede prescindir del pretratamiento si el sujeto ya tiene niveles de vitamina D en suero a estos niveles.

55 En otra realización de la invención, la concentración en suero de Vit D se puede potenciar por medio de fototerapia. En este caso, los sujetos se expondrán a radiación ultravioleta B, preferentemente entre 10-120 minutos diariamente durante 15 a 90 días antes de la administración de autoantígeno. La fototerapia debe continuar durante un periodo de 3 a 48 meses.

60 Las dosis preferidas de GAD son entre dos y cuatro administraciones, separadas al menos dos semanas, separadas más preferentemente un mes, de cada una entre 10 y 200 µg de antígeno si se administran por inyección. Si se administran por vía oral, las dosis preferidas son entre 500 mg y 5 g diariamente durante un periodo de entre tres meses y 48 meses. El ibuprofeno se administra preferentemente en dosis diarias de 100 a 800 mg durante un periodo de 60 a 150 días, periodo durante el cual tiene lugar la administración de autoantígeno.

GAD se va a administrar por inyección directamente en un ganglio linfático. El compuesto antiinflamatorio y GAD se pueden administrar en/con un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

65 En una realización de la composición que contiene GAD, se administra separada 1-4 semanas, tal como separada 2-4 semanas o separada 2 semanas, en un periodo inicial de tratamiento de 3 a 4 meses, y opcionalmente separada

2-3 meses en un periodo de tratamiento continuado de 6-9 meses.

En una realización, la cantidad de GAD se incrementa desde 1-5 µg por administración al principio del periodo de tratamiento hasta aproximadamente 40-100 µg por administración en las administraciones finales.

5 Una pauta posológica preferida incluye aumentar la dosis de autoantígeno de 1 ug, 5 ug, 20 ug, 50 ug, dos inyecciones de cada dosis separadas 4 semanas que sería 28 semanas de tratamiento con GAD-alumbre. Un programa de administración alternativamente preferido incluye aumentar las dosis tal como 4 ug, 8 ug, 16 ug, 20 ug, 40 ug en los días 0, 15, 30, 45, 60 y posteriormente 40 ug en los días 120, 180, 270.

10 Según la invención, la administración de autoantígeno se hace directamente en los ganglios linfáticos para permitir que las APCs residentes presenten péptidos de antígeno al sistema inmunitario. Las dosis serán preferentemente entre 1 y 15 µg por autoantígeno, más preferido entre 2 y 10 µg por autoantígeno, o 2 a 5 µg por autoantígeno. Se prefiere la formulación en alumbre.

15 Según ciertas realizaciones, donde el al menos un antígeno se administra por el ganglio linfático, una dosificación preferida es entre 1-15 ug, más preferida entre 2-10, y lo más preferido entre 2-5 ug por inyección y autoantígeno usado, teniendo lugar dichas administraciones al menos 2 veces, más preferido al menos 3 veces y lo más preferido al menos 4 veces, separadas al menos 14 días, más preferentemente separadas al menos 30 días.

20 Según ciertas realizaciones, GAD se formula por separado o junto con otros antígenos según lo requiera el caso, en alumbre, solución salina o albúmina de suero humano.

25 Según ciertas realizaciones, la al menos una composición farmacéutica comprende al menos dos antígenos, en donde un antígeno es GAD, sobre la misma partícula de vehículo. Según ciertas otras realizaciones, la al menos una composición farmacéutica comprende al menos dos antígenos, en donde un antígeno es GAD, sobre diferentes partículas de vehículo. Según ciertas realizaciones, los al menos dos antígenos, en donde un antígeno es GAD, se administran por separado y en momentos y frecuencias diferentes, pautas y formulaciones que son adecuadas para los antígenos específicos. Más preferentemente, los al menos dos antígenos, en donde un antígeno es GAD, se formulan en la misma composición farmacéutica y, por tanto, se administran simultáneamente.

30 En algunas realizaciones, GAD se formula en un adyuvante tal como alumbre. En realizaciones más particulares, GAD se formula en solución salina o albúmina de suero humano.

35 Según ciertas realizaciones, GAD y el al menos un compuesto inductor de IL-10 se administran simultáneamente. Según ciertas realizaciones, GAD y el al menos un compuesto inductor de IL-10 se administran por separado.

40 Según ciertas realizaciones, la administración del al menos un compuesto inductor de IL-10 comienza entre 1-14 días antes de la primera administración de GAD. Según ciertas realizaciones, la administración del al menos un compuesto inductor de IL-10 comienza al menos 2, preferentemente al menos 10 semanas, antes de la primera administración de GAD.

45 Según ciertas realizaciones que incluyen periodos de tratamiento con vitamina D, se administran por día entre 500 y 10000 UI, más preferentemente entre 1000 y 3000 UI de vitamina D, tal como vitamina D3.

Según ciertas realizaciones que incluyen periodos de pretratamiento con vitamina D, se administran por semana entre 7.000 - 100.000 UI de vitamina D, tal como vitamina D3, antes de la primera administración del al menos un antígeno, y como una dosis de mantenimiento de 500-2000 UI por día a partir de aquí.

50 En algunas realizaciones, el periodo de tratamiento de vitamina D es entre 60 y 420 días después de la 1ª administración de GAD.

55 El compuesto que reduce la capacidad del sistema inmunitario para activar TCs y BCs intactos y respuestas de recuerdo de linfocitos activados y de memoria, tales como un inhibidor de la ciclooxigenasa; un compuesto de CTLA-4; o un inhibidor de TNFα se pueden administrar simultáneamente o por separado con GAD y/o el al menos un compuesto inductor de IL-10.

60 En algunas realizaciones, el compuesto que reduce la capacidad del sistema inmunitario para activar TCs y BCs nativos y respuestas de recuerdo de linfocitos activados y de memoria es un inhibidor de la ciclooxigenasa.

Según ciertas realizaciones, el periodo de tratamiento con inhibidor de la ciclooxigenasa empieza al menos 2 semanas antes de la primera administración del al menos un antígeno.

65 Según ciertas realizaciones, cuando el inhibidor de la ciclooxigenasa es ibuprofeno, se administra al menos una dosis de 400 a 1000 mg por día durante el periodo de tratamiento con AINE.

El periodo de tratamiento con inhibidor de la ciclooxigenasa es al menos entre 4 y 14 semanas, más preferido entre 4 y 8 semanas.

En los presentes métodos, el compuesto antiinflamatorio se debe administrar por vía oral o por inyección.

En algunas realizaciones, el compuesto que reduce la capacidad del sistema inmunitario para activar TCs y BCs intactos y respuestas de recuerdo de linfocitos activados y de memoria es un inhibidor de TNF $\alpha$ .

El bloqueo de TNF $\alpha$  reduce el estado de activación de la respuesta inmunitaria y disminuye la actividad de DCs y otros inmunocitos. Además, debido a que TNF $\alpha$  rompe la arquitectura de FSC y GC en tejido linfoide y altera las funciones de linfocitos B, se reduce la activación de linfocitos T efectores específicos de antígeno y la producción de autoanticuerpos. Datos preclínicos recientes de diabetes muestran que el antígeno de células beta suministrado por DCs quiescentes puede inducir la insensibilidad de linfocitos T periféricos, modulando por disminución la destrucción en curso de células beta y la parada de la destrucción de células beta. Por tanto, bajo una terapia combinada de autoantígeno - inhibidor de TNF $\alpha$ , los niveles de autoanticuerpo y la actividad y números de linfocitos T efectores serán relativamente reducidos, mientras que el número y la función de Tregs específicos de autoantígeno se mantendrán al menos mantenidos. Se necesitan meses para modificar estos procesos inmunológicos y documentar estos efectos, pero durante este tiempo, debido a sus efectos agudos protectores y metabólicos de células beta, la inhibición de TNF $\alpha$  también preservará las células beta directamente. Debido a que se sabe que GAD65 es uno de los autoantígenos primarios en T1DM, este enfoque produce una desviación de la respuesta autoinmunitaria de la diabetes hacia un fenotipo regulador de masa crítica suficiente para conducir a un efecto significativo y prolongado sobre la preservación de células beta.

Así, en un aspecto de la presente invención, un inhibidor de TNF- $\alpha$  seleccionado del grupo que consiste en infliximab, adalimumab, certolizumab, golimumab y etanercept, se usa como un compuesto antiinflamatorio. Una dosis preferida cuando se usa etanercept es entre 0,2 y 1 mg/kg SQ, una vez o dos veces por semana durante un periodo de entre 2 a 9 meses.

Según ciertas realizaciones, cuando el inhibidor de TNF $\alpha$  es etanercept, se prefiere la dosis autorizada por la FDA de 5 mg/kg en las Semanas 0, 2 y 6. En otra realización, la dosis es la misma que se usa en el ensayo de monoterapia con inhibidor de TNF $\alpha$  de fase I (0,4 mg/kg (máx 25 mg) SQ dos veces a la semana  $\times$  26 semanas). En otra realización más preferida, solo se usan dos dosis, máx 25 mg/dosis en el régimen del tratamiento de combinación que incluye vitamina D y autoantígenos.

Según ciertas realizaciones, el inhibidor de TNF $\alpha$  se administra antes de la primera administración del al menos un antígeno.

En algunas realizaciones, el compuesto que reduce la capacidad del sistema inmunitario para activar TCs y BCs intactos y respuestas de recuerdo de linfocitos activados y de memoria es un compuesto de CTLA-4, seleccionado del grupo que consiste en abatacept. Según realizaciones particulares, las dosis de al menos 2-20 mg/kg de abatacept, se administra por ocasión de tratamiento, empezando en el plazo de +/- 7 días alrededor del momento de la primera administración del al menos un antígeno.

Según ciertas realizaciones, abatacept se administra simultáneamente con la primera administración de GAD.

Según ciertas realizaciones, la administración de GAD y el compuesto que reduce la capacidad del sistema inmunitario para activar TCs y BCs intactos y respuestas de recuerdo de linfocitos activados y de memoria se repite en el día 14, 28 y 45 +/- una semana según lo requiera el caso para garantizar el bloqueo de CD28 sobre TCs, y donde el día uno marca la primera administración del al menos un compuesto inductor de IL-10.

Según ciertas realizaciones, el individuo que se va a tratar según la presente invención es un mamífero. Según realizaciones particulares, el individuo que se va a tratar según la presente invención es un ser humano. Según ciertas realizaciones, el individuo que se va a tratar según la presente invención es un lactante. Según realizaciones particulares, el individuo que se va a tratar según la presente invención es un adolescente. Según realizaciones particulares, el individuo que se va a tratar según la presente invención es un adulto.

En algunas realizaciones, el sujeto humano tratado tiene más de 4 años.

En otras realizaciones, el sujeto humano tratado tiene 8 años o más.

En otras realizaciones, el sujeto humano tratado tiene 10 años o más.

En algunas realizaciones, el sujeto humano tratado tiene 18 años o menos.

En algunas realizaciones, el sujeto humano tratado tiene 4-10, o 4-18, o 8-18 o 10-18 años.

En otras realizaciones, el sujeto humano tratado tiene 18 años o más.

En algunas realizaciones, el sujeto humano tratado tiene 18-30 años.

5 Composiciones

En algunas realizaciones, la presente invención también utiliza una composición que comprende una pluralidad de partículas, cada una que tiene inmovilizada sobre su superficie al menos un primer y al menos un segundo antígeno, en donde el primer antígeno es GAD y el segundo antígeno es o un tolerógeno o un autoantígeno de células beta, comprendiendo además opcionalmente la composición adyuvantes, excipientes, disolventes y/o tampones farmacéuticamente aceptables.

Según ciertas realizaciones, la GAD se formula en un adyuvante. Según realizaciones particulares, el adyuvante es alumbre. En otras realizaciones particulares, el al menos un antígeno se formula en solución salina o albúmina de suero humano. En realizaciones más particulares, el autoantígeno se puede administrar como plásmidos o codificado por un vector viral, tal como vectores de virus adeno-asociado o vectores del virus del herpes simple.

Las composiciones según la invención pueden comprender más de un autoantígeno. Así, según ciertas realizaciones, la composición comprende al menos dos autoantígenos, uno de los cuales es GAD. Según ciertas otras realizaciones, la composición comprende al menos tres autoantígenos. Según ciertas otras realizaciones, la composición comprende al menos cuatro autoantígenos.

Por tanto, según realizaciones particulares, la composición comprende al menos GAD, tal como GAD-65, e insulina.

Según otras realizaciones particulares, la composición comprende al menos GAD, tal como GAD-65, e insulina de cadena B.

Según otras realizaciones particulares, la composición comprende al menos GAD, tal como GAD-65, y proinsulina. Según realizaciones particulares, la composición comprende al menos GAD, tal como GAD-65, insulina e insulina de cadena B. Según otra realización particular, la composición comprende al menos GAD, tal como GAD-65, insulina y proinsulina. Según aún otras realizaciones particulares, la composición comprende al menos GAD, tal como GAD-65, insulina de cadena B y proinsulina.

Según otras realizaciones particulares, la composición comprende GAD, tal como GAD-65, insulina, insulina de cadena B e insulina de cadena B.

Los autoantígenos se pueden formular en adyuvantes tales como hidróxido de aluminio, MAS-1, albúmina de suero humano, emulsiones de lípido.

Según realizaciones particulares, el adyuvante es alumbre.

Se desvela una composición que comprende

i) GAD, y al menos uno de

ii) un compuesto inductor de IL-10 seleccionado del grupo que consiste en vitamina D, análogos de vitamina D, inhibidores de tirosina cinasas, ácido gamma-aminobutírico y análogos de ácido gamma-aminobutírico; y

ii) un compuesto que reduce la capacidad de las células dendríticas para activar linfocitos T CD4+ intactos, tales como un inhibidor de la ciclooxigenasa, un compuesto de CTLA-4 o un inhibidor de TNF alfa;

y opcionalmente adyuvantes, excipientes, disolventes y/o tampones farmacéuticamente aceptables.

La presente divulgación también proporciona una composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) que comprende i) al menos GAD y ii) al menos un compuesto inductor de IL-10.

La composición desvelada puede comprender más de un compuesto inductor de IL-10, tal como al menos dos, tres o cuatro compuestos inductores de IL-10.

La composición puede comprender al menos vitamina D y un inhibidor de tirosina cinasas.

La composición puede comprender al menos vitamina D y dasatinib. La composición puede comprender al menos vitamina D y bosutinib. La composición puede comprender al menos vitamina D y saracatinib. La composición puede comprender al menos vitamina D e imatinib. La composición puede comprender al menos vitamina D y sunitinib.

La composición puede comprender además iii) un compuesto que reduce la capacidad de las células dendríticas para activar linfocitos T CD4+ intactos, tales como un inhibidor de la ciclooxigenasa, un compuesto de CTLA-4 o un inhibidor de TNF-alfa.

Dicho compuesto puede ser un inhibidor de la ciclooxigenasa, tal como un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE). Según realizaciones más particulares, el AINE se selecciona del grupo que consiste en ibuprofeno, dexibuprofeno, naproxeno, fenoprofeno, ketoprofeno, dexketoprofeno, flurbiprofeno, oxaprozina, loxoprofeno, indometacina, tolmetina, sulindaco, etodolaco, ketorolaco, diclofenaco, aceclofenaco, nabumetona, aspirina (ácido acetilsalicílico), diflunisal (Dolobid), ácido salicílico, salsalato (Disalacid), piroxicam, meloxicam, tenoxicam, droxicam, lornoxicam, isoxicam, ácido mefenámico, ácido meclofenámico, ácido flufenámico, ácido tolfenámico, celecoxib, rofecoxib, valdecoxib, parecoxib, lumiracoxib, etoricoxib y nimesulida.

En una realización de la presente invención, la al menos una composición que incluye el antígeno de proteína/péptido GAD, o combinación de antígenos de proteína/péptido, se formulará mezclando las formulaciones de proteína/péptido producidas por GMP individuales juntas en un tampón de formulación. La disolución de proteína combinada se esterilizará entonces por filtración en un recipiente de formulación cerrado con mezcla constante, después de que una disolución estéril de adyuvante se añada al recipiente de formulación. La proteína que contiene partículas se añadirá entonces asépticamente a viales de inyección de vidrio estériles y despirogenados o jeringas precargadas y se sellarán. Los artículos de proteína adsorbida pueden ser extraídos asépticamente de cada vial para inyección en tejido de paciente o sujeto.

Las proporciones de proteínas combinadas en la formulación pueden variar, aunque las más preferidas son proporciones iguales por gramo de peso. Si se usa, la proporción de antígeno de influenza debe ser al menos igual a la masa combinada de las otras proteínas o péptidos de antígeno. La proporción de antígeno de influenza puede ser superior a la masa combinada de los otros antígenos. El tampón de formulación puede ser un tampón manitol tamponado con fosfato isotónico. El adyuvante puede ser hidróxido de aluminio (alumbre), un liposoma, poli(lactida-co-glicolida) micropartículas, o solución salina.

Los medicamentos, composiciones farmacéuticas o combinaciones terapéuticas desvelados en el presente documento pueden estar en cualquier forma adecuada para la aplicación a seres humanos y/o animales, preferentemente seres humanos que incluyen lactantes, niños y adultos, y se pueden producir mediante procedimientos convencionales conocidos para los expertos en la técnica. El medicamento, la composición (farmacéutica) o combinación terapéutica se pueden producir mediante procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, a partir del índice de "Pharmaceutics: The Science of Dosage Forms", Segunda Edición, Aulton, M.E. (ED. Churchill Livingstone, Edinburgh (2002)); "Encyclopedia of Pharmaceutical Technology", Segunda Edición, Swarbrick, J. and Boylan 15 J.C. (Eds.), Marcel Dekker, Inc. New York (2002); "Modern Pharmaceutics", Cuarta Edición, Banker G.S. and Rhodes C.T. (Eds.) Marcel Dekker, Inc. New York 2002 y "The Theory and Practice of Industrial Pharmacy", Lachman L., Lieberman H. And Kanig J. (Eds.), Lea & Febiger, Philadelphia (1986).

Los términos "medicamento", "composición farmacéutica" y "formulaciones farmacéuticas" se pueden usar indistintamente.

El medicamento, la composición farmacéutica o la combinación terapéutica según la presente invención pueden comprender además uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Los vehículos, diluyentes y excipientes que son adecuados para la preparación de un medicamento, composición farmacéutica o combinación terapéutica según la presente invención se conocen bien por los expertos en la técnica, por ejemplo, del "Handbook of Pharmaceutical Excipients" Sexta edición, Raymond C. Rowe, Paul J. Sheskey and Marian E Quinn (Eds.), American Pharmaceutical Association (Julio de 2009).

### Autoantígenos

Los autoantígenos adecuados para su uso en los métodos, composiciones y kits según la presente invención son autoantígenos de células beta.

Éstos incluyen: descarboxilasa de ácido glutámico (GAD65 o GAD 67 o GAD32) (Baekkeskov et al., Nature (1990) 347: 151); insulina (Palmer et al., Science (1983) 222: 1337); que incluye el péptido B9-23 que comprende los aminoácidos 9-23 de la cadena B de insulina (Daniel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995) 93: 956-960; Wong et al., Nat. Med. (1999) 5: 1026-1031); proinsulina; que incluye el péptido B24-C36 que comprende los aminoácidos 24-36 que engloban la unión del péptido C de la cadena B de proinsulina (Chen et al., J. Immunol. (2001) 167: 4926-4935; Rudy et al., Mol. Med., (1995) 1: 625-633); HSP60 (proteína 60 de choque térmico, Raz et al., Lancet (2001), 358:1749-53); ICA512/IA-2 (antígeno 512 de células de los islotes; Rabin et al., J. Immunol. (1994) 152: 3183), antígeno-2 de insulinoma, ZnT8, proteína relacionada con la subunidad catalítica de glucosa-6-fosfato específica de islotes (IGRP), cromogranina A, insulina de la cadena B, preproinsulina, proinsulina II, un péptido de proinsulina sin un epítipo citotóxico de linfocitos T, péptido C13-A5 de insulina, antígeno p69 de células de los islotes, o cualquier péptido, derivado que incluya las formas citrulinadas iDS, y nucleótidos correspondientes de los anteriores.

Para un alineamiento de secuencias de insulina entre especies, véase la Tabla I en Homann et al., J. Immunol. (1999) 63: 1833-1838.

Según la invención, el autoantígeno de la célula beta es GAD, tal como GAD-65 o GAD-67, que incluye fragmentos de los mismos, derivados de los mismos, o un ácido nucleico que los codifica.

5 Según realizaciones más particulares, el autoantígeno de células beta es GAD-65, un fragmento del mismo, derivado del mismo, o un ácido nucleico que codifica el mismo. Según realizaciones más particulares, el autoantígeno de células beta es GAD-65. Según otras realizaciones particulares, el autoantígeno de células beta es un fragmento derivado de GAD-65 (es decir, un fragmento de GAD65).

10 En algunas realizaciones, GAD se usa en un método que comprende que comprende administrar a un sujeto una composición que comprende una pluralidad de partículas, teniendo cada una inmovilizada sobre su superficie GAD y al menos un segundo autoantígeno.

15 Según otras realizaciones particulares, el segundo autoantígeno de células beta es el antígeno-2 de insulinoma.

Según otras realizaciones particulares, el segundo autoantígeno de células beta es ZnT8.

20 Según otras realizaciones particulares, el segundo autoantígeno de células beta es la proteína relacionada con la subunidad catalítica de glucosa-6-fosfato específica de los islotes (IGRP).

Según otras realizaciones particulares, el segundo autoantígeno de células beta es cromogranina A.

Según ciertas otras realizaciones, el segundo autoantígeno de células beta es insulina.

25 Según ciertas otras realizaciones, el segundo autoantígeno de células beta es insulina de la cadena B.

Según ciertas otras realizaciones, el segundo autoantígeno de células beta es proinsulina.

30 Según ciertas otras realizaciones, el segundo autoantígeno de células beta es preproinsulina.

En algunos aspectos de la presente invención, un tolerógeno se administra al sujeto tratado además de GAD. Un tolerógeno es un antígeno que induce un estado de insensibilidad inmunológica específica a la dosis de exposición posterior del antígeno. Los tolerógenos adecuados para su uso en la presente invención son proteínas humanas endógenas nativas y otras moléculas que están abundantemente disponibles y expuestas al sistema inmunitario y, en general, se reconocieron como propias. Los ejemplos de tolerógenos incluyen IL-10, albúmina de suero humano o hemoglobina, o ácido gamma-aminobutírico.

40 Los autoantígenos o tolerógenos para su uso en la invención se pueden administrar como proteínas de longitud completa, o alternativamente se pueden administrar como fragmentos o variantes de dichas proteínas de longitud completa, con la condición de que los fragmentos o variantes de autoantígenos tengan al menos un epítipo conservado con respecto al autoantígeno original y sean eficaces en los métodos según la presente invención.

45 Un fragmento de un autoantígeno de proteína o tolerógeno tiene la misma secuencia de aminoácidos que el autoantígeno o tolerógeno original, pero carece de al menos un resto de aminoácido del extremo N o extremo C. Un fragmento de un autoantígeno debe comprender al menos un epítipo relevante del autoantígeno original. Los fragmentos de autoantígenos y tolerógenos tienen preferentemente una longitud de al menos 8 aminoácidos, tal como al menos 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 aminoácidos.

50 Una variante de un autoantígeno o tolerógeno de proteína puede tener una secuencia de aminoácidos que es inferior a 100 % idéntica al autoantígeno o tolerógeno original, tal como 99 %, 95 %, 90 %, 85 %, 80 %, 70 %, 60 % o 50 % idéntico (como se compara por una herramienta de alineamiento de secuencias de proteínas, por ejemplo Clustal Omega disponible del European Bioinformatics Institute, Hinxton, GB), mientras que, para autoantígenos, al mismo tiempo tienen al menos un epítipo relevante conservado con respecto al autoantígeno original. Las variantes también pueden tener secuencias de aminoácidos más cortas (es decir, ser un fragmento) o más largas en comparación con el antígeno o tolerógeno original.

55 En la invención, la administración de un autoantígeno o tolerógeno puede implicar un autoantígeno o tolerógeno que comprende una proteína o un fragmento de péptido de la proteína original. También puede implicar la administración de una variante del autoantígeno o tolerógeno.

60 Además, la proteína o péptido se puede introducir en un sujeto como una proteína o péptido en un vehículo farmacéuticamente aceptable o la proteína o péptido se puede codificar por un vector de expresión, donde el vector de expresión se introduce (por ejemplo, véanse los ejemplos donde el auto-antígeno se expresa en un sujeto por un vector de expresión de pCMV). Dicho vector de expresión puede ser un ácido nucleico, tal como ADN o ARN, y se puede administrar por inyección con aguja, pistola de genes, inyección por chorro o con la ayuda de citofectina como se conoce en la técnica. El ácido nucleico se puede formular en solución salina, sobre perlas de oro, en liposomas o

65

en formulaciones de lípidos. Para descripción adicional referente a la administración de auto-antígenos mediante sus vectores de expresión (y para antígenos específicos que se pueden administrar), véase la publicación de patente de EE. UU. US 2002/0107210.

5 Compuestos inductores de IL-10

En algunos aspectos, los métodos, composiciones y kits de la presente invención usan los compuestos inductores de IL-10.

10 El al menos un compuesto inductor de IL-10 es la vitamina D, tal como 1,25-dihidroxitamina D.

Inhibidores de la ciclooxigenasa

15 En algunos aspectos, los métodos, composiciones y kits de la presente invención usan uno o más inhibidores de la ciclooxigenasa.

Estos inhibidores de la ciclooxigenasa se seleccionan del grupo que consiste en ibuprofeno, dexibuprofeno, naproxeno, fenoprofeno, ketoprofeno, dexketoprofeno, flurbiprofeno, oxaprozina, loxoprofeno, indometacina, tolmetina, sulindaco, etodolaco, ketorolaco, diclofenaco, aceclofenaco, nabumetona, aspirina (ácido acetilsalicílico), diflunisal (Dolobid), ácido salicílico, salsalato (Disalcid), piroxicam, meloxicam, tenoxicam, droxicam, lornoxicam, isoxicam, ácido mefenámico, ácido meclofenámico, ácido flufenámico, ácido tolfenámico, celecoxib, rofecoxib, valdecoxib, parecoxib, lumiracoxib, etoricoxib y nimesulida.

20

Según ciertas realizaciones, el inhibidor de la ciclooxigenasa es un derivado de ácido propiónico, tal como ibuprofeno, dexibuprofeno, naproxeno, fenoprofeno, ketoprofeno, dexketoprofeno, flurbiprofeno, oxaprozina o loxoprofeno.

25

Según ciertas realizaciones, el inhibidor de la ciclooxigenasa es un derivado de ácido acético, tal como indometacina, tolmetina, sulindaco, etodolaco, ketorolaco, diclofenaco, aceclofenaco o nabumetona.

30

Según ciertas realizaciones, el inhibidor de la ciclooxigenasa es un salicilato, tal como aspirina (ácido acetilsalicílico), diflunisal (Dolobid), ácido salicílico o salsalato.

Según ciertas realizaciones, el inhibidor de la ciclooxigenasa es un derivado de ácido enólico (Oxicam), tal como piroxicam, meloxicam, tenoxicam, droxicam, lornoxicam o isoxicam.

35

Según ciertas realizaciones, el inhibidor de la ciclooxigenasa es un derivado de ácido antranílico, tal como ácido mefenámico, ácido meclofenámico, ácido flufenámico o ácido tolfenámico.

Según ciertas realizaciones, el inhibidor de la ciclooxigenasa es el inhibidor selectivo de la COX-2, tal como celecoxib, rofecoxib, valdecoxib, parecoxib, lumiracoxib o etoricoxib.

40

Según realizaciones más particulares, el inhibidor de la ciclooxigenasa es ibuprofeno.

45 Según realizaciones más particulares, el inhibidor de la ciclooxigenasa es dexibuprofeno.

Según realizaciones más particulares, el inhibidor de la ciclooxigenasa es naproxeno.

Según realizaciones más particulares, el inhibidor de la ciclooxigenasa es fenoprofeno.

50

Según realizaciones más particulares, el inhibidor de la ciclooxigenasa es ketoprofeno.

Según realizaciones más particulares, el inhibidor de la ciclooxigenasa es dexketoprofeno.

55 Según realizaciones más particulares, el inhibidor de la ciclooxigenasa es flurbiprofeno.

Según realizaciones más particulares, el inhibidor de la ciclooxigenasa es oxaprozina.

Según realizaciones más particulares, el inhibidor de la ciclooxigenasa es loxoprofeno.

60

Según realizaciones más particulares, el inhibidor de la ciclooxigenasa es indometacina.

El ibuprofeno bloquea principalmente la cox-2, pero de algún modo también la cox-1. El ibuprofeno tiene un efecto algo más amplio sobre el sistema inmunitario que un bloqueante de IL-1 estrecho y un efecto antiinflamatorio bastante pronunciado sin graves riesgos. El uso de ibuprofeno disminuye la inflamación de las células beta y permite que las DCs impuestas por Vit D induzcan tolerancia a péptidos de autoantígenos presentados a linfocitos T,

65

protegiendo así las células beta en el sujeto.

#### Compuestos de CTLA4

- 5 En algunos aspectos, los métodos, composiciones y kits de la presente invención usan un compuesto de CTLA-4, tal como una inmunoglobulina de antígeno 4 asociada a linfocitos T citotóxicos.

A efectos de la presente invención, el compuesto de CTLA-4 es abatacept.

- 10 Abatacept (una CTLA4-inmunoglobulina modificada en Fc) es una proteína de fusión inmunomoduladora que empobrece en linfocitos T, que consiste en la porción extracelular de CTLA4 humana y la cadena pesada de IgG1 humana. Bloquea la señal coestimulante implicada en la activación de linfocitos T intactos. Su ligación con CD80/86 sobre APCs también puede interferir y reducir la IL-6 inducida por CD80/86, que puede regular por disminución las citocinas inflamatorias, tales como IL-1beta, IFNgamma e IL-17. La ligación adicional de abatacept con CD80/86  
15 puede inducir la indolamina dioxigenasa (IDO) en APCs, que a su vez puede inducir la anergia en linfocitos T, así como regular por disminución la activación paracrina de linfocitos T intactos por linfocitos T activados. CD80/86 expresados sobre linfocitos B pueden aún ser una trayectoria adicional donde abatacept puede llevar a cabo una función inmunomoduladora.

#### Inhibidores de TNFalfa

- 20 En algunos aspectos, los métodos, composiciones y kits de la presente invención usan un inhibidor de TNF-alfa, seleccionado del grupo que consiste en adalimumab, certolizumab, etanercept, golimumab o infliximab. Según realizaciones más particulares, el inhibidor de TNF-alfa es adalimumab. Según otras realizaciones más particulares,  
25 el inhibidor de TNF-alfa es certolizumab. Según otras realizaciones más particulares, el inhibidor de TNF-alfa es etanercept. Según otras realizaciones más particulares, el inhibidor de TNF-alfa es golimumab. Según otras realizaciones más particulares, el inhibidor de TNF-alfa es infliximab.

#### Kits

- 30 La presente divulgación también proporciona kits referentes a la invención. Por ejemplo, en un aspecto, un kit puede comprender: (a) un compuesto antiinflamatorio; (b) un autoantígeno; y (c) vitamina D y opcionalmente d) instrucciones para la pauta de la invención.

- 35 Se desvela un kit farmacéutico que comprende

- i) una composición que comprende un autoantígeno de células beta, y al menos uno de  
iia) una composición que comprende un compuesto inductor de IL-10 seleccionado del grupo que consiste en  
40 vitamina D, análogos de vitamina D, inhibidores de tirosina cinasas, ácido gamma-aminobutírico y análogos de ácido gamma-aminobutírico; y  
iib) una composición que comprende un compuesto que reduce la capacidad de las células dendríticas para activar linfocitos T CD4+ intactos, tales como un inhibidor de la ciclooxigenasa, un compuesto de CTLA-4 o un inhibidor de TNF-alfa.

- 45 Se desvela un kit farmacéutico que comprende

- i) una composición que comprende un autoantígeno de células beta, y al menos uno de  
iia) una composición que comprende un compuesto inductor de IL-10 seleccionado del grupo que consiste en  
50 vitamina D, análogos de vitamina D, inhibidores de tirosina cinasas, ácido gamma-aminobutírico y análogos de ácido gamma-aminobutírico; y  
iib) una composición que comprende un compuesto que reduce la capacidad de las células dendríticas para activar linfocitos T CD4+ intactos, tales como un inhibidor de la ciclooxigenasa, un compuesto de CTLA-4 o un inhibidor de TNF-alfa.

- 55 Además, se desvela el uso de composiciones que comprenden al menos dos de:

- i) al menos un antígeno o fragmentos del mismo; o ácidos nucleicos que codifican dichas moléculas relacionadas con al menos una de las enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias en el grupo como se enumera en el presente documento; y  
60 ii) al menos un compuesto inductor de IL-10 seleccionado del grupo: vitamina D tal como 1,25-dihidroxitamina D. Según ciertas otras realizaciones, el al menos un compuesto inductor de IL-10 es un análogo de vitamina D, tal como TX527. Según ciertas otras realizaciones, el al menos un compuesto inductor de IL-10 es un inhibidor de tirosina cinasas, tales como dasatinib, bosutinib, saracatinib, imatinib, sunitinib, o combinaciones de las mismas; y  
65 iii) al menos un compuesto que reduce la capacidad del sistema inmunitario para activar TCs y BCs intactos y de recordar respuestas de linfocitos activados y de memoria, tales como un inhibidor de la COX; un compuesto de

CTLA-4; o un inhibidor de TNF-alfa; como se enumeran en el presente documento);

en la fabricación de un kit que incluye al menos dos composiciones farmacéuticas (es decir, medicamentos).

5 Una de las al menos dos composiciones farmacéuticas puede comprender el al menos un antígeno formulado en alumbre, solución salina o albúmina de suero humano como un inyectable en un vial o jeringa precargado, y otra de las al menos dos composiciones farmacéuticas puede comprender el compuesto inductor de IL-10 en forma de comprimidos para administración por vía oral.

10 También se desvela un kit que incluye al menos dos composiciones farmacéuticas, que comprende i) al menos un antígeno seleccionado del grupo listado en el presente documento y ii) al menos un compuesto que reduce la capacidad de las células dendríticas para activar linfocitos intactos o recordar linfocitos activados o de memoria seleccionados del grupo: inhibidores de la COX; compuestos de CTLA-4; e inhibidores de TNF-alfa. Como un ejemplo, una de las al menos dos composiciones farmacéuticas puede comprender el al menos un antígeno formulado en alumbre, solución salina o albúmina de suero humano como inyectable en un vial o jeringa precargado, y otra de las al menos dos composiciones farmacéuticas puede comprender un compuesto seleccionado del grupo inhibidores de la COX; un compuesto de CTLA-4; e inhibidores de TNF $\alpha$ .

20 También se desvela un kit que incluye al menos tres composiciones farmacéuticas, que comprende i) al menos un antígeno seleccionado del grupo listado en el presente documento; ii) al menos un compuesto inductor de IL-10 seleccionado del grupo que consiste en vitamina D, análogos de vitamina D e inhibidores de tirosina cinasas. y iii) al menos un compuesto que reduce la capacidad de las células dendríticas para activar linfocitos intactos o recordar linfocitos activados o de memoria seleccionados del grupo: inhibidores de la COX; compuestos de CTLA-4; e inhibidores de TNF-alfa. Como un ejemplo, una de las al menos tres composiciones farmacéuticas puede comprender el al menos un antígeno formulado en alumbre, solución salina o albúmina de suero humano como un inyectable en un vial o jeringa precargado, y otra de las al menos tres composiciones farmacéuticas puede comprender al menos un compuesto inductor de IL-10 seleccionado del grupo que consiste en vitamina D, análogos de vitamina D, ácido gamma-aminobutírico, análogos de ácido gamma-aminobutírico e inhibidores de tirosina cinasas, y una tercera de las al menos tres composiciones farmacéuticas puede comprender un compuesto seleccionado del grupo inhibidores de la COX; un compuesto de CTLA-4; e inhibidores de TNF $\alpha$ .

#### Uso médico

35 La composición de la presente divulgación que comprende GAD se puede usar en terapia, en la prevención y/o el tratamiento de diabetes de tipo 1, diabetes autoinmunitaria y diabetes autoinmunitaria latente. Por consiguiente, la composición de la presente divulgación puede ser una composición farmacéutica.

40 Según ciertas realizaciones, la composición es para su uso como medicamento, tal como para su uso en la prevención y/o el tratamiento de diabetes de tipo 1, diabetes autoinmunitaria y diabetes autoinmunitaria latente.

Según realizaciones particulares, la composición es para su uso en la prevención y/o el tratamiento de diabetes de tipo 1, tal como tipo 1.

45 Según otras realizaciones particulares, la composición es para su uso en la prevención y/o el tratamiento de diabetes autoinmunitaria.

Según otras realizaciones particulares, la composición es para su uso en la prevención y/o el tratamiento de diabetes autoinmunitaria latente.

50 Según aún otras realizaciones particulares, la composición es para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la reaparición de diabetes autoinmunitaria, tal como reaparición de diabetes autoinmunitaria en un individuo (por ejemplo, un ser humano) con diabetes autoinmunitaria que ha recibido un trasplante de células de los islotes u otras terapias celulares que incluyen terapia de células madre.

55 La presente invención proporciona en un aspecto adicional un autoantígeno en combinación con al menos un compuesto inductor de IL-10 para su uso en la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria.

60 Más particularmente, la presente invención proporciona GAD, en combinación con al menos un compuesto inductor de IL-10, tal como al menos un compuesto inductor de IL-10 seleccionado del grupo que consiste en vitamina D, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de diabetes de tipo 1, diabetes autoinmunitaria y diabetes autoinmunitaria latente.

65 Según realizaciones más particulares, GAD es GAD-65, un fragmento de la misma, derivado de la misma, o un nucleótido que codifica la misma. Según realizaciones más particulares, el autoantígeno de células beta es GAD-65. Según otras realizaciones particulares, el autoantígeno de células beta es un fragmento derivado de GAD-65 (es decir, un fragmento de GAD65).

- Según ciertas realizaciones, GAD se formula en un adyuvante.
- 5 Según realizaciones particulares, el adyuvante es alumbre.
- Según ciertas realizaciones, el al menos un compuesto inductor de IL-10 es vitamina D, tal como 1,25-dihidroxitamina D.
- 10 Según ciertas realizaciones, el autoantígeno se usa adicionalmente en combinación con un compuesto que reduce la capacidad de las células dendríticas para activar linfocitos T CD4+ intactos, tales como un inhibidor de la ciclooxigenasa, un compuesto de CTLA-4 o un inhibidor de TNF-alfa.
- 15 Según realizaciones particulares, dicho compuesto es un inhibidor de la ciclooxigenasa, seleccionado del grupo que consiste en ibuprofeno, dexibuprofeno, naproxeno, fenoprofeno, ketoprofeno, dexketoprofeno, flurbiprofeno, oxaprozina, loxoprofeno, indometacina, tolmetina, sulindaco, etodolaco, ketorolaco, diclofenaco, aceclofenaco, nabumetona, aspirina (ácido acetilsalicílico), diflunisal (Dolobid), ácido salicílico, salsalato (Disalcid), piroxicam, meloxicam, tenoxicam, droxicam, lornoxicam, isoxicam, ácido mefenámico, ácido meclofenámico, ácido flufenámico, ácido tolfenámico, celecoxib, rofecoxib, valdecoxib, parecoxib, lumiracoxib, etoricoxib y nimesulida.
- 20 Según ciertas realizaciones, el inhibidor de la ciclooxigenasa es un derivado de ácido propiónico, tal como ibuprofeno, dexibuprofeno, naproxeno, fenoprofeno, ketoprofeno, dexketoprofeno, flurbiprofeno, oxaprozina o loxoprofeno.
- 25 Según ciertas realizaciones, el inhibidor de la ciclooxigenasa es un derivado de ácido acético, tal como indometacina, tolmetina, sulindaco, etodolaco, ketorolaco, diclofenaco, aceclofenaco o nabumetona.
- Según ciertas realizaciones, el inhibidor de la ciclooxigenasa es un salicilato, tal como aspirina (ácido acetilsalicílico), diflunisal (Dolobid), ácido salicílico o salsalato.
- 30 Según ciertas realizaciones, el inhibidor de la ciclooxigenasa es un derivado de ácido enólico (oxicámico), tal como piroxicam, meloxicam, tenoxicam, droxicam, lornoxicam o isoxicam.
- Según ciertas realizaciones, el inhibidor de la ciclooxigenasa es un derivado de ácido antranílico, tal como ácido mefenámico, ácido meclofenámico, ácido flufenámico o ácido tolfenámico.
- 35 Según ciertas realizaciones, el inhibidor de la ciclooxigenasa es inhibidor selectivo de la COX-2, tal como celecoxib, rofecoxib, valdecoxib, parecoxib, lumiracoxib o etoricoxib.
- 40 Según realizaciones más particulares, el inhibidor de la ciclooxigenasa es ibuprofeno.
- Según realizaciones más particulares, el inhibidor de la ciclooxigenasa es dexibuprofeno.
- Según realizaciones más particulares, el inhibidor de la ciclooxigenasa es naproxeno.
- 45 Según realizaciones más particulares, el inhibidor de la ciclooxigenasa es fenoprofeno.
- Según realizaciones más particulares, el inhibidor de la ciclooxigenasa es ketoprofeno.
- Según realizaciones más particulares, el inhibidor de la ciclooxigenasa es dexketoprofeno.
- 50 Según realizaciones más particulares, el inhibidor de la ciclooxigenasa es flurbiprofeno.
- Según realizaciones más particulares, el inhibidor de la ciclooxigenasa es oxaprozina.
- 55 Según realizaciones más particulares, el inhibidor de la ciclooxigenasa es loxoprofeno.
- Según realizaciones más particulares, el inhibidor de la ciclooxigenasa es indometacina.
- 60 Según otras realizaciones particulares, dicho compuesto es un abatacept.
- Según otras realizaciones particulares, dicho compuesto es adalimumab, certolizumab, etanercept, golimumab o infliximab. Según realizaciones más particulares, el inhibidor de TNF-alfa es adalimumab. Según otras realizaciones más particulares, el inhibidor de TNF-alfa es certolizumab. Según otras realizaciones más particulares, el inhibidor de TNF-alfa es etanercept. Según otras realizaciones más particulares, el inhibidor de TNF-alfa es golimumab.
- 65 Según otras realizaciones más particulares, el inhibidor de TNF-alfa es infliximab.

Según otras realizaciones particulares, GAD es para su uso en la prevención y/o el tratamiento de diabetes autoinmunitaria latente, tal como diabetes autoinmunitaria latente en un individuo positivo para anticuerpos contra GAD.

5 Según realizaciones particulares, la enfermedad autoinmunitaria es diabetes de tipo 1.

Según otras realizaciones particulares, la enfermedad autoinmunitaria es diabetes autoinmunitaria.

Según otras realizaciones particulares, la enfermedad autoinmunitaria es diabetes autoinmunitaria latente.

10 Según otras realizaciones particulares, la enfermedad autoinmunitaria es la reaparición de diabetes autoinmunitaria, tal como reaparición de diabetes autoinmunitaria en un individuo (por ejemplo, un ser humano) con diabetes autoinmunitaria que se ha sometido a trasplante de células de los islotes u otras terapias celulares que incluyen terapia con células madre.

15 Por tanto, la presente invención proporciona una combinación (por ejemplo, una combinación terapéutica) que comprende al menos GAD y al menos un compuesto inductor de IL-10.

20 Más particularmente, la presente invención proporciona una combinación (por ejemplo, una combinación terapéutica) que comprende i) al menos GAD, y ii) al menos un compuesto inductor de IL-10 seleccionado del grupo que consiste en vitamina D.

Según realizaciones particulares, el GAD es GAD-65 que incluye fragmentos de la misma, derivados de la misma, o un nucleótido que codifica la misma.

25 Según realizaciones más particulares, GAD es GAD-65, un fragmento de la misma, derivado de la misma, o un nucleótido que codifica la misma. Según realizaciones más particulares, el autoantígeno de células beta es GAD-65. Según otras realizaciones particulares, el autoantígeno de células beta es un fragmento derivado de GAD-65 (es decir, un fragmento de GAD65).

30 La combinación según la invención puede comprender más de un autoantígeno. Así, según ciertas realizaciones, la combinación comprende al menos dos autoantígenos. Según ciertas otras realizaciones, la combinación comprende al menos tres autoantígenos. Según ciertas otras realizaciones, la combinación comprende al menos cuatro autoantígenos.

35 Por tanto, según realizaciones particulares, la combinación comprende al menos GAD, tal como GAD-65, e insulina.

Según otras realizaciones particulares, la combinación comprende al menos GAD, tal como GAD-65, e insulina de la cadena B.

40 Según otras realizaciones particulares, la combinación comprende al menos GAD, tal como GAD-65, y proinsulina.

Según realizaciones particulares, la combinación comprende al menos GAD, tal como GAD-65, insulina e insulina de la cadena B. Según otra realización particular, la combinación comprende al menos GAD, tal como GAD-65, insulina y proinsulina. Según aún otras realizaciones particulares, la combinación comprende al menos GAD, tal como GAD-65, insulina de la cadena B y proinsulina.

45 Según otras realizaciones particulares, la combinación comprende GAD, tal como GAD-65, insulina, insulina de la cadena B e insulina de la cadena B.

50 Según ciertas realizaciones, el al menos un autoantígeno, tal como the los menos dos autoantígenos o al menos tres autoantígenos, se formula en un adyuvante.

Según realizaciones particulares, el adyuvante es alumbre.

55 Según realizaciones particulares, el al menos un compuesto inductor de IL-10 es vitamina D.

Según realizaciones más particulares, el al menos un compuesto inductor de IL-10 es 1,25-dihidroxitamina D.

60 La combinación según la invención puede comprender más de un compuesto inductor de IL-10. Así, según ciertas realizaciones, la combinación comprende al menos dos compuestos inductores de IL-10. Según ciertas otras realizaciones, la combinación comprende al menos tres compuestos inductores de IL-10. Según ciertas otras realizaciones, la combinación comprende al menos cuatro compuestos inductores de IL-10.

65 Según ciertas realizaciones, la combinación comprende además iii) un compuesto que reduce la capacidad de las células dendríticas para activar linfocitos T CD4+ intactos, tales como un inhibidor de la ciclooxigenasa, un

compuesto de CTLA-4 o un inhibidor de TNF-alfa.

- 5 Según realizaciones particulares, dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste en ibuprofeno, dexibuprofeno, naproxeno, fenoprofeno, ketoprofeno, dexketoprofeno, flurbiprofeno, oxaprozina, loxoprofeno, indometacina, tolmetina, sulindaco, etodolaco, ketorolaco, diclofenaco, aceclofenaco, nabumetona, aspirina (ácido acetilsalicílico), diflunisal (Dolobid), ácido salicílico, salsalato (Disalcid), piroxicam, meloxicam, tenoxicam, droxicam, lornoxicam, isoxicam, ácido mefenámico, ácido meclofenámico, ácido flufenámico, ácido tolfenámico, celecoxib, rofecoxib, valdecoxib, parecoxib, lumiracoxib, etoricoxib y nimesulida.
- 10 Según ciertas realizaciones, el inhibidor de la ciclooxigenasa es un derivado de ácido propiónico, tal como ibuprofeno, dexibuprofeno, naproxeno, fenoprofeno, ketoprofeno, dexketoprofeno, flurbiprofeno, oxaprozina o loxoprofeno.
- 15 Según ciertas realizaciones, el inhibidor de la ciclooxigenasa es un derivado de ácido acético, tal como indometacina, tolmetina, sulindaco, etodolaco, ketorolaco, diclofenaco, aceclofenaco o nabumetona.
- Según ciertas realizaciones, el inhibidor de la ciclooxigenasa es un salicilato, tal como aspirina (ácido acetilsalicílico), diflunisal (Dolobid), ácido salicílico o salsalato.
- 20 Según ciertas realizaciones, el inhibidor de la ciclooxigenasa es un derivado de ácido enólico (oxicámico), tal como piroxicam, meloxicam, tenoxicam, droxicam, lornoxicam o isoxicam.
- Según ciertas realizaciones, el inhibidor de la ciclooxigenasa es un derivado de ácido antranílico, tal como ácido mefenámico, ácido meclofenámico, ácido flufenámico o ácido tolfenámico.
- 25 Según ciertas realizaciones, el inhibidor de la ciclooxigenasa es inhibidor selectivo de la COX-2, tal como celecoxib, rofecoxib, valdecoxib, parecoxib, lumiracoxib o etoricoxib.
- Según realizaciones más particulares, el inhibidor de la ciclooxigenasa es ibuprofeno.
- 30 Según realizaciones más particulares, el inhibidor de la ciclooxigenasa es dexibuprofeno.
- Según realizaciones más particulares, el inhibidor de la ciclooxigenasa es naproxeno.
- 35 Según realizaciones más particulares, el inhibidor de la ciclooxigenasa es fenoprofeno.
- Según realizaciones más particulares, el inhibidor de la ciclooxigenasa es ketoprofeno.
- Según realizaciones más particulares, el inhibidor de la ciclooxigenasa es dexketoprofeno.
- 40 Según realizaciones más particulares, el inhibidor de la ciclooxigenasa es flurbiprofeno.
- Según realizaciones más particulares, el inhibidor de la ciclooxigenasa es oxaprozina.
- 45 Según realizaciones más particulares, el inhibidor de la ciclooxigenasa es loxoprofeno.
- Según realizaciones más particulares, el inhibidor de la ciclooxigenasa es indometacina.
- Según otras realizaciones particulares, dicho compuesto es abatacept.
- 50 Según otras realizaciones particulares, dicho compuesto es adalimumab, certolizumab, etanercept, golimumab o infliximab. Según realizaciones más particulares, el inhibidor de TNF-alfa es adalimumab. Según otras realizaciones más particulares, el inhibidor de TNF-alfa es certolizumab. Según otras realizaciones más particulares, el inhibidor de TNF-alfa es etanercept. Según otras realizaciones más particulares, el inhibidor de TNF-alfa es golimumab.
- 55 Según otras realizaciones más particulares, el inhibidor de TNF-alfa es infliximab.
- La combinación de la presente invención se puede usar en terapia según la invención. Por consiguiente, la combinación de la presente invención puede ser una combinación terapéutica.
- 60 Según ciertas realizaciones, la combinación es para su uso como medicamento como se desvela en el presente documento.
- Según realizaciones particulares, la combinación es para su uso en la prevención y/o el tratamiento de diabetes de tipo 1.
- 65 Según otras realizaciones particulares, la combinación es para su uso en la prevención y/o el tratamiento de

diabetes autoinmunitaria.

Según otras realizaciones particulares, la combinación es para su uso en la prevención y/o el tratamiento de diabetes autoinmunitaria latente.

5 Según aún otras realizaciones particulares, la combinación es para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la reaparición de diabetes autoinmunitaria, tal como reaparición de diabetes autoinmunitaria en un individuo (por ejemplo, un ser humano) con diabetes autoinmunitaria que se ha sometido a trasplante de células de los islotes u otras terapias celulares que incluyen terapia con célula madre.

10 La presente invención proporciona en un aspecto adicional GAD para su uso en método(s) para la prevención y/o el tratamiento de diabetes de tipo 1, diabetes autoinmunitaria y diabetes autoinmunitaria latente, en un individuo en necesidad del mismo, el (los) método(s) comprende(n) administrar a dicho individuo GAD como se detalló anteriormente; y administrar a dicho individuo al menos un compuesto inductor de IL-10, tal como al menos un compuesto inductor de IL-10 como se detalló anteriormente.

15 Según ciertas realizaciones, los métodos comprenden además administrar a dicho individuo un compuesto que reduce la capacidad de las células dendríticas para activar linfocitos T CD4+ intactos, tales como un compuesto que reduce la capacidad de las células dendríticas para activar linfocitos T CD4+ intactos como se detalló anteriormente.

20 Según ciertas realizaciones, el individuo que se va a tratar según la presente invención es un mamífero.

Según realizaciones particulares, el individuo que se va a tratar según la presente invención es un ser humano.

25 Según ciertas realizaciones, el individuo que se va a tratar según la presente invención es un adulto.

Según realizaciones particulares, el individuo que se va a tratar según la presente invención es un humano adulto.

30 Los medicamentos, composiciones farmacéuticas o combinaciones terapéuticas según la presente divulgación pueden estar en cualquier forma adecuada para la administración a seres humanos y/o animales, preferentemente seres humanos que incluyen lactantes, niños y adultos, y se pueden producir mediante procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la técnica. El medicamento, composición (farmacéutica) o combinación terapéutica se puede producir mediante procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, del índice de "Pharmaceutics: The Science of Dosage Forms", Segunda Edición, Aulton, M.E. (ED. Churchill Livingstone, Edinburg (2002); "Encyclopedia of Pharmaceutical Technology", Segunda Edición, Swarbrick, J. and Boylan J.C. (Eds.), Marcel Dekker, Inc. New York (2002); "Modern Pharmaceutics", Cuarta Edición, Banker G.S. and Rhodes C.T. (Eds.) Marcel Dekker, Inc. New York 2002 y "The Theory and Practice of Industrial Pharmacy", Lachman L., Lieberman H. And Kanig J. (Eds.), Lea & Febiger, Philadelphia (1986).

40 Los términos "medicamento", "composición farmacéutica" y "formulaciones farmacéuticas" se pueden usar indistintamente. El al menos un compuesto inductor de IL-10 usado según la presente invención se puede administrar, por ejemplo, por vía parenteral, que incluye inyección intramuscular, intraperitoneal o intravenosa, administración transmucosa o sublingual; o por vía oral, que incluye administración como comprimidos, pellas, gránulos, cápsulas, pastillas para chupar, disoluciones acuosas o aceitosas, suspensiones, emulsiones, esprays o como forma en polvo seco reconstituido con un medio líquido.

El medicamento, composición farmacéutica o combinación terapéutica según la presente invención puede comprender además uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

50 Los vehículos, diluyentes y excipientes que son adecuados para la preparación de un medicamento, composición farmacéutica o combinación terapéutica según la presente invención se conocen bien por los expertos en la técnica, por ejemplo del "Handbook of Pharmaceutical Excipients" Sexta Edición, Raymond C. Rowe, Paul J. Sheskey and Marian E Quinn (Eds.), American Pharmaceutical Association (julio de 2009).

55 GAD y el al menos un compuesto inductor de IL-10 se pueden administrar simultáneamente o por separado. Según ciertas realizaciones, GAD y el al menos un compuesto inductor de IL-10 se administran simultáneamente. Según ciertas realizaciones, GAD y el al menos un compuesto inductor de IL-10 se administran por separado.

60 Según ciertas realizaciones, el al menos un compuesto inductor de IL-10 se administra antes de la administración del al menos un autoantígeno. Según realizaciones particulares, el al menos un compuesto inductor de IL-10 se administra al menos un día, tal como al menos dos días, al menos tres días, al menos cuatro días, al menos cinco días, al menos seis días o al menos una semana, antes de la primera administración del al menos un autoantígeno. Por tanto, según dichas realizaciones, un ciclo de compuesto inductor de IL-10(s) comienza al menos un día, tal como al menos dos días, al menos tres días, al menos cuatro días, al menos cinco días, al menos seis días o al menos una semana antes de la primera administración del al menos un autoantígeno.

65

Según realizaciones más particulares, el al menos un compuesto inductor de IL-10 se administra al menos una semana, tal como al menos dos semanas, antes de la primera administración del al menos un autoantígeno. Por tanto, según dichas realizaciones, un ciclo de compuesto(s) inductor(es) de IL-10 comienza al menos una semana, tal como al menos dos semanas, antes de la primera administración del al menos un autoantígeno.

5 El compuesto que reduce la capacidad de las células dendríticas para activar linfocitos T CD4+ intactos se puede administrar simultáneamente o por separado con el al menos un autoantígeno y/o el al menos un compuesto inductor de IL-10. Según ciertas realizaciones, abatacept se administra simultáneamente con el al menos un autoantígeno. Según ciertas otras realizaciones, el compuesto que reduce la capacidad de las células dendríticas para activar linfocitos T CD4+ intactos se administra por separado a al menos un autoantígeno.

10 Según ciertas realizaciones, el al menos un compuesto inductor de IL-10 y el compuesto que reduce la capacidad de las células dendríticas para activar linfocitos T CD4+ intactos se administran simultáneamente. Según ciertas realizaciones, el al menos un compuesto inductor de IL-10 y el compuesto que reduce la capacidad de las células dendríticas para activar linfocitos T CD4+ intactos se administran por separado.

15 Según realizaciones particulares, el compuesto que reduce la capacidad de las células dendríticas para activar linfocitos T CD4+ intactos, tales como por ejemplo 10 mg/kg de abatacept, se administra +/- 7 días alrededor del momento de la primera administración de GAD.

20 Según ciertas realizaciones, la administración de GAD y la administración del compuesto que reduce la capacidad de las células dendríticas para activar linfocitos T CD4+ intactos se repite en el día 14, 28 y 45 +/- una semana según lo requiera el caso para garantizar el bloqueo de CD28 sobre linfocitos T.

25 Según ciertas realizaciones, al menos una dosis de 2-20 ug de GAD, tal como GAD-65, opcionalmente formulada en alumbre, se administra por ocasión de tratamiento.

30 Según ciertas realizaciones, al menos 1000-2000 UI de vitamina D, tal como vitamina D3, se administra por ocasión de tratamiento.

35 Según ciertas realizaciones, las APCs se hacen más tolerogénicas administrando entre 7.000 - 70.000 UI de vitamina D, tal como vitamina D3, por semana durante entre 1-10 semanas antes de la primera administración del al menos un autoantígeno y durante 4 semanas después de la última administración del al menos un autoantígeno.

Según ciertas realizaciones, las administraciones de GAD, tales como GAD-65, formuladas opcionalmente en alumbre, se preparan aproximadamente una semana después de cada administración del compuesto que reduce la capacidad de las células dendríticas para activar linfocitos T CD4+ intactos.

40 Según ciertas realizaciones, se administra al menos una dosis de 400 mg de AINE, tal como ibuprofeno, por ocasión de tratamiento.

45 La invención supone el entendimiento de métodos convencionales de biología molecular que incluyen técnicas para manipular polinucleótidos que se conocen bien por el experto habitual en la técnica de la biología molecular. Los ejemplos de dichas técnicas bien conocidas se pueden encontrar en Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2ª Edición, Sambrook et al., Cold Spring Harbor, N.Y. (1989). Los ejemplos de técnicas convencionales de biología molecular incluyen, pero no se limitan a, ligación *in vitro*, digestión con endonucleasa de restricción, PCR, transformación celular, hibridación, electroforesis, secuenciación de ADN y similares.

50 La invención también supone el entendimiento de métodos inmunobiológicos convencionales que se conocen bien por el experto habitual en la técnica de la inmunología. Se pueden encontrar información básica y métodos en Current Protocols in Immunology, editores Bierer et al., 4 volúmenes, John Wiley & Sons, Inc., que incluyen enseñanzas referentes a: Cuidado y manipulación de animales de laboratorio, Inducción de respuestas inmunitarias, Ensayos *in vitro* para la función de linfocitos, Ensayos *in vivo* para la función de linfocitos, Inmunofluorescencia y clasificación de células, Citocinas y sus receptores celulares, Estudios inmunológicos en seres humanos, Aislamiento y análisis de proteínas, Péptidos, Biología molecular, Bioquímica de activación celular, Complemento, Inmunidad innata, Modelos animales para enfermedad autoinmunitaria e inflamatoria (que incluye capítulos sobre el modelo de ratón NOD, el modelo de ratón SLE (para lupus) e inducción de enfermedad autoinmunitaria por agotamiento de linfocitos T reguladores), Procesamiento y presentación de antígenos, Ingeniería de moléculas inmunitarias y receptores, Interacciones ligando-receptor en el sistema inmunitario, Microscopía y abreviaturas y Terminología para genes y proteínas del sistema inmunitario común, que incluye el sistema CD para moléculas de la superficie de leucocitos.

### Ejemplos

65 Los siguientes ejemplos desvelan estudios que se pueden realizar para establecer la seguridad y eficacia de diversos aspectos de la presente invención. El autoantígeno de células beta usado en los ejemplos es

descarboxilasa de ácido glutámico (GAD).

Ejemplo 1

5 *Ensayo piloto para conservar la secreción residual de insulina en adultos con diabetes de tipo 1 de aparición reciente administrando terapia con antígenos de GAD (Diamyd®) en los ganglios linfáticos. (DIAGNODE)*

1.1 Antecedentes y fundamento

10 La incidencia de la diabetes de tipo 1 (T1D) en los niños es en Suecia, junto con la de Finlandia, la más alta del mundo, y está aumentando rápidamente. T1D es por mucho la enfermedad crónica más común, grave, posiblemente mortal, entre niños y adolescentes en nuestro país, y la incidencia de diabetes de tipo 1 también es alta en adultos jóvenes. La enfermedad tiende a ser un problema global extremadamente grave. La enfermedad se caracteriza por carecer de insulina. Aún cuando varios pacientes en el diagnóstico tienen función residual de células beta bastante sorprendente (1), la deficiencia llega a ser pronto muy pronunciada y finalmente completa (2,3). La secreción residual de insulina es de importancia crucial. En raros casos, la función de las células beta mejora tanto poco después del diagnóstico, que se normaliza el metabolismo de la glucosa y no se requiere insulina durante un cierto tiempo, es decir, el paciente entra en la denominada remisión completa (4). En tanto que el paciente esté en una remisión completa, no existe necesidad de tratamiento activo, más que tal vez alguna recomendación de un estilo de vida saludable en relación con el ejercicio físico y la dieta. No existen síntomas, ninguna complicación aguda y si alguien se quedara en remisión completa, es poco probable que dicho individuo desarrollara alguna vez complicaciones tardías. La ligera anomalía del metabolismo de la glucosa o de los lípidos podría aumentar el riesgo de complicaciones macrovasculares de la misma forma que para individuos con diabetes química o intolerancia a la glucosa. La remisión completa es rara, pero no la remisión parcial (4). Durante este periodo, el paciente normalmente tiene valores de glucosa en sangre casi normales, ni incluso hipoglucemia leve ni episodios de cetoacidosis. La calidad de vida es muy buena, ya que el paciente se siente bien, los niños crecen normalmente, se necesitan pocas restricciones, si las hay, con respecto a la comida, los pacientes pueden hacer ejercicio con gran variación sin que se produzca hipoglucemia, y tienen muy buenas pruebas de glucosa en sangre en casa. Solo alguna secreción residual de insulina es suficiente para disminuir el riesgo de cetoacidosis (5). Además, se ha mostrado en el ensayo de DCCT que la secreción residual de insulina incluso bastante modesta, una respuesta a una estimulación de células beta con péptido C en suero >0,20 pmol/ml, desempeña una función importante para la prevención de complicaciones (6). Este efecto puede ser debido al hecho de que la secreción residual de insulina debe facilitar razonablemente alcanzar un buen equilibrio de glucosa en sangre, pero también es posible que el péptido C en sí tenga una función fisiológica. De hecho, se ha informado que el péptido C influye en la permeabilidad vascular, disminuye la fuga en el vaso retiniano y, no menos importante, tiene un efecto positivo sobre la función nerviosa (7), aunque el efecto del péptido C en sí está aún en debate.

1.1.1 Factores que influyen en el ciclo natural

40 En el diagnóstico de la T1D, se ha reivindicado que se ha destruido el 80-90 % de las células beta en el páncreas. Sin embargo, las pruebas de esto son escasas, y bien puede ser que el principal problema sea el deterioro de la función. Además, existe una gran diferencia entre pacientes, ya que algunos tienen secreción residual de insulina bastante buena y otros no tienen. Poco después del diagnóstico, especialmente cuando se administra un tratamiento con insulina activa, existe un aumento de la producción de péptido C, y al mismo tiempo una mejora de la sensibilidad a la insulina. Se preserva el buen control metabólico para mejorar el medio y el metabolismo para las células beta y la función de células beta, que a su vez contribuye a un mejor control metabólico, y viceversa. La intensidad del proceso autoinmunitario desempeña una función, y parece evidente que los niños tengan un proceso inmunitario más agresivo que los adultos con diabetes de tipo 1, pero todavía es difícil predecir el ciclo. Algunos estudios han sugerido que altas concentraciones de autoanticuerpos van seguidas por una pérdida más rápida de la secreción de insulina, mientras que otros no han encontrado dicha relación, o incluso lo opuesto. Hasta la fecha, no se han demostrado signos especiales de inmunidad celular para predecir la pérdida de células beta, pero nuestros propios estudios han mostrado que el proceso de enfermedad está relacionado con una desviación de cooperadores T 1 (Th-1) del sistema inmunitario con aumentos de ciertas citocinas tales como IFN $\gamma$  y disminución de IL-10, IL-13.

55 *El efecto del tratamiento con insulina sobre la función de células beta.*

El tratamiento con insulina activa durante el primer periodo de la enfermedad prolongó la remisión parcial hace mucho tiempo, y este hallazgo se podría confirmar y validar por la secreción residual mejorada de insulina (2). Parece que el tratamiento intensificado mejora la función residual de células beta al menos durante algún tiempo (8), pero también puede tener efectos positivos a largo plazo (9). Se ha mostrado que el tratamiento activo no solo previene o pospone la diabetes en animales experimentales, sino que los estudios han indicado que dicho tratamiento podría prevenir la diabetes en individuos de alto riesgo (10). Sin embargo, cuando se probó a una mayor escala en el ensayo de prevención de diabetes, el tratamiento parenteral con insulina no previno la diabetes (11). El tratamiento oral con insulina podría tener un efecto (12) y, por tanto, se necesitan estudios adicionales.

1.1.2 Intervenciones

En los años 70 fue evidente que la T1D era una enfermedad autoinmunitaria y, por tanto, se probaron intervenciones inmunitarias. Los presentes inventores realizaron los primeros estudios de intervención inmunitaria en el mundo en niños diabéticos cuando los presentes inventores ya habían usado hace 30 años la plasmáferesis en niños recién diagnosticados y adolescentes con algunos efectos positivos (13). Como efecto secundario de ese tratamiento, se encontró una nueva proteína con el peso de 64 kD en el plasma (14), que después demostró ser la descarboxilasa de ácido glutámico (GAD). El gran avance, tomado como una prueba del concepto de intervención inmunitaria, fue la ciclosporina, que indudablemente ralentizó el proceso destructivo autoinmunitario y dio secreción residual mejorada de insulina, mientras que otros ensayos con inmunosupresión tuvieron efecto mínimo, especialmente en los niños (15, 16,17), o mostraron demasiados acontecimientos adversos graves o riesgos (18, 19). En un esfuerzo por modular el sistema inmunitario, los presentes inventores usaron fotoféresis. Aunque los claros efectos sobre el sistema inmunitario se demostraron en un ensayo de doble ciego controlado por placebo (20), el efecto clínico fue mínimo y casi no se pudo observar mejora de la función residual de células beta (21). Así, sin intervención inmunitaria satisfactoria, el interés de los presentes inventores se refirió a agentes protectores tales como nicotinamida y diazóxido, sin efecto o con efecto transitorio (22, 23, 24).

Con el creciente conocimiento del proceso inmunitario que conduce a la destrucción de las células beta, ha llegado a ser posible dirigir con más precisión la intervención inmunitaria a inactivar linfocitos T importantes. Se han realizado estudios prometedores usando anticuerpos anti-CD3 en un intento por bloquear el proceso inmunitario destructor. Los resultados de tanto ensayos norteamericanos como franceses con anti-CD3 han mostrado que es posible bloquear el proceso autoinmunitario destructor y así al menos posponer la disminución de la función de células beta (25,26). La disminución de la secreción residual de insulina se ralentizó significativamente, pero desafortunadamente parece como si la disminución solo se hubiera retrasado un año, y a partir de aquí la curva decreciente de péptido C fue paralela a la curva decreciente en el grupo de placebo. Además, la mayoría de los pacientes experimentan cierto síndrome de liberación de citocinas (CRS), que puede ser bastante grave, y además, se observaron varios efectos secundarios en la mayoría de los pacientes. Los presentes inventores han participado en uno de los dos ensayos recientes de fase III (ensayo Protegé), que no alcanzó el criterio de evaluación principal, aunque el grupo con el tratamiento más intenso mostró de hecho cierta preservación de la secreción residual de insulina y menor requisito de insulina para alcanzar una buena HbA1c (27; Sherry, Hagopian, Ludvigsson et al. Lancet 2011). Se necesitan nuevos estudios, pero es difícil creer que este tipo de tratamiento solo será la solución aceptada para uso clínico general. Es aún menos probable que dicho tratamiento se aceptara como tratamiento preventivo en individuos por lo demás sanos, de los que muchos nunca desarrollarían la diabetes.

### 1.1.3 Inmunoterapia con auto-antígenos

En el tratamiento de enfermedades alérgicas, se ha usado eficientemente durante muchos años la inmunoterapia con una pequeña cantidad de antígeno específico de la enfermedad. El mecanismo para este tratamiento sigue sin estar claro, aunque se ha sugerido la inmunomodulación de las respuestas inmunitarias y la inducción de células reguladoras. En enfermedades autoinmunitarias, ningún tratamiento de este tipo ha sido satisfactorio, pero se debe probar (28). Los experimentos en animales propensos a la diabetes han mostrado que el tratamiento con una proteína de choque térmico podría retrasar o posponer el desarrollo de la diabetes. El uso del péptido Diapep277 en un estudio en adultos mostró la significativa preservación de la secreción de insulina sin casi ningún acontecimiento adverso (29). Después de los ensayos en niños y adolescentes con T1D (30), sin embargo, no han mostrado efecto. Están en curso estudios con tratamiento con Diapep277 en la denominado LADA (diabetes autoinmunitaria latente del adulto), y los resultados preliminares (informe en IDF, Dubai Dic 2011 y en ADA Junio 2012) sugieren que el tratamiento con Diapep277 puede preservar la función de las células beta en adultos con diabetes de tipo 1 leve. Sin embargo, los resultados son un poco confusos, ya que hubo una débil preservación del péptido C solo observada después de la estimulación por glucagón, pero ningún efecto en absoluto después de la prueba de intolerancia a alimentos mixtos, y no hubo diferencias en absoluto entre el grupo activamente tratado y el placebo en marcadores inmunitarios. Se ha mostrado que el tratamiento activo con insulina no solo previene o pospone la diabetes en animales experimentales, sino que estudios abiertos preliminares indicaron que dicho tratamiento podría prevenir la diabetes en individuos de alto riesgo (10). La insulina, claramente un auto-antígeno específico de células beta, se ha administrado parentalmente (DPT) para prevenir la diabetes en individuos de alto riesgo sin efecto, mientras que la administración de insulina oral con el mismo fin puede tener un ligero efecto (12).

### 1.1.4 Estudios clínicos previos con GAD-alumbre

#### 1.1.4.1 Vacunación con GAD

La GAD (descarboxilasa de ácido glutámico) se puede considerar un auto-antígeno, ya que se produce en los islotes con elevada liberación como respuesta a la estimulación de células beta. Se ha mostrado que esta proteína influye profundamente en el proceso inmunitario autoinmunitario (31, 32, 33, 34). Varios estudios han mostrado que de hecho la GAD puede prevenir la diabetes en animales experimentales (35-42). La similitud de GAD con las proteínas virales puede ser importante para la acción terapéutica. El efecto observado, incluso después del comienzo del proceso inmunitario, sugiere que podría ser posible esperar el mismo efecto en seres humanos después del comienzo del proceso inmunitario. En un estudio de fase II en pacientes con LADA, la administración de una dosis

baja, Diamyd 20 µg, condujo a la mejoría de la función de células beta durante hasta 2 años en comparación con el grupo tratado con placebo, sin efectos secundarios. También se probaron otras dosis: 4 µg no mostraron efecto, 100 µg mostraron un efecto similar a 20 µg, mientras que 500 µg no mostraron efecto. Ninguna de las dosis mostró acontecimientos adversos, aún así después de varios años de seguimiento (43). Se encontró la asociación con cambio en la relación de células CD4+CD25+/ CD4-CD25-, que indica un mecanismo para el efecto. Con estos antecedentes prometedores, los presentes inventores empezaron un estudio de fase II en pacientes con diabetes de tipo 1 de 10-18 años con aparición reciente. Basándose en la idea de que el tratamiento tuvo efecto sobre los pacientes con LADA lentamente progresiva, los presentes inventores incluyeron pacientes con hasta 18 meses de duración de la diabetes T1D en la intervención. Los pacientes se aleatorizaron a cualquiera de 20 µg de GAD-alumbre (Diamyd) sc en el Día 1 y 30, o placebo. Fue sorprendente el efecto aún después de 30 meses, y claramente tanto estadística como clínicamente significativo (44), con aproximadamente la mitad de la disminución del péptido C en el grupo tratado con GAD en comparación con el grupo de placebo. Los pacientes con una duración de la diabetes < 3 meses tuvieron un efecto sorprendentemente bueno sin disminución o con disminución mínima de la función de células beta durante el seguimiento de los primeros 15 meses. Casi todo el efecto se observó en pacientes con < 6 meses de duración en la vacunación. Incluso más, a diferencia de otros tratamientos de intervención, este efecto se obtuvo sin acontecimientos adversos en absoluto, haciendo que el tratamiento fuera muy alentador. Aún después de 48 meses, los pacientes tratados < 6 meses de duración tuvieron péptido C significativamente preservado y aún sin acontecimientos adversos (45). Hasta la fecha, el tratamiento con GAD pareció muy prometedor. Se realizaron dos ensayos de fase III, uno europeo con Johnny Ludvigsson (JL) como PI, y uno en EE. UU. con Jerry Palmer como PI y JL como coinvestigador. En el ensayo europeo, se reclutaron 334 pacientes en tres grupos, un grupo con GAD-alumbre (Diamyd) 20 µg en el Día 1, 30, 90 y 270, otro grupo con GAD-alumbre 20 µg en el Día 1 y 30, y placebo en el Día 90 y 270 y un tercer grupo con placebo en el Día 1, 30, 90 y 270. No se cumplió el criterio de evaluación principal, ABC del péptido C en suero después de una prueba de tolerancia a alimentos mixtos (MMTT) a los 15 meses (ABC de péptido C p=0,1; péptido C en ayunas p=0,07) (46). Esto dio pie a la empresa (Diamyd Medical + Johnson&Johnson) a cerrar con antelación los ensayos de fase III. Sin embargo, el ensayo de fase III mostró varios efectos positivos. Así, se observó eficacia estadísticamente significativa en varios subgrupos previamente especificados. Además, 45 pacientes suecos habían pasado la visita del mes 30 cuando se detuvo el estudio, y los 15 pacientes que habían recibido dos dosis de GAD-alumbre (Diamyd) 20 µg mostraron una preservación significativa de péptido C después de 30 meses en comparación con el placebo. Esto es especialmente sorprendente, ya que los pacientes suecos fueron aquellos sin eficacia después de 15 meses, mientras que la eficacia se encontró después de 15 meses en los países no nórdicos.

#### 1.1.4.2 Posibles motivos para los diferentes resultados de la fase II y la fase III

En la aleatorización de la fase III, los pacientes que recibieron fármaco activo estuvieron más frecuentemente en el grupo de edad de 10-11 años que en el grupo de edad de 16-18 años, mientras que el placebo fue más frecuente que el fármaco activo en el grupo de edad más alto. Esto puede haber influido en el resultado. Los pacientes de la fase II se trataron en marzo-abril y los pacientes en la fase III que se trataron en marzo-abril también tuvieron un efecto significativo del tratamiento con GAD. En el ensayo de fase II no se aceptaron vacunaciones, pero en la fase III se permitió la vacunación contra la gripe. Desafortunadamente, una epidemia de gripe H1N1 condujo a que se vacunaran casi todos los pacientes, muchos de ellos a propósito de las vacunaciones con GAD.

En Suecia y Finlandia, la vacuna contuvo escualeno, que se sospecha que influye en el sistema inmunitario hacia la auto-inmunidad, y en estos dos países no hubo eficacia del tratamiento con GAD, mientras que la eficacia fue significativa en otros países europeos. Los pacientes en Suecia que no se pusieron la vacuna de la gripe próxima al tratamiento con GAD tuvieron mejor eficacia del tratamiento con GAD (46).

#### 1.1.4.3 Ensayo DIABGAD-1 en curso

Desde enero de 2013 está en curso en Suecia el ensayo DIABGAD-1 de fase II. Es un ensayo en 60 pacientes, 10-18 años, con diabetes de tipo 1 de aparición reciente, que se tratan en un estudio aleatorizado de doble ciego controlado por placebo con GAD-alumbre 20 µg, respectivamente 40 µg, administrados dos veces con un intervalo de 30 días, en combinación con vitamina D, 2000 unidades al día durante 450 días, e ibuprofeno 400 mg al día durante 90 días. Se logró el reclutamiento y ahora está cerrado. Se aleatorizan 60 pacientes y se cribaron otros 4 pacientes, esperando a los resultados del cribado. Hasta la fecha no existen acontecimientos adversos graves juzgados como relacionados con la medicación del estudio, y acontecimientos adversos muy ligeros, no relacionados con el tratamiento, excepto por reacciones transitorias leves en el sitio de inyección de GAD-alumbre. Se planea un análisis provisional ya después de 6 meses de seguimiento de todos los pacientes, mientras que se realizarán análisis más extensos después de 15 y 30 meses.

#### 1.1.5. Inmunoterapia de ganglios intralinfáticos

La terapia con antígenos tiene como objetivo presentar el antígeno a los linfocitos T en los ganglios linfáticos para conseguir un nuevo equilibrio del sistema inmunitario y tolerancia contra el antígeno. En el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias hasta la fecha, el antígeno se ha administrado o por vía oral, vía intranasal, o por vía subcutánea, para presentar el antígeno a células presentadoras de antígeno / dendríticas que a su vez se espera

presenten el antígeno a los linfocitos T del sistema inmunitario. Sin embargo, estudios en animales han mostrado que las inyecciones intralinfáticas inducen una fuerte y relevante respuesta de los linfocitos T (47,48) y en el campo de la alergia estudios clínicos han mostrado que la presentación del antígeno/alérgeno directamente a los ganglios linfáticos parece ser más eficaz que la administración tradicional (49). Se pueden usar dosis más bajas del alérgeno, el número de tratamientos puede ser radicalmente reducido, y no han existido acontecimientos adversos relacionados con el tratamiento. Los ganglios linfáticos inguinales están fácilmente accesibles en pacientes y el dolor asociado a la inyección se clasifica como inferior al de la punción venosa (50). Con estos antecedentes, el objetivo de los presentes inventores es estudiar si el mismo enfoque se puede usar en pacientes con la forma autoinmunitaria de diabetes de tipo 1. Por motivos éticos, los presentes inventores harán el primer ensayo piloto en adultos.

## 1.2 Hipótesis

Los esperanzadores resultados del ensayo de GAD de fase II y los resultados parcialmente positivos del ensayo europeo de fase III respaldan el concepto de que la administración de GAD-alumbre (Diamyd) puede disminuir el proceso autoinmunitario y contribuir a la preservación de la secreción residual de insulina. Como los estudios previos han indicado que la dosis debe estar en algún lugar entre 20 y 100 µg de Diamyd, una dosis más baja de 3 µg administrada tres veces debe ser adecuada cuando se administra directamente en los ganglios linfáticos. La inyección de GAD-alumbre (Diamyd) directamente en los ganglios linfáticos no dará acontecimientos adversos graves, tendrá efectos inmunológicos deseados y mejorará (mostrado en futuros estudios) la eficacia

## 2. Análisis riesgo-beneficio

La incidencia de la diabetes de tipo 1 es en Suecia, junto con Finlandia, más alta que en cualquier otro país del mundo. La incidencia está aumentando continuamente desde hace décadas. La enfermedad no se puede curar y no se puede prevenir. A pesar de un tratamiento muy fuerte, intenso, caro, muchos pacientes sufren complicaciones tanto agudas como tardías graves potencialmente mortales, y la mortalidad es muy elevada. En el diagnóstico, muchos pacientes tienen cierta ligera secreción residual de insulina. En tanto que esto sea el caso, es mucho más fácil mantener la glucosa en sangre estable, la incidencia de hipoglucemia disminuye, así como el riesgo de cetoacidosis. La calidad de vida para el paciente, así como para los padres de los niños con diabetes, es mejor en tanto que exista cierta secreción residual de insulina.

La diabetes de tipo 1 en adultos se diferencia de la enfermedad en niños y adolescentes, ya que el proceso de enfermedad es frecuentemente más leve, la disminución de la secreción residual de insulina más lenta, y es más fácil controlar la glucosa en sangre. Sin embargo, aún existen grandes similitudes, tratamiento similar y complicaciones, y la preservación de la función de células beta también es muy importante en adultos.

Es evidente que existe un gran beneficio de preservación de la secreción residual de insulina, y, por tanto, terapias que tienen como objetivo la preservación de esta función justifican los tratamientos que son bastante fuertes, incluso peligrosos y caros. Así, se ha considerado como justificado tratar diabetes de tipo 1 en la aparición con fármacos como anticuerpos monoclonales contra el receptor de CD3, que provoca acontecimientos adversos en principalmente todos los pacientes, algunos acontecimientos adversos incluso bastante graves y riesgos. Se han usado incluso citostáticos puros.

En nuestro estudio propuesto, los presentes inventores usan GAD-alumbre (Diamyd) 4 µg x 3, un tratamiento que se ha usado a dosis mucho más grandes administradas a niños y adultos con casi ningún acontecimiento adverso observado durante el seguimiento de cientos de años-paciente. En el estudio de los presentes inventores, planean usar una dosis muy baja, que significa que se puede esperar que el riesgo general sea incluso más bajo, pero la administración será directamente en un ganglio linfático que podría dar reacciones locales. El efecto sobre el sistema inmunitario puede llegar a ser más pronunciado, pero no debe conducir a ningún efecto adverso. Estudios previos en alergia (donde una de las co-investigadoras, Helene Zachrisson, ha administrado las inyecciones intralinfáticas de alérgenos formulados con alumbre) no han mostrado ningún efecto adverso ni generalmente ni localmente). Por motivos de seguridad, ya que éste es el primer ensayo piloto con este tipo de tratamiento con autoantígenos en los nodos linfáticos, los presentes inventores prueban primero en adultos que pueden dar su consentimiento informado libre. Aún cuando la diabetes de tipo 1 en adultos es algo más leve que en pacientes más jóvenes, es de gran valor conservar la función de las células beta y, por tanto, el tratamiento propuesto puede ser de gran valor terapéutico también para pacientes adultos.

Cuando se resumen los pros y los contras, existe una clara posibilidad de beneficio terapéutico de gran importancia, tanto para los pacientes participantes, para pacientes en futuros estudios, mientras que el riesgo es muy pequeño. Si estos estudios contribuyen al desarrollo de un buen tratamiento, esto será de enorme valor para un gran número de pacientes.

## 3. Objetivo del presente estudio

El objetivo del presente estudio piloto de los presentes inventores es conseguir información sobre si se puede

administrar GAD-alumbre en los ganglios linfáticos sin acontecimientos adversos graves relacionados con el tratamiento, para permitir futuros estudios de fase II con la misma técnica para mejorar la eficacia en preservar la secreción residual de insulina en diabetes de tipo 1. Así, los presentes inventores quieren ver si este tratamiento produce cualquier acontecimiento adverso, y cómo las pautas de tratamiento influyen en el sistema inmunitario, provocan la desviación de Th-2 deseada, aumento de células T reguladoras y con suerte indicaciones de preservación de la función residual de células beta. Basándose en los resultados a corto plazo de este estudio piloto (seguimiento de 6 meses), los presentes inventores pueden entonces querer diseñar un ensayo de fase II más grande, para incluir pacientes más jóvenes y para conseguir información más robusta. El principal objetivo a largo plazo es entonces encontrar un tratamiento en la aparición de la diabetes de tipo 1 en pacientes jóvenes que sea tolerable para los pacientes, seguro y que pueda preservar la secreción residual de insulina y proporcionar a los pacientes una mejor calidad de vida, con menos complicaciones agudas y a la larga menos riesgo de complicaciones tardías.

#### 4. Objetivos

Objetivos:

Evaluar la seguridad de administrar Diamyd directamente en los ganglios linfáticos y para evaluar la respuesta inmunitaria (51-54) y el efecto sobre la preservación de la secreción endógena de insulina, medida en el nivel inicial y después de 6, 15 y 30 meses.

#### 5. Población

A pacientes adultos con aparición reciente de la diabetes de tipo 1 en el Hospital Universitario de Linköping se les da información sobre el estudio y se les pide que participen en el ensayo.

##### 5.1 Criterios de inclusión

1. Consentimiento informado dado por los pacientes y tutores/padres
2. Diabetes de tipo 1 según la clasificación de la ADA con < 6 meses de duración de la diabetes
3. Edad 18,00-29,99 años en el diagnóstico de diabetes de tipo 1
4. Péptido C en ayunas  $\geq 0,12$  nmol/ml
5. Pos GADA pero < 50.000 unidades aleatorias
6. Las mujeres deben acceder a evitar el embarazo y tener una prueba de embarazo en orina negativa
7. Los pacientes deben acceder a una anticoncepción adecuada, hasta 1 año después de la última administración de GAD-alumbre/placebo

##### 5.2 Criterios de exclusión

1. Tratamiento previo o actual con terapia inmunosupresora (aunque se aceptan esteroides tópicos o inhalados)
2. Tratamiento continuo con cualquier fármaco inflamatorio (se aceptará tratamiento esporádico, por ejemplo, debido a cefalea o relacionado con fiebre algunos días)
3. Tratamiento con cualquier medicación antidiabética oral o inyectada distinta de insulina
4. Antecedentes de anemia o resultados de hematología significativamente anormales en el cribado
5. Antecedentes de epilepsia, traumatismo craneoencefálico o accidente cerebrovascular, o características clínicas de actividad de la unidad motora continua en músculos proximales
6. Antecedentes clínicamente significativos de reacción aguda a las vacunas u otros fármacos en el pasado
7. Tratamiento con cualquier vacuna, que incluye vacuna contra la gripe, en el plazo de 4 meses antes de la primera dosis planeada del fármaco del estudio o tratamiento planeado con cualquier vacuna hasta 4 meses después de la última inyección con el fármaco del estudio.
8. Participación en otros ensayos clínicos con una nueva entidad química en el plazo los 3 meses previos
9. Incapacidad o indisposición para cumplir las provisiones de este protocolo
10. Antecedentes de alcoholismo o drogadicción
11. Una enfermedad significativa distinta de la diabetes en el plazo de 2 semanas antes de la primera dosis
12. Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o hepatitis
13. Mujeres en periodo de lactancia o embarazadas (se debe excluir la posibilidad de embarazo por  $\beta$ HCG en orina en el sitio en el plazo de 24 horas antes del tratamiento con GAD-alumbre)
14. Hombres o mujeres que no desean usar anticoncepción adecuada hasta 1 año después del último tratamiento con GAD-alumbre
15. Presencia de enfermedad o afección grave asociada, que incluye infecciones activas de la piel que descartan inyección subcutánea, que en opinión del investigador hacen que el paciente no sea elegible para el estudio
16. El investigador considera que no es capaz de seguir las instrucciones y/o seguir el protocolo del estudio

##### 5.3 Reclutamiento y cribado

A los sujetos elegibles se les explicará el estudio, y recibirán la información del paciente por escrito. Después de

haber tenido tiempo de revisar la naturaleza del estudio, tendrán la oportunidad de hacer preguntas a los miembros del equipo investigador. Si, después de esto, los sujetos aceptan participar, firmarán y fecharán personalmente la declaración de consentimiento informado por escrito. Entonces los pacientes recibirán una copia de la información del paciente / declaración de consentimiento informado firmada y fechada.

5  
5.4 Retirada de pacientes

Según la Declaración de Helsinki, el investigador debe explicar al paciente que tiene el derecho de retirarse del estudio en cualquier momento, y que esto no perjudicará de ninguna forma su futuro tratamiento. Sin embargo, a menos que ocurran problemas de seguridad, los presentes inventores planean seguir a los pacientes durante toda la duración del estudio para analizar las variables de eficacia y de seguridad, también para los pacientes que se retiran del estudio. El motivo de cualquier tipo de retirada se debe registrar en el CRF apropiado.

10  
15 Habrá diferentes categorías para las retiradas del estudio: Retirada completa (es decir, dejar el producto en investigación y también las evaluaciones continuas de eficacia y de seguridad)

Razones normales para la retirada de la participación adicional en el estudio y de las visitas de seguimiento (y <por ejemplo análisis de sangre >) pueden ser:

- 20
- Decisión del paciente (retirada del consentimiento para participar)
  - Paciente perdido de vista durante el seguimiento
  - Razones normales de la retirada de tomar producto en investigación adicional, pero continuación de las visitas de seguimiento y evaluaciones de seguridad pueden ser:
  - Acontecimientos adversos inaceptables
- 25
- Petición del paciente
  - Discreción del investigador
  - Paciente perdido de vista durante el seguimiento/no asistencia
  - Enfermedades intercurrentes
  - La paciente se queda embarazada

30 Así, la GAD-alumbre intralinfática no debe ser administrada al paciente si el paciente después de la inclusión en el estudio ha sufrido

- 35
- daño cerebral, epilepsia, traumatismo craneoencefálico, enfermedad neurológica
  - cualquier enfermedad hormonal activa grave distinta de diabetes de tipo 1
  - otra enfermedad autoinmunitaria intensa (excepto celiaquía que se acepta para la inclusión)
  - tratamiento inmunosupresor
  - cáncer, tratamiento para el cáncer
  - cualquier otro fármaco para la diabetes distinto de la insulina
- 40
- cualquier vacunación
  - drogadicción / alcoholismo o si la paciente
  - se ha quedado embarazada o ya no desea usar anticoncepción segura durante el estudio

45 Sin embargo, siempre que un paciente se retira de estudio, o cualquiera que sea la razón por la que no asiste a ninguna visita adicional, se debe completar una evaluación final del estudio para ese paciente (visita <>) – estableciendo el (los) motivo(s) por el (los) que el paciente se retiró del estudio. Toda la documentación referente al paciente debe ser tan completa como sea posible. Las retiradas debidas a la no asistencia deben ser seguidas por el investigador para obtener el motivo de la no asistencia. Las retiradas debidas a enfermedades intercurrentes o acontecimientos adversos deben ser completamente documentadas en el cuaderno de recogida de datos, con la adición de información suplementaria, si está disponible y/o es apropiado.

50

## 6. Procedimientos de tratamiento

55 6.1 Diseño del estudio y tratamiento

En ensayo es un estudio piloto unicéntrico, de etiqueta abierta, en pacientes con T1D GADA positivos de cualquier sexo, edad 18,00 a 29,99 años, diagnosticados con T1D en el plazo de 6 meses en el momento del cribado (Visita 1) y niveles de péptido C en ayunas iguales o superiores a 0,12 nmol/l. En total, se reclutarán aproximadamente 5 pacientes en un sitio en Linköping, Suecia. Los pacientes se evaluarán para elegibilidad en la visita de selección (Visita 1) 10 a 21 días antes del inicio del tratamiento. A los pacientes cribados se les asignará un número de cribado secuencial y este número de cribado se usará como identificación del paciente en todo el estudio.

60

Los pacientes que reúnen los requisitos para la inclusión en el estudio serán entonces reclutados en el estudio para recibir el fármaco en investigación del estudio en las posteriores visitas según la siguiente Tabla 1. Los pacientes

serán seguidos durante un periodo total del estudio de 30 meses que incluye 8 visitas al sitio.

Véase la Tabla 1 a continuación para una visión general de las visitas del estudio.

Tabla 1 Calendario de las visitas de los pacientes, ventanas de visita y administración del fármaco del estudio

Estudio	Cribado	Intervención				Seguimiento	
	Día -10 a -21 Cribado	Día 1 Nivel inicial	Día 30 ± 3	Día 60 ± 3	Día 180 ± 3 Mes 6	Día 450 ± 14 Mes 15	Día 900 ± 30 Mes 30
	Visita 1	Visita 2	Visita 3	Visita 4	Visita 6	Visita 7	Visita 8
GAD-Alumbre/PI acebo		Tratamiento con GAD- Alumbre	Tratamiento con GAD- Alumbre	Tratamiento con GAD- Alumbre			

## 6.2 Evaluaciones y procedimientos

1. Tratamiento convencional con insulina, educación y respaldo psicosocial para pacientes recién diagnosticados con diabetes de tipo 1.
2. Normalización del equilibrio de fluidos, electrolitos y ácido-base.
3. A partir de aquí, información sobre el estudio.
4. Cuando los pacientes hayan dado su consentimiento informado, a más tardar 120 días después del diagnóstico, se realiza el cribado con una muestra venosa en ayunas de pacientes que son elegibles según otros criterios distintos de las concentraciones de péptido C y GADA (Visita 1).
5. En el nivel inicial (Visita 2), 6, 15 y 30 meses, evaluación de la secreción residual de insulina endógena por MMTT. Se siguen HbA1c, seguridad (hematología y química), títulos de autoanticuerpos (GAD65, IA-2), inmunología, de muestras de sangre en cada visita del estudio. Se anotan la dosis de insulina exógena/24 horas, AEs y medicación concomitante en cada visita del estudio.
6. Hipoglucemia autoevaluada (definida como la necesidad de ayuda de otros y/o convulsiones y/o inconsciente) anotada en cada visita del estudio.
7. Cualquier síntoma o signo de otro problema médico debe ser tratado a criterio del doctor clínico.

Los exámenes se realizarán según la Tabla 2 en la Sección 7, más adelante, y en el orden expuesto en el cuaderno de recogida de datos (CRF).

### 6.2.1 Todas las visitas, Visita 1 a 7

Obsérvese que el paciente debe asistir a todas las visitas del estudio la mañana siguiente de un ayuno durante la noche (> 10 horas, se permite agua). Para pacientes con evidencia de una infección (incluyendo fiebre), la visita completa se deberá posponer durante 5 días o hasta que el paciente se haya recuperado.

### 6.2.2 Administraciones de GAD-alumbre, Visitas 2, 3 y 4

Después de la administración, el paciente debe permanecer en la proximidad del sitio del estudio durante la siguiente hora, y el sitio de administración será examinado por el investigador/enfermera del estudio 1 hora después de la inyección.

### 6.2.3 Prueba de tolerancia a alimentos mixtos (MMTT), Visitas 2, 5, 6 y 7

- La MMTT se debe realizar según las instrucciones en el CRF. El paciente:
- Debe acudir al sitio del estudio después de un ayuno durante la noche (>10 h), es decir, el paciente no puede comer, pero se permite que beba agua
- No debe tomar insulina de acción corta / de acción directa en el plazo de 6 horas antes de la MMTT. Se permite que el paciente tome insulina basal día/noche antes, pero no la mañana antes de la MMTT.
- Los pacientes con CSII (bomba de insulina) deben continuar con su insulina de dosis basal, pero no añadir dosis en bolo durante las últimas 6 horas antes de la MMTT
- Deben tener un nivel de glucosa en plasma en ayunas en el intervalo definido por 4-12 mmol/L en el medidor de glucosa en sangre de casa del paciente la mañana de la prueba Si el paciente no cumple todos los criterios anteriores, la MMTT debe ser reprogramada y el paciente debe volver al sitio del estudio en el plazo de 5 días, si es posible.

Si, por motivos de seguridad, los sujetos necesitan comer o tomar insulina, también se debe reprogramar la visita.

## 6.3 Pruebas y exámenes de laboratorio:

1. Pruebas inmunológicas:

- 5 a. Autoanticuerpos (anti-GAD65, anti-insulina, anti-IA-2, ZnT8)  
 b. Se determinan citocinas y quimiocinas relevantes (véase más adelante)  
 c. Se clasifican los linfocitos T y se estudian (véase más adelante)

2. Genética:

- 10 a. Se hacen determinaciones de HLA y genes relacionados con el desarrollo de la diabetes  
 b. Estudios de matriz para esclarecer la importancia de los genes relacionados con la diabetes

3. Ensayos de virus:

- 15 a. Se pueden usar pruebas genéticas, inmunológicas y microbiológicas.

4. Estado de diabetes:

- 20 a. HbA1c  
 b. Glucosa en ayunas y péptido C en ayunas  
 c. Glucosa estimulada por la comida y péptido C

5. Extracción de muestras de sangre para seguridad:

- 25 a. Hematología  
 b. Química

6.4 Antecedentes personales

30 El investigador realizará una revisión completa de los antecedentes personales del sujeto y los documentará en Antecedentes personales del CRF.

Todas las afecciones / enfermedades preexistentes serán informadas en la página de Antecedentes personales del CRF en la visita de selección (Visita 1).

35 También se documentarán la fecha del diagnóstico de la diabetes de tipo 1 del sujeto y los antecedentes familiares de la diabetes de tipo 1.

6.5 Examen físico que incluye examen neurológico

40 En la visita de selección (Visita 1), el paciente se someterá a un examen físico general y a un examen neurológico y cualquier dato se informará como afecciones preexistentes en la página de Antecedentes personales del CRF.

45 Durante las posteriores visitas del estudio, el paciente se examinará para cualquier nueva afección médica o empeoramiento de las preexistentes. Cualquier cambio en las afecciones preexistentes o nuevas condiciones debe ser entrada en la página de AE en el CRF y cualquier medicación administrada en las páginas de medicación concomitante.

50 Los pacientes se someterán, además de al examen físico limitado por el médico, a un examen neurológico clínico normalizado en el cribado, 0, 6, 15 y 30 meses. Las pruebas neurológicas se realizan para detectar posibles signos leves de enfermedad neuromuscular, tales como alteración de la fuerza, equilibrio y coordinación.

El examen neurológico incluye:

- 55
- Reflejos de las extremidades
  - Romberg (equilibrio y coordinación)
  - Caminar sobre una línea, 2 metros (equilibrio y coordinación)
  - Apoyarse sobre 1 pierna, izquierda y derecha, 15 segundos por pierna (equilibrio y coordinación)
  - Dedo-nariz (coordinación)
  - Mímica facial (nervios craneales)

60

  - Reflejo de Babinski (función central)
  - Fuerza muscular (darse la mano) bíceps, tríceps, extensores distales y flexores

65 Estos exámenes también se pueden repetir entre visitas programadas a criterio del investigador. No se incluye el cribado para enfermedad neurológica con electroencefalograma (EEG) debido a la baja sensibilidad y especificidad. Sin embargo, si se detecta cualquier signo de disfunción neurológica, el paciente debe ser remitido a un neurólogo

para evaluación adicional.

6.7 Medicación concomitante

- 5 Cualquier medicación concomitante usada durante el estudio, si se considera relevante para el estudio o no por el investigador, debe ser informada en el cuaderno de medicación concomitante del CRF. Véase también la Sección 8.5, más adelante.

7. Calendario de procedimientos

10

**Tabla 1 Estudio piloto DIAGNODE-1, programa de acontecimientos del estudio, pacientes con T1D**

Periodo del estudio	Cribado	Intervención				Seguimiento	
Número de visita	1	2	3	4	5	6	7
Tiempo (Día/Semana/Mes)	D -10 a - 21	D1 Nivel inicial	D30 ±3	D60 ±3	M 6 (D180 ± 14)	M 15 (D450 ± 14)	M 30 (D900 ± 30)
Consentimiento informado	X						
Tratamiento con GAD-alumbre (Diamyd)		X	X	X			
Antecedentes personales	X						
Examen físico	X	X	X	X	X	X	X
Evaluación neurológica	X	X	X	X	X	X	X
Medicación concomitante	X	X	X	X	X	X	X
Estatura	X						
Peso, IMC	X	X	X	X	X		X
Prueba de embarazo en orina (mujeres)		X	X	X			
Inspección del sitio de inyección		X	X	X			
Dosis de insulina	X	X	X	X	X	X	X
Hipoglucemia autoevaluada <sup>b</sup>		X	X	X	X	X	X
Acontecimientos adversos		X	X	X	X	X	X
Extracción de muestras de sangre para seguridad:							
* Hematología	X	X	X	X	X	X	X
* Química	X	X	X	X	X	X	X
Auto-anticuerpos:							
* GADA	X	X	X	X	X	X	X
* Autoanticuerpos relacionados con la diabetes	X	X	X	X	X	X	X
Extracción de muestras de sangre para el estado de diabetes:							
* HbA1c	X	X	X	X	X	X	X
* Glucosapéptido C en ayunas	X	X	X	X	X	X	X
* Glucosapéptido C en MMTT		X			X	X	X
Extracción de muestras de sangre para genética, inmunología		X	X	X	X	X	X
Vitamina D en suero	X						
Extracción de muestras de sangre para biobank	X	X	X	X	X	X	X

<sup>a</sup> Inspección de sitio de inyección antes y 60 minutos después de la inyección por el investigador o enfermera  
<sup>b</sup> Hipoglucemia definida como la necesidad de ayuda de otros y/o convulsiones y/o inconsciente

7.1 Visitas

- 5 La primera visita, la visita de selección (Visita 1) se deben realizar 10 a 21 días antes de la Visita 2 planeada (Nivel inicial). La Visita 3 y 4 se deben entonces programar con una ventana de visita de  $\pm 3$  días (segunda y tercera administración de GAD-alumbre) y de  $\pm 14$  días para la Visita 5, 6 y  $\pm 30$  días para la Visita 7. Obsérvese que todas las visitas se deben calcular desde la visita basal (Visita 2) según el programa de visitas. Obsérvese también que las visitas se deben realizar en el plazo de las ventanas de visitas para cumplir el protocolo del estudio.
- 10 Véanse las Tablas 1 y 2 anteriores, para el programa de visitas del paciente, ventanas de visitas y la administración del fármaco del estudio.
8. Medicación del estudio
- 8.1 Medicación del estudio
- 15 Se usarán en el estudio los siguientes suministros de medicación:  
Medicación del estudio: GAD-Alumbre (Diamyd), 4  $\mu\text{g}$  x 3 (administrada tres veces con intervalo de un mes)  
Proveedor de IMP: Diamyd Medical AB, Estocolmo, Suecia.
- 20 8.2 Suministro
- 25 GAD-alumbre (Diamyd), una formulación suministrada por Diamyd Medical. Se suministrará como mediación pre-  
envasada de Diamyd Medical a la farmacia local. Todas las administraciones tendrán lugar en el hospital, y solo se  
manipularán por personal del estudio formado y autorizado. La medicación del estudio se etiquetará con información  
según las reglamentaciones locales. GAD-alumbre se almacenará en un frigorífico a 2-8 °C en un área segura (por  
ejemplo, un armario cerrado con llave o sala de almacenamiento de fármacos), protegido del uso involuntario. Toda  
la medicación del estudio se etiquetará con información según reglamentaciones locales.
- 8.3 Dosificación y administración
- 30 GAD-Alum: 4  $\mu\text{g}$  administrados en ganglio linfático en el área inguinal (por ayuda de una técnica de ultrasonidos)  
tres veces con intervalo de un mes
- 8.4 Duración del tratamiento
- 35 Véase 8.3
- 8.5 Medicación concomitante
- 40 No se permiten medicación moduladora inmunitaria sistémica, y ninguna otra medicación para la diabetes distinta de  
insulina, comercializada o no.
9. Respuestas variables y resultados
- 45 9.1 Evaluación exploratoria de la eficacia
- 9.1.1. Variables de eficacia
- 50 Como éste es un estudio piloto de fase I, no existe criterio de evaluación principal de la eficacia, pero los presentes  
inventores todavía seguirán
- Cambio en péptido C en ayunas y péptido C (valor del minuto 90 y ABCmedia 0-120 min) durante una MMTT desde el nivel inicial hasta el mes 6, 15, respectivamente hasta el mes 30.
  - Desviación de Th2 de la respuesta inmunitaria celular observada, por ejemplo, como la elevada relación de IL-5, 10, 13 en comparación con IFN-gamma, TNF-alfa, IL-1beta, IL-17, y aumento de linfocitos T reguladores. Cambio entre las visitas basales y posteriores.
  - Marcadores inflamatorios, por ejemplo, TNF-alfa, IL-1 beta, IL-2, IL-17. Cambio entre las visitas basales y posteriores.
  - Hemoglobina A1c (HbA1c), cambio entre las visitas basales y posteriores
  - Dosis de insulina exógena por kg de peso corporal y 24 horas, cambio entre las visitas basales y posteriores
- 60 10. Metodología estadística y tratamiento de datos
- 10.1 Diseño del estudio
- 65 El estudio DIAGNODE-1 es un estudio de intervención piloto de fase I de etiqueta abierta.

Participantes del estudio: Pacientes con diabetes de tipo 1 clásica recién diagnosticada: N=5. Edad 18-29,99 años. Reclutados de una clínica de endocrinología en Suecia.

5 10.2 Estimación del tamaño de muestra

Análisis de potencia: No se hacen análisis de potencia formales para este estudio piloto.

10.3 Plan del análisis estadístico

10 En resumen, se planean los siguientes análisis:

15 Todas las variables continuas presentarán la siguiente estadística descriptiva: número de observaciones (n), valor medio, desviación estándar, mínimo, mediana y máximo. Todas las variables de una naturaleza categórica presentarán frecuencias y porcentajes. La tabulación de la estadística descriptiva se dividirá por visita. Cuando corresponda, también se incluirá la estadística descriptiva basal (cribado).

Demográfica y otras características basales

20 Se presentarán características demográficas y basales usando estadística descriptiva (tablas resumen).

Variables de seguridad y datos de eficacia

25 Se presentarán los datos de AE/SAE usando una tabulación normalizada de la frecuencia y la tasa de incidencia de todos los AEs/SAEs observados. Las frecuencias y tasas de incidencia se calculan en una base por paciente. Los acontecimientos adversos se resumirán por sistema del cuerpo, causalidad e intensidad. Se presentarán otros datos de seguridad por estadística descriptiva.

30 Se resumirán descriptivamente los datos de eficacia referentes al péptido C y sistema inmunitario, así como los acontecimientos adversos y otros datos de seguridad.

Después de 6 meses, análisis de los datos de seguridad. (Los resultados se usarán para el diseño de un ensayo DIAGNODE de fase II).

35 10.4 Poblaciones del estudio

Población por intención de tratar

40 Los pacientes se incluirán en la población principal por intención de tratar para el análisis de eficacia si reciben al menos 1 dosis de todos los fármacos del estudio en ese grupo, y se evalúan en una visita posterior.

Por población de protocolo

45 Para reunir los requisitos para la población rigurosa por protocolo, los sujetos deben haber seguido el protocolo del estudio sin infracciones importantes. Cualquier examen ausente se sustituirá con la última observación considerada, pero se pueden perder los exámenes de no más de 1 visita.

Población total

50 Cualquier paciente que se retire después de haber recibido al menos un tratamiento (visita 2) se incluirá en el análisis de seguridad (acontecimientos adversos y parámetros de seguridad). Se enumerarán los datos de todos los pacientes, y se proporcionará una lista de pacientes retirados, con todos los motivos de la retirada.

55 10.5 Recogida de datos / cuadernos de recogida de datos

Se suministrarán cuadernos de recogida de datos (CRFs) para anotar datos de cada paciente. Puesto que es importante tener una recogida de datos apropiada en un modo oportuno, el investigador o representante asignado debe completar los CRFs de inmediato. Cuando el monitor solicite datos adicionales o la aclaración de datos del CRF, la petición debe ser respondida satisfactoriamente a su debido tiempo.

60 Es responsabilidad del investigador garantizar que estos cuadernos de recogida de datos sean apropiadamente completados. El investigador firmará las páginas de firma diseñadas para confirmar que el cuaderno de recogida de datos sea preciso y esté completo.

65 Para garantizar la legibilidad, los CRFs deben ser completados en mayúsculas con un bolígrafo negro o azul (no lapicero, rotulador o pluma estilográfica). Cualquier corrección a los CRFs debe ser llevada a cabo por el

investigador o su designado. Se debe hacer un único trazo a lo largo de la entrada original. La corrección debe estar fechada e inicializada. Las entradas incorrectas no se deben tapar con líquido corrector, o eliminadas, o hechas ilegibles de algún modo. Aunque no existan cambios de un examen previo, en interés de la integridad de la adquisición de datos, se deberán contestar en su totalidad las preguntas, que se repiten en cada sección de los CRFs. El investigador debe dar una explicación razonable de todos los datos faltantes.

#### 10.6 Tratamiento de datos

Se codificarán los datos y se entrarán en una base de datos informática. La manipulación de datos, que incluye el control de calidad de los datos, cumplirá las directrices reglamentarias (por ejemplo, Conferencia Internacional sobre la Armonización [ICH] y Buena práctica clínica [GCP]).

#### 11. Procedimientos reglamentarios y administrativos

Se debe haber cumplido cualquier requisito regulador antes del comienzo del estudio. El patrocinador solicitará la aprobación reglamentaria a las autoridades apropiadas. Los sitios del estudio, instalaciones, laboratorios y todos los datos (incluyendo datos de fuentes) y la documentación deben estar disponibles para su inspección por parte de las autoridades.

#### 11.2 Información de pacientes / Consentimiento informado

El investigador es responsable de dar a los pacientes información verbal y escrita completa y adecuada sobre la naturaleza, fin, posibles riesgos y beneficios del estudio. También se debe informar a los pacientes de que son libres de retirarse del estudio en cualquier momento. Los pacientes deben tener un tiempo razonable para leer y entender la información antes de firmarla. El investigador es responsable de obtener el consentimiento informado firmado de todos los pacientes antes de incluir al paciente en cualquier procedimiento relacionado con el estudio. Se dará a los pacientes una copia de la información del paciente y de la declaración de consentimiento informado.

#### 11.4 Plan de tratamiento de pacientes

Todos los pacientes continuarán recibiendo el tratamiento habitual para la diabetes de tipo 1 durante el estudio. Después de que el individuo complete el estudio, el paciente volverá al tratamiento habitual recibido antes de la participación en el estudio.

#### Ejemplo 2, ejemplo de referencia

El régimen de terapia de este ejemplo tiene una acción "ortogonal" y mitiga la inmunidad de T1D a largo plazo. El sistema inmunitario se regula por disminución por etanercept, que a su vez se regula por la inflamación alrededor de las células beta, al mismo tiempo que un autoantígeno de células beta (GAD) se presenta por células dendríticas, cuya capacidad inductora de la tolerancia ha sido potenciada mediante tratamiento con vitamina D.

Estudio: Ensayo de etiqueta abierta para evaluar la tolerabilidad de una terapia de combinación que consiste en GAD-alumbre (Diamyd®), etanercept y vitamina D en niños y adolescentes recién diagnosticados con diabetes de tipo 1

Principios activos: Descarboxilasa de ácido glutámico humana recombinante (rhGAD65), calciferol (vitamina D), etanercept.

Fase de desarrollo: Fase IIa

Objetivos:

- Evaluar la tolerabilidad de una terapia de combinación con rhGAD65, vitamina D y etanercept
- Evaluar cómo los tratamientos anteriormente mencionados influyen en el sistema inmunitario y la secreción de insulina endógena

Diseño del estudio:

El estudio es un ensayo clínico piloto multicéntrico de etiqueta abierta. Todos los pacientes recibirán a partir del Día 1 2.000 UI de vitamina D por vía oral por día durante 15 meses, y a partir de los Días 1-90 recibirán etanercept (Enbrel) inyectado por vía subcutánea 0,8 mg/kg de peso corporal (máx 50 mg) una vez a la semana, y recibirán 2 inyecciones subcutáneas de 20 µg de Diamyd en un régimen de inmunización y refuerzo en los días 30 y 60. Los pacientes se evaluarán para tolerabilidad durante 6 meses (periodo del estudio principal, 6 visitas) y se seguirán 24 meses adicionales (periodo del estudio de extensión, 3 visitas). El periodo del estudio total es 30 meses.

Selección de sujetos: Los pacientes deben tener entre 8,00 y 17,99 años, y ser diagnosticados con diabetes de tipo 1 (T1D) en el plazo de los 100 días previos en el momento del cribado. Los pacientes serán elegibles para reclutamiento si el péptido C en ayunas es  $\geq 0,12$  nmol/L (0,36 ng/mL) y están presentes niveles elevados de anticuerpos contra GAD65.

5 Número de sujetos planeados: Se reclutarán aproximadamente 20 pacientes.

Descripción de grupos de tratamiento:

10 Existe un único grupo de tratamiento. Los pacientes se evaluarán para elegibilidad en la visita de selección (Visita 1) 2 a 4 semanas antes del comienzo del tratamiento. En la Visita 2 (Día 1), los pacientes elegibles para el estudio empezarán el tratamiento como se ha mencionado anteriormente.

Criterios de evaluación

15 Criterios de evaluación principales:

Para evaluar la tolerabilidad de una terapia de combinación con Diamyd, vitamina D y etanercept en el Mes 6 (periodo del estudio principal), 9, 15 y 30 (periodo del estudio de extensión)

20 Variables para evaluar la tolerabilidad:

- Reacciones en el sitio de inyección
- Infecciones
- 25 • Aparición de acontecimientos adversos (AEs)
- Aparición de acontecimientos adversos graves
- Evaluaciones fisiológicas y de neurología
- Mediciones de laboratorio (bioquímica y hematología), que incluye calcio y vitamina D en suero
- Título de GAD65AB (GADA)

30 Criterios de evaluación secundarios:

Para evaluar cómo los tratamientos anteriormente mencionados influyen en el sistema inmunitario y la secreción de insulina endógena en el Mes 6 (periodo del estudio principal), 9, 15 y 30 (periodo del estudio de extensión)

35 Variables para evaluar la influencia sobre el sistema inmunitario:

- Marcadores inflamatorios, especialmente TNF-alfa, IL-1 beta, IL-2, IL-17
- Desviación de Th2 de la respuesta inmunitaria celular observada, por ejemplo, como elevada relación de IL-5, 10, 13 en comparación con IFN-gamma, TNF-alfa, IL-1 beta e IL-17
- 40 • Aumento de linfocitos T reguladores

Variables para evaluar el efecto de la secreción de insulina endógena:

- 45 • Péptido C (valor de 90 minutos y ABCmedia 0-120 min) durante una MMTT
- Proporción de pacientes con un nivel de péptido C máximo estimulado superior a 0,2 nmol/L
- Péptido C en ayunas
- Hemoglobina A1c (HbA1c)
- Dosis de insulina exógena por kg de peso corporal y 24 horas

50 Tamaño de la muestra:

No se hace cálculo del tamaño real de la muestra ya que éste es un estudio piloto de etiqueta abierta simplemente para observar si el tratamiento es tolerable y no provoca efectos negativos sobre la función de células beta y/o el sistema inmunitario.

55 Todas las variables se resumirán descriptivamente

Ejemplo 3. ejemplo de referencia

60 Título del estudio: Efecto de GABA o combinación de GABA/GAD sobre la progresión de diabetes mellitus de tipo 1 en niños

Fase de desarrollo: Estudio piloto en seres humanos

Objetivos:

- 5
- Evaluar la seguridad e influencia del tratamiento con GABA sobre la preservación de la secreción residual de insulina en diabetes de tipo 1 de aparición reciente.
  - Evaluar la seguridad e influencia del tratamiento con dos dosis de GAD-alumbre (Diamyd®) más GABA sobre la preservación de la secreción residual de insulina en diabetes de tipo 1 de aparición reciente.

10 Diseño del estudio: El estudio es un ensayo clínico de 3 grupos, aleatorizado, de doble ciego, controlado por placebo. Los pacientes recibirán o

- 15
- i) GABA oral, administrado por kg, dos veces al día durante 12 meses más 2 inyecciones subcutáneas de 20 µg de Diamyd en una pauta de inmunización y refuerzo durante un periodo de 30 días
  - ii) GABA oral, administrado por kg, dos veces al día durante 12 meses
  - iii) placebo.

Los pacientes serán seguidos durante un total de 12 meses.

20 Selección de sujetos: Los pacientes debe tener entre 4 y 17 años de edad, y diagnosticados con diabetes de tipo 1 (T1D) en el plazo de las 4 semanas previas de aleatorización. Los pacientes serán elegibles para reclutamiento si están presentes niveles elevados de anticuerpos contra GAD65.

25 Número de sujetos planeados: Se reclutarán aproximadamente 75 pacientes.

Descripción de grupos de tratamiento:

Los pacientes se evaluarán para elegibilidad antes de la aleatorización. En la Visita 1 (Día 1, nivel inicial), los pacientes elegibles para el estudio se aleatorizarán a 1 de 3 grupos de tratamiento:

- 30
- Se asignarán 25 pacientes para recibir GABA oral dos veces al día, administrado por kg, desde el Día 1 hasta el Mes 12. Además, se administrarán 2 inyecciones subcutáneas con 20 µg de Diamyd (GAD-alum) en el Día 1 y Mes 1, es decir, 1 dosis de sensibilización y 1 de refuerzo (que proporciona una dosis total de 40 µg de Diamyd).
  - Se asignarán 25 pacientes para recibir GABA oral dos veces al día, administrado por kg, desde el Día 1 hasta el Mes 12. Además, se administrarán 2 inyecciones subcutáneas con Diamyd de placebo en el Día 1 y Mes 1
  - Se asignarán 25 pacientes para recibir GABA oral con placebo dos veces al día, administrada por kg, desde el Día 1 hasta el Mes 12. Además, se administrarán 2 inyecciones subcutáneas con Diamyd de placebo en el Día 1 y Mes 1
- 35

40 Criterio de evaluación principal:

- Evaluar el efecto de GABA y la combinación de GABA + GAD-alumbre sobre la función pancreática de las células beta, como se mide por los niveles de secreción de péptido C estimulado por la comida en comparación con controles de placebo de la misma edad, antes y después de un año de tratamiento.
- 45

Criterios de evaluación secundarios:

- Evaluar el efecto de GABA y la combinación de GABA + GAD-alumbre sobre autoanticuerpos autoinmunitarios: GAD-65, ICA512 y transportador 8 de cinc (ZnT8A) y el efecto sobre HbA1c, en ayunas y niveles estimulados de glucosa y glucagón, péptido C en ayunas y la cantidad diaria de uso de insulina por los participantes, desde el nivel inicial hasta las visitas posteriores
  - Evaluar la seguridad de GABA y la combinación de GABA/GAD-alumbre
- 50

Seguridad

55 La evaluación de seguridad incluye la observación de reacciones en el sitio de inyección, manifestación de acontecimientos adversos (AEs), mediciones de laboratorio, evaluaciones neurológicas y exámenes físicos limitados.

60 Tamaño de la muestra:

El tamaño de muestra para el estudio propuesto es 75 niños; 50 en los grupos de tratamiento y 25 en el grupo de placebo. Para la comparación primaria de las mediciones de péptido C posbasales en 12 meses entre estos grupos, suponiendo un  $\alpha$  de 0,05 y un ABC media (DE) de péptido C de 1,0 (0,4), este tamaño de muestra da una potencia de ~40 % para detectar un 25 % de diferencia y ~97 % de potencia para detectar un 50 % de diferencia. Se

65

resumirán descriptivamente acontecimientos adversos y otros datos.

Ejemplo 4, ejemplo de referencia

5 Título del estudio: Un estudio de doble ciego, aleatorizado iniciado por el investigador para determinar la seguridad y el efecto de Diamyd® en combinación con vitamina D sobre la progresión a diabetes de tipo 1 en niños con múltiples autoanticuerpos contra las células de los islotes

10 Nombre del principio activo: Descarboxilasa de ácido glutámico humana recombinante (rhGAD65), calciferol (vitamina D3)

Objetivos:

- 15
- El objetivo primario es evaluar si Diamyd®, en niños tratados con dosis relativamente altas de vitamina D, pueden retrasar o detener el proceso autoinmunitario que conduce a diabetes de tipo 1 clínica en niños con autoinmunidad persistente de células beta en curso como se indica por múltiples autoanticuerpos contra células de los islotes positivas.
  - El objetivo secundario es demostrar que Diamyd® es seguro en niños en riesgo de diabetes de tipo 1.

20 Diseño del estudio:

El estudio es un ensayo clínico de dos grupos, aleatorizado, de doble ciego, controlado por placebo, unicéntrico. Los participantes del estudio recibirán 2 inyecciones subcutáneas de o Diamyd® 20 µg o placebo en un régimen de inmunización y refuerzo durante un periodo de 30 días. Todos los participantes del estudio serán complementados con vitamina D a una dosis diaria de 2000 IE durante el periodo total del estudio (independientemente del grupo de tratamiento al que se aleatorizan). Los participantes del estudio serán seguidos durante 5 años.

25

Protocolo de intervención pos-diagnóstico (PDIP)

30 A la espera de la fecha de caducidad del fármaco del estudio, a los niños diagnosticados con diabetes de tipo 1 clínica dentro del periodo del estudio se les puede ofrecer que continúen en el ensayo en un protocolo de intervención pos-diagnóstico (PDIP) para recibir 2 inyecciones adicionales de Diamyd® independientemente del grupo de tratamiento al que se aleatorizaron en la parte de prevención del estudio. Todos los niños que se reclutan en el PDIP serán retirados del protocolo de prevención original para ser seguidos minuciosamente para seguridad y eficacia según el PDIP o 15 meses después de la primera inyección de Diamyd® en el PDIP

35

Selección de sujetos:

Los sujetos deben tener entre 4,00 y 17,99 años de edad y GADA positiva y al menos un autoanticuerpo adicional asociado a la diabetes de tipo 1 (IA-2A, ZnT8R/W/QA o IAA).

40

Número de sujetos planeados: Se reclutarán aproximadamente 80 pacientes.

Descripción de grupos de tratamiento:

45 Los pacientes se evaluarán para elegibilidad en la visita de selección (Visita 0) aproximadamente 30 días antes de la primera inyección. En la Visita 1 (Día 1), los pacientes elegibles para el estudio se aleatorizarán a 1 de 2 grupos de tratamiento:

- 50
- Se asignarán aproximadamente 40 pacientes para recibir 2 inyecciones subcutáneas con 20 µg de Diamyd® en los días 1 y 30, es decir, 1 dosis de sensibilización y 1 de refuerzo.
  - Se asignarán aproximadamente 40 pacientes para recibir 2 inyecciones subcutáneas de placebo, 1 cada uno de los días 1 y 30.

55 Ambos grupos de tratamiento se complementarán con vitamina D3 a una dosis diaria de 2000 IE durante el periodo total del estudio de 5 años.

Protocolo de intervención pos-diagnóstico (PDIP)

- 60
- En el plazo de 4 meses desde el diagnóstico de la diabetes de tipo 1 clínica, los participantes recibirán una inyección de Diamyd® 20 µg en el día 1 en el PDIP, seguido por una segunda inyección de Diamyd® en el día 30, en un modo de sensibilización y refuerzo, independientemente del grupo de tratamiento al que se aleatorizaron en la parte de prevención del estudio (antes del diagnóstico)

65 Criterios de evaluación:

Criterio de evaluación principal:

5 La proporción de sujetos diagnosticados con diabetes de tipo 1 clínica en el grupo tratado con Diamyd®, en comparación con el grupo tratado con placebo a los cinco años después de la primera inyección.

Criterios de evaluación secundarios:

10 Evaluar la seguridad y el cambio en el estado metabólico desde el metabolismo normal al alterado de la glucosa en el grupo de niños con metabolismo de la glucosa normal en el nivel inicial, así como la progresión en el estado metabólico en los niños con metabolismo alterado de la glucosa en el cribado basal, en los niños no diabéticos con múltiples autoanticuerpos contra los islotes tratados con Diamyd® en comparación con los tratados con placebo.

15 Variables para evaluar la seguridad:

- Reacciones del sitio de inyección
- Aparición de acontecimientos adversos (AEs)
- Mediciones de laboratorio (bioquímica y hematología que incluyen hemograma completo (CBC)), que incluyen calcio y vitamina D3 en suero
- 20 • Análisis de orina
- Exámenes físicos, que incluyen evaluaciones neurológicas
- Título de GADA específico de epítotope, isotipos y subtipos, así como autoanticuerpos antiidiotípicos contra GADA

25 Estado metabólico:

- Cambio del metabolismo normal al alterado de la glucosa, definido como cualquiera de
  - a) F-glucosa  $\geq 6,1$  mmol/L
  - 30 b) p-glucosa máxima a 30, 60, 90 minutos  $\geq 11,1$  mmol/L en OGTT
  - c) p-glucosa a los 120 min  $\geq 7,8$  mmol/L en OGTT
  - d) HbA1c  $\geq 39$  mmol/mol

35 Se tiene que confirmar el metabolismo de la glucosa en una segunda visita. Este criterio de evaluación se usará en el grupo de niños con metabolismo de la glucosa normal en el cribado basal

- Progresión del metabolismo de la glucosa alterado de una o varias de las variables anteriores hasta signos adicionales de metabolismo de la glucosa reducido, confirmado en una segunda visita. Este criterio de evaluación se usará en el grupo de niños con metabolismo de la glucosa alterado en el nivel inicial.

40 Criterios de evaluación exploratorios:

- Proporción de sujetos diagnosticados con diabetes de tipo 1 clínica a los 1, 2, 3 y 4 años de seguimiento.
- Tiempo desde la visita basal hasta el diagnóstico de diabetes de tipo 1 clínica
- 45 • Cambio desde el nivel inicial en las siguientes variables metabólicas clave en diversos momentos de tiempo: HbA1c, primera fase de respuesta de insulina y valor de K desde IvGTT, ABC p-glucosa y péptido C de OGTT, glucosa a los 120 minutos y péptido C después de OGTT, péptido C en ayunas, insulina y glucosa
- Cambio en otras variables metabólicas desde el nivel inicial: ABC C-péptido, glucosa e insulina de IvGTT, ABC insulina de OGTT, cambio en p-glucosa máx en OGTT.

50 Tamaño de muestra:

55 Se les preguntará a hasta 80 niños que participen en DIAPREV-IT 2. Se espera que el 50 % de los niños no tratados con múltiples autoanticuerpos desarrollen diabetes de tipo 1 en el plazo de 5 años. Esta frecuencia se ha informado previamente igual entre parientes de pacientes con diabetes y en la población general. Si 20 % de los niños tratados desarrollaran diabetes de tipo 1 dentro del mismo periodo de tiempo, los presentes inventores tendrán una potencia de 82 % con  $\alpha=5$  % con un grupo de 40+40=80 niños. Se usará valor de  $p < 0,05$  como nivel de significancia.

Análisis:

60 Se realizará el análisis de los datos del estudio para tratar tanto la seguridad como la eficacia del tratamiento. Se desarrollará un plan analítico estadístico (SAP) antes de los análisis estadísticos.

Los análisis se realizarán usando estadística paramétrica. Si no se cumplen los criterios de normalidad de variables (por ejemplo, pruebas de Kolmogorov-Smirnov), se usará estadística no paramétrica de tipo Wilcoxon. Se analizarán

tablas de cuatro campos usando la prueba exacta de Fisher. Se analizará el tiempo hasta la diabetes usando análisis de tablas de vida, tales como regresión de Kaplan-Meier y Cox. Los análisis de eficacia se realizarán tanto por protocolo (PP) como por intención de tratar (ITT). En ITT se aplicará la última observación considerada.

5 Se resumirán descriptivamente los acontecimientos adversos y otros datos de seguridad.

*Ejemplo 5, ejemplo de referencia*

10 Título del estudio: Un estudio de fase II, de 2 grupos, aleatorizado, de doble ciego, controlado por placebo, multicéntrico, de múltiples dosis crecientes de Diamyd®, en combinación con vitamina D, para evaluar la seguridad, respuesta inmunitaria y el estado de diabetes en adultos jóvenes recién diagnosticados con diabetes de tipo 1.

15 Nombre de los principios activos: Descarboxilasa de ácido glutámico humana recombinante (rhGAD65) y calciferol (vitamina D)

Objetivos:

Objetivo primario

20 • Evaluar la seguridad de administrar Diamyd® de múltiples dosis crecientes en combinación con vitamina D

Objetivos secundarios

25 • Evaluar la influencia del sistema inmunitario de administrar Diamyd® de múltiples dosis crecientes en combinación con vitamina D  
 • Comparar las variables del estado de diabetes entre Diamyd y placebo antes y después de administrar Diamyd® de múltiples dosis crecientes en combinación con vitamina D

Diseño del estudio:

30 El estudio es un ensayo clínico de 2 grupos, aleatorizado, de doble ciego, controlado por placebo, multicéntrico. Los pacientes elegibles recibirán vitamina D por vía oral por día durante 1 mes antes de la primera inyección de Diamyd®. A partir del Mes 1 (nivel inicial), todos los pacientes recibirán una dosis de mantenimiento de vitamina D durante 5 meses adicionales.

35 Se administrarán semanalmente inyecciones subcutáneas de Diamyd® de dosis crecientes (o placebo) desde el Mes 1 (nivel inicial) durante un periodo de 13 semanas (aumento de dosis) donde después de la dosis máxima se administrarán un intervalo de 2, 4 y 8 semanas (desde la semana 15 hasta la semana 27) (dosis de mantenimiento). La dosis de mantenimiento se administrará entonces cada 8-12 semanas durante 1 año. Los pacientes se evaluarán para seguridad y parámetros inmunológicos en el Mes 6 y entonces se evaluarán para las variables del estado de diabetes en los Meses 15 y 30. El periodo de estudio total es 30 meses.

40 Selección de sujetos: Los pacientes deben tener entre 18 y 30 años, y diagnosticados con diabetes de tipo 1 (T1D) en el plazo de los 6 meses previos en el momento del cribado. Los pacientes serán elegibles para reclutamiento si el péptido C en ayunas es  $\geq 0,12$  nmol/L (0,36 ng/mL) y están presentes niveles elevados de anticuerpos contra GAD65.

Número de sujetos planeados: Se reclutarán aproximadamente 40 pacientes.

50 Descripción de grupos de tratamiento:

55 Los pacientes se evaluarán para elegibilidad en la visita de selección (Día -14-28) 2 a 4 semanas antes de la aleatorización. Todos los pacientes elegibles recibirán desde el Día 1 7000 UI de vitamina D por vía oral por día durante 1 mes días para garantizar que los niveles de vitamina D estén por encima de  $> 70$  nM/l antes de la primera inyección de Diamyd® / Placebo. A partir del Mes 1 (nivel inicial), todos los pacientes recibirán una dosis de mantenimiento de vitamina D de 2000 UI por día durante 5 meses adicionales.

En el día 1, los pacientes elegibles para el estudio se aleatorizarán a 1 de 2 grupos de tratamiento:

60 • Se asignarán aproximadamente 20 pacientes para recibir inyecciones subcutáneas de Diamyd® de dosis crecientes, empezando en el nivel inicial (Mes 1) del siguiente modo: 0,4; 0,8; 2; 3,2; 4; 6,4; 8; 12; 16; 20; 24, 32, 40 µg, de Diamyd® semanalmente, donde después de 40 µg de Diamyd® se administrarán desde la semana 15 hasta la 27 semana en un intervalo de 2, 4 y 8 semanas. A partir de aquí se administrarán 40 µg de Diamyd® cada 8-12 semanas durante 1 año. Se administrará vitamina D como se ha descrito anteriormente (desde el Día 1).

65

- Se asignarán aproximadamente 20 pacientes para recibir inyecciones subcutáneas de placebo en el mismo programa de tiempo que antes. Se administrará vitamina D como se ha descrito anteriormente (sin placebo para vitamina D).

5 Los pacientes serán seguidos durante tres visitas de seguimiento en el Mes 6, Mes 15 y Mes 30

Criterios de evaluación:

Criterio de evaluación principal:

10 Para evaluar la seguridad de administrar Diamyd® de múltiples dosis crecientes en combinación con el tratamiento con vitamina D en los Meses 6, 15 y 30.

Variables para evaluar la seguridad:

- 15
- Reacciones del sitio de inyección
  - Aparición de acontecimientos adversos (AEs)
  - Mediciones de laboratorio (bioquímica y hematología)
  - Análisis de orina (microalbuminuria, creatinina)
- 20
- Exámenes físicos, que incluyen evaluaciones neurológicas
  - Título de GAD65AB (GADA)

Criterios de evaluación secundarios:

25 Para evaluar la influencia del sistema inmunitario y las variables del estado de diabetes entre Diamyd y placebo antes y después de administrar Diamyd® de múltiples dosis crecientes en combinación con tratamiento con vitamina D en el Mes 15 y 30.

Variables para evaluar la influencia en el sistema inmunitario:

- 30
- Marcador inflamatorio (TNF-alfa, IL-1 beta, IL-2, IL-17)
  - Desviación de Th2 de la respuesta inmunitaria celular (observada como aumento de la relación de IL-5,10, 13 en comparación con IFN-gamma, TNF-alfa, IL-1 beta e IL-17)
  - Aumento de linfocitos T reguladores
- 35

Variables para evaluar el efecto de secreción de insulina endógena:

- 40
- Hemoglobina A1c (HbA1c), cambio entre las visitas basales y posteriores
  - Dosis de insulina exógena por kg de peso corporal y 24 horas, cambio entre visitas basales y posteriores
  - Número de episodios autoevaluados de hipoglucemia
  - Péptido C en ayunas, cambio entre visitas basales y posteriores
  - ABC de péptido C media 0-120 min durante MMTT, cambio entre visitas basales y posteriores
  - Péptido C medido a los 30, 60, 90 y 120 minutos durante MMTT
  - Péptido C máximo durante MMTT, cambio entre visitas basales y posteriores
- 45
- Proporción de pacientes con un nivel de péptido C máximo estimulado por encima de 0,2 nmol/L

Tamaño de muestra:

50 No se hace cálculo del tamaño real de la muestra ya que éste es un estudio simplemente para observar si los diferentes tratamientos son seguros y no provocan efectos negativos sobre la función de células beta y/o el sistema inmunitario. Se resumirán descriptivamente acontecimientos adversos y otros datos de seguridad. Se resumirán descriptivamente parámetros inmunológicos y variables del estado de diabetes.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Descarboxilasa de ácido glutámico (GAD) para su uso en un método de prevención y/o tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria seleccionada de diabetes de tipo 1, diabetes autoinmunitaria y diabetes autoinmunitaria latente, que comprende administrar a un sujeto una composición que comprende la descarboxilasa de ácido glutámico por inyección directamente en un ganglio linfático.
- 10 2. Descarboxilasa de ácido glutámico para su uso según la reivindicación 1, en donde GAD se administra en una cantidad de 1-15 µg, más preferida entre 2-10 µg y lo más preferido entre 2-5 µg por inyección.
- 15 3. Descarboxilasa de ácido glutámico para su uso según la reivindicación 1 o 2, comprendiendo el método administrar la composición que comprende descarboxilasa de ácido glutámico al menos 2 veces, más preferido al menos 3 veces y lo más preferido al menos 4 veces, estando cada administración separada al menos 14 días, más preferentemente separada al menos 30 días.
- 20 4. Descarboxilasa de ácido glutámico para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, comprendiendo el método además administrar un inhibidor de la ciclooxigenasa al sujeto, en donde el inhibidor de la ciclooxigenasa se selecciona del grupo que consiste en ibuprofeno, dexibuprofeno, naproxeno, fenoprofeno, ketoprofeno, dexketoprofeno, flurbiprofeno, oxaprozina, loxoprofeno, indometacina, tolmetina, sulindaco, etodolaco, ketorolaco, diclofenaco, aceclofenaco, nabumetona, ácido acetilsalicílico, diflunisal (Dolobid), ácido salicílico, salsalato (Disalcid), piroxicam, meloxicam, tenoxicam, droxicam, lornoxicam, isoxicam, ácido mefenámico, ácido meclofenámico, ácido flufenámico, ácido tolfenámico, celecoxib, rofecoxib, valdecoxib, parecoxib, lumiracoxib, etoricoxib y nimesulida.
- 25 5. Descarboxilasa de ácido glutámico para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, comprendiendo el método además administrar abatacept al sujeto.
- 30 6. Descarboxilasa de ácido glutámico para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, comprendiendo el método además administrar un inhibidor de TNF-alfa al sujeto, en donde el inhibidor de TNF-alfa se selecciona del grupo que consiste en adalimumab, certolizumab, etanercept, golimumab e infliximab.
- 35 7. Descarboxilasa de ácido glutámico para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, comprendiendo el método además administrar vitamina D o ácido gamma-aminobutírico al sujeto, y/o exponer el sujeto a radiación UVB.
- 40 8. Descarboxilasa de ácido glutámico para su uso según la reivindicación 7, en donde la administración de vitamina D y/o la exposición a luz UVB se realiza durante entre 7 y 90 días antes de la administración de la composición que comprende al menos un autoantígeno de células beta a dicho sujeto.
- 45 9. Descarboxilasa de ácido glutámico para su uso según la reivindicación 7 u 8, en donde el método comprende la administración de vitamina D en una cantidad de 7000-70000 UI/semana durante 3-48 meses.
- 50 10. Descarboxilasa de ácido glutámico para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde la descarboxilasa de ácido glutámico se formula en hidróxido de aluminio (alumbre).
- 55 11. Descarboxilasa de ácido glutámico para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el método comprende administrar al sujeto una composición que comprende una pluralidad de partículas, teniendo cada una inmovilizada sobre su superficie al menos un primer y al menos un segundo antígeno, en donde el primer antígeno es descarboxilasa de ácido glutámico, y el segundo antígeno es o un tolerógeno o un autoantígeno de células beta, comprendiendo además opcionalmente la composición adyuvantes, excipientes, disolventes y/o tampones farmacéuticamente aceptables.
- 60 12. Descarboxilasa de ácido glutámico para su uso según la reivindicación 11, en donde la descarboxilasa de ácido glutámico (GAD) es GAD-65.
- 65 13. Descarboxilasa de ácido glutámico para su uso según la reivindicación 11 o 12, en donde el segundo antígeno es un tolerógeno, tal como una proteína humana nativa, tal como IL-10, albúmina de suero humano o hemoglobina; o ácido gamma-aminobutírico.
14. Descarboxilasa de ácido glutámico para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 11-13, en donde cada partícula tiene inmovilizada sobre su superficie 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 antígenos diferentes seleccionados del grupo que consiste en tolerógenos y autoantígenos de células beta.
15. Descarboxilasa de ácido glutámico para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en donde la enfermedad autoinmunitaria es diabetes de tipo 1.