

Opinioni a confronto

A cura di Stefano Del Prato

Dipartimento di Endocrinologia e Metabolismo, Sezione Diabetologia e Malattie del Metabolismo, Università di Pisa

L'immuno-intervento nel diabete tipo 1 alla diagnosi e nei soggetti a rischio

Partecipanti

Simona Cernea, Ilaria Barchetta, Paolo Pozzilli

Area di Endocrinologia e Diabetologia, Università Campus Bio-Medico di Roma

Carla Giordano, Lucilla Mantione

Sezione di Endocrinologia, Dipartimento di Oncologia Sperimentale ed Applicazioni Cliniche (DOSAC) – Policlinico Paolo Giaccone, Università degli Studi di Palermo

1) Qual è il razionale di un immuno-intervento nel diabete tipo 1?

■) **Simona Cernea, Ilaria Barchetta, Paolo Pozzilli:** il diabete mellito tipo 1 (DMT1) è una patologia autoimmune complessa nella quale si verifica una graduale e selettiva distruzione delle cellule β -pancreatiche secernenti insulina nel corso degli anni e questo processo continua anche dopo l'esordio della malattia. Negli ultimi decenni si è verificato un aumento dell'incidenza di DMT1 nella maggior parte delle regioni del mondo, con un incremento valutato intorno al 3% annuo e una stima di 65.000 casi neo-diagnosticati/anno nei ragazzi al di sotto dei 15 anni di età (1–3). Inoltre, numerosi studi segnalano una tendenza significativa a una riduzione dell'età alla diagnosi fattore, questo, di notevole importanza in quanto il DMT1 è una patologia gravosa che permea tutta la vita (4, 5). A causa della carenza di insulina circolante, la sopravvivenza dei pazienti con DMT1 dipende completamente dalla somministrazione di insulina esogena (attraverso iniezioni multiple sottocutanee (s.c.) o infusioni continue s.c. di insulina) e questo è spesso causa di notevoli problemi psicologici e anche economici (6, 7). Le ragioni del trattamento sono: prevenire la morte per complicanze metaboliche acute, permettere una normale crescita e uno sviluppo fisiologico e prevenire/ritardare l'insorgenza di complicanze d'organo terminali. In realtà, anche attraverso una terapia insulinica intensiva, le complicanze a lungo termine non possono essere totalmente scongiurate (8–11). Infatti, le complicanze microvascolari del diabete sono la causa più comune di morbidità e mortalità nei pazienti con DMT1 e comportano conseguenze devastanti, incluse cecità, insufficienza renale terminale e amputazione degli arti inferiori che aumentano ulteriormente il costo della gestione del diabete (12). I risultati del *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT) e dell'*Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications* (EDIC) indicano che mantenere uno stretto controllo metabolico dopo la diagnosi di DMT1 può prevenire/ritardare l'insorgenza di complicanze a lungo termine (11, 13). Il DCCT, inoltre, supporta l'evidenza di una relazione tra funzione β -cellulare residua e controllo glicemico, mostrando che soggetti con livelli di C-peptide stimolato $>0,2$ pmol/mL hanno una più soddisfacente risposta al trattamento e migliori *outcomes* (14, 15). Perciò, il razionale clinico per gli interventi terapeutici è che preservare anche parzialmente la produzione insulinica

endogena (attraverso una terapia immuno-modulante) migliora il controllo metabolico del DMT1 e può avere un impatto significativo sugli esiti a lungo termine di questa patologia.

» **Carla Giordano, Lucilla Mantione:** il DMT1 è caratterizzato dalla perdita progressiva della secrezione insulinica. Anche se la maggior parte dei pazienti al momento della diagnosi possiede una residua funzione β -cellulare variabile da soggetto a soggetto, il deficit diventa in poco tempo molto pronunciato fino alla totale assenza di secrezione. Quanto più è giovane l'età del paziente più è aggressivo e veloce il processo di perdita della funzione residua. Ciò è stato dimostrato in età pediatrica, in quanto i bambini hanno una secrezione residua β -cellulare minima solo per qualche mese dalla diagnosi, mentre gli adolescenti - e in particolare i giovani adulti - possono mantenere capacità secretiva per alcuni anni dopo la diagnosi (16, 17). È unanime la convinzione, per lo meno dal punto di vista teorico, che la funzione residua ha una cruciale importanza: da essa dipende un fenomeno molto ben descritto in letteratura e riconosciuto in clinica. Subito dopo la diagnosi, appena si normalizza la condizione glicometabolica, accade spesso che si verifichi "la remissione", una fase caratterizzata dalla sospensione della somministrazione insulinica pur mantenendo una condizione di euglicemia. La completa remissione è rara mentre, al contrario, la remissione parziale, intesa come riduzione del fabbisogno insulinico in rapporto al peso corporeo, è molto frequente. La qualità della vita durante il periodo di remissione è molto buona e il soggetto vive questa esperienza come una fase di guarigione con il mantenimento solo di poche restrizioni dietetiche e la possibilità di praticare l'attività fisica senza rischio di ipoglicemie. Il fabbisogno insulinico è $<0,5$ U/kg di peso corporeo e il valore di emoglobina glicata (HbA_{1c}) è quasi normale. È pur vero che una definizione certa di remissione parziale è molto difficile, seppure ci si riferisca abitualmente alla funzione β -pancreatica residua. Quest'ultima risulta soprattutto rilevante ai fini delle future complicanze del diabete (18). Infatti, è più facile raggiungere un buon livello di HbA_{1c} e avere meno fluttuazioni glicemiche quando è ancora presente una funzione residua nel corso degli anni.

Dopo aver considerato quanto sopra, è pur vero che alla diagnosi l'80-90% delle β -cellule pancreatiche è già stato distrutto ed è anche vero che alcuni pazienti hanno una secrezione residua e altri no. Parecchie spiegazioni sono state tentate per capire queste diversità, quali l'età all'epoca dell'esordio, la durata dei sintomi, la chetoacidosi, la risposta individuale, ecc. (Tabella 1).

Proprio il miglioramento della sensibilità insulinica, dopo lo squilibrio metabolico della diagnosi, potrebbe essere la prima spiegazione. Infatti, il raggiungimento del buon controllo metabolico potrebbe migliorare il microambiente β -cellulare e pertanto ciò potrebbe significare una conseguente migliore conservazione della funzione residua. In ogni caso, al 3-4° mese dalla diagnosi è necessaria quasi sempre la somministrazione di piccole quantità d'insulina per il raggiungimento degli obiettivi descritti. In questa fase un'immunoterapia ideale dovrebbe essere capace di preservare la funzione β -cellulare senza effetti collaterali.

Vorrei sottolineare due aspetti particolarmente rilevanti in questo dibattito: a) il processo di distruzione delle β -cellule si realizza subdolamente e per molti anni non solo è silente, ma non può essere evidenziato con nessuna indagine specifica. Ecco perché è assolutamente "urgente" trovare delle terapie di induzione della tolleranza che potrebbero arrestare la progressione del DMT1 dopo la diagnosi o prevenire la malattia prima ancora che essa si manifesti (19). Come prima manifestazione della malattia si intende evitare la comparsa degli autoanticorpi che, quando presenti, indicano che il processo di distruzione β -cellulare è ormai iniziato e probabilmente non è più arrestabile.

Tabella 1 Fattori correlati alla funzionalità β -cellulare residua nel DMT1

Valori più elevati di C-peptide:

- Età più avanzata alla diagnosi
- Assenza di sintomi o sintomi sfumati alla diagnosi
- Trattamento insulinico intensivo
- Buon controllo metabolico
- Positività per GADA?
- HLA-DR3

Valori più bassi di C-peptide:

- Giovane età alla diagnosi
- Manifestazioni cliniche severe
- Chetoacidosi alla diagnosi
- Infezioni precedenti l'esordio
- HLA-DR4
- Scadente controllo metabolico
- Alto titolo di anticorpi anti-insulina?
- Multipli autoanticorpi

Molti studi sono stati condotti negli ultimi anni con l'obiettivo di realizzare "prevenzione secondaria", nel senso che sono stati applicati in coloro che avevano già sviluppato gli autoanticorpi β -pancreatici oppure immediatamente dopo la diagnosi (studi di intervento). Questi studi hanno avuto lo scopo di "provare il principio", ovvero che si può modificare anche se solo temporaneamente il decorso del DMT1. Sebbene si riconosca che la prevenzione sia preferibile all'intervento, tuttavia identificare soggetti a rischio nella popolazione generale è improponibile a causa degli alti costi e per questo la maggiore enfasi è stata riservata alle terapie destinate ai neodiagnostici o ai soggetti a rischio nell'ambito delle famiglie con un probando affetto da DMT1. In questi casi l'immunoterapia è diretta principalmente alla salvaguardia di quelle tracce di residua funzione β -cellulare (circa il 15–20%) e l'obiettivo del suo utilizzo non può essere altro che quello di fornire evidenze sulla sua sicurezza e sull'efficacia nel mantenimento, prolungamento o aumento della funzione endogena residua. Pertanto, nel momento in cui la malattia può essere predetta accuratamente o è già clinicamente manifesta, la perdita di β -cellule è ormai sostanzialmente avvenuta e le potenziali terapie divengono meramente effimere se l'intento è ripristinare la funzione β o fermare l'assalto autoimmune; b) nel corso degli ultimi anni è stato evidenziato che nei pancreas di diabetici, dopo anche un ventennio o un trentennio dall'esordio, è ancora possibile riscontrare positività per l'insulina (20). Tali dati hanno suggerito, ancor più recentemente, che probabilmente la rigenerazione β -cellulare continua anche dopo l'insorgenza del DMT1 ma è pur vero che gli stessi autori hanno evidenziato che le cellule autoreattive sono anch'esse presenti dopo anni (21). Se da un lato queste evidenze lasciano ipotizzare che non è mai troppo tardi per stimolare la rigenerazione delle β -cellule, è chiaro nello stesso tempo, anche dopo anni dall'insorgenza, che resta il problema che le tracce dell'"insulite" permangono con la presenza di attori immunologici sempre in allerta.

Le considerazioni di cui sopra nell'insieme supportano l'ipotesi che l'immunoterapia nel DMT1 o anche nei soggetti a rischio dovrebbe modificare completamente l'assetto immunologico intrapancreatico insulare e, se questo non è attualmente realizzabile, bisognerebbe proseguirla per tutta la vita del soggetto con l'insulite.

2) Qual è il meccanismo d'azione di un immuno-intervento?

■) **Simona Cernea, Ilaria Barchetta, Paolo Pozzilli:** il problema della terapia sostitutiva insulinica consiste nel fatto che questa rappresenta una terapia palliativa e non curativa poiché non indirizzata direttamente alla etiopatogenesi del disturbo, ovvero al processo autoimmune. Le terapie immunologiche hanno lo scopo di annullare la reattività patologica verso autoantigeni, preservando pienamente la capacità di esercitare una risposta immunitaria efficace nei confronti dei patogeni esogeni al fine di ottenere una preservazione/ripristino della massa/funzione β -cellulare fino a livelli fisiologicamente sufficienti a mantenere il controllo metabolico. Vari metodi di immuno-intervento sono stati utilizzati allo scopo di ottenere l'immunotolleranza ed essi comprendono terapie sia antigene-specifiche sia non antigene-specifiche che hanno come bersaglio diverse componenti del supposto processo patogenetico. L'immunoterapia antigene-specifica consiste nella somministrazione di autoantigeni (insulina, *heat shock protein* (HSP), glutammico decarbossilasi (GAD) e i loro peptidi costitutivi) in un regime tollerogenico (attraverso diverse modalità: orale, inalatoria, sottocutanea) in modo da indurre una immunità protettiva. Questo effetto è ottenuto mediante la stimolazione delle cellule T regolatorie (T_{reg}) (che agiscono rilasciando citochine inibitorie, come interleuchina (IL)-10 e IL-4) attraverso la delezione/anergia di cellule T autoreattive e probabilmente modificando il loro fenotipo in un fenotipo non patologico (22–24). Le prime immunoterapie non antigene-specifiche utilizzavano agenti immunosoppressivi ad ampio spettro che causavano la deplezione o l'inattivazione delle cellule T patogeniche (come la ciclosporina, l'azatioprina e la globulina antitimocitica), ma esse sono state abbandonate a causa degli effetti collaterali provocati a breve e a lungo termine (25–29). I più recenti agenti non antigene-specifici, come gli anticorpi monoclonali umanizzati anti-CD3 (anti-CD3), che mostrano promettenti risultati e non si associano a simili effetti collaterali, agiscono principalmente inducendo la modulazione antigenica delle cellule T (legandosi al recettore delle cellule T, TCR), provocando anergia, induzione dell'apoptosi nelle cellule attivate (il che spiega la rapida eliminazione delle cellule T effettrici dai siti di infiammazione dove si riscontra un'elevata concentrazione di cellule T) e inducendo immunotolleranza attraverso T_{regs} adattativi (30, 31). Inoltre, agenti come la nicotinamide e l'anticorpo monoclonale anti-CD3 sembrano avere effetti benefici sulle β -

cellule pancreatiche espletando un'azione protettiva nei confronti degli agenti tossici e favorendo il recupero della funzione secretoria e probabilmente anche la rigenerazione delle β -cellule attraverso l'eliminazione dell'insulto infiammatorio (32–34). Perciò, strategie di intervento che agiscano sulla cascata patogenetica - e verosimilmente stimolando la rigenerazione delle isole pancreatiche - sono più auspicabili nel tentativo di arrestare o indurre a regressione la malattia rispetto a una esclusiva supplementazione dell'insulina mancante.

» **Carla Giordano, Lucilla Mantione:** gli interventi immunoterapici possono essere suddivisi in antigene-specifici e non antigene-specifici. Entrambi possono essere applicati in *trials* di prevenzione in soggetti a rischio e in *trials* in diabetici tipo 1 neodiagnosticati (Tabelle 2–5).

Gli interventi immunoterapici antigene-specifici hanno un vantaggio rispetto ai sistemici poiché non inducono una generalizzata immunosoppressione e quindi, con il loro utilizzo, si evitano le indesiderate conseguenze a breve e a lungo termine. Lo scopo dell'impiego di una terapia antigene-specifica è quello di ottenere la tolleranza attraverso l'induzione dei meccanismi di anergia o la delezione delle cellule autore attive antigene-specifiche, inducendone l'apoptosi. Non è ancora noto se in altri tentativi di terapia antigene-specifica sia il primo o il secondo meccanismo quello che si realizza, ma soprattutto se l'una o l'altra risposta dipendano dalla sua dose più che dal tipo di antigene utilizzato (35, 36). Recentemente sono state studiate le Treg specifiche per un singolo antigene. Teoricamente queste cellule potrebbero agire nella sede, in modo tessuto-specifico, come target molto selettivo a capacità immunosoppressoria senza compromettere l'immunità sistemica verso virus o altri patogeni e permettendo, quindi, il mantenimento dello stato di immunocompetenza. Le Treg dovrebbero agire come attivi immunosoppressori con un'ampia varietà di meccanismi. Prima di tutto avrebbero la funzione di garantire la produzione di citochine antinfiammatorie, quali IL-4, IL-10 o *transforming growth factor* (TGF)- β (35). Tali citochine interferirebbero con la presentazione dell'antigene da parte delle cosiddette cellule APC (*antigen presenting cells*) o sarebbero capaci di controllare una sottoclasse di cellule *responders* (36). Purtroppo, nel sangue circolante di un individuo, le Treg sono presenti in piccola quantità e non

Tabella 2 **Trials di prevenzione nel DMT1 utilizzando approcci antigene-specifici**

Agente	Somministrazione	Fase dello studio	Dettagli
Insulina	Parenterale	Pilota, completato 1993	Suggestivo di efficacia
Insulina	Parenterale	Pilota, completato 1998	Suggestivo di efficacia
Insulina (DPT-1)	Parenterale	Ampio studio di efficacia, completato 2002	Assenza di effetti sulla progressione della malattia
Insulina (DPT-1)	Orale	Ampio studio di efficacia, completato 2005	Assenza di effetti sulla progressione della malattia, tuttavia evidenza di effetti significativi del trattamento su soggetti con positività di anticorpi anti-insulina
Insulina (INIT-1)	Intranasale	Fase I, completato 2004	Assenza di accelerazione della perdita della funzione β -cellulare in soggetti ad alto rischio per T1DM
Insulina (DIPP)	Intranasale	Fase I, ongoing	
Insulina (INIT II)	Intranasale	Fase II, iniziato a dicembre 2006	Trial randomizzato, doppio cieco, placebo-controllato (1-6 mg o 16 mg)
Insulina	Orale	Studio di efficacia, programmato	Ripetizione del braccio orale del DPT-1
Insulina	Orale ed intranasale	Pilota, programmato	

Mod. da (19)

Tabella 3 Trials di prevenzione nel DMT1 utilizzando approcci non antigene-specifici

Agente	Somministrazione	Fase dello studio	Dettagli
Ketotifene (antagonista istaminico)	Orale	Pilota, completato 1994	Assenza di effetti
Ciclosporina	Orale	Pilota, completato 1996	Ritardo ma non prevenzione in soggetti ad alto rischio
Nicotinamide (DENIS)	Orale	Studio di efficacia, completato 1998	Assenza di effetti
Nicotinamide (ENDIT)	Orale	Studio di efficacia, completato 2004	Assenza di effetti
Varie combinazioni (con ciclosporina, terapia insulinica intensiva, vitamina E)	Orale	Pilota, 1994-2005	Assenza di effetti additivi
Bacillo di Calmette-Guérin (BCG)	i.d.	Vari studi pilota	Assenza di effetti
Dieta glutino-priva	Orale	Pilota, completato 2002	Assenza di effetti sugli autoanticorpi o sulla malattia
Vitamina D	Orale	Fase I, ongoing	
Latte vaccino idrolizzato (TRIGR)	Orale	Fase I, ongoing	
DHA	Orale	Pilota, ongoing	

i.d. = intradermico. Mod. da (19)

Tabella 4 Trials di intervento nel DMT1 utilizzando approcci antigene-specifici

Agente	Somministrazione	Fase dello studio	Dettagli
NBI-6024 ALP dell'insulina	s.c.	Fase I, completato	
Catena B dell'insulina più adiuvante incompleto di Freund	s.c.	Fase I, completato	
DiaPep277® (hsp60 peptide)	s.c.	Fase II, completato	Fase II in soggetti adulti: preservazione del C-peptide a 12-18 mesi Fase II in bambini: assenza di effetti
Proinsulina	i.d.	Fase I, ongoing	
GAD-65	s.c.	Fase I, completato in LADA	Fase II completato in bambini con DMT1
Proinsulin-based DNA vaccine (BHT-3021)	i.m.	Fase I, programmata	

i.m. = intramuscolo. Mod. da (19)

Tabella 5 **Trials di intervento nel DMT1 utilizzando approcci non antigene-specifici**

Agente	Fase dello studio	Dettagli
Ciclosporina	Vari trials completati 1984-1996	Remissione indotta con successo in pazienti con recente diagnosi, sebbene terapia interrotta a causa di effetti collaterali
Nicotinamide	Pilota	Assenza di effetti
Globulina anti-timociti più prednisone	Pilota	Riduzione del fabbisogno insulinico per più di 100 giorni dopo la terapia; complicato da severa ma transitoria trombocitopenia
BCG	Pilota	Assenza di effetti
Diazossido		Assenza di effetti
IFN- γ	Fase I	Possibili effetti
PRODIAB (oral protease)	Fase I	Assenza di effetti
Anti-CD3 MoAb hOKT3gl(Ala-Ala)	Fase I/II, completato 2002	Remissione fino a 18 mesi
Anti-CD3 MoAb ChAglyCD3(TRX4)	Fase II, completato 2005	Ridotto fabbisogno insulinico fino a 18 mesi
hOKT3gl(Ala-Ala)	Fase II	Ongoing
hOKT3gl(Ala-Ala)	Fase I/II	Programmato
ChAglyCD3(TRX4)	Fase II/III	Programmato
Anti-CD20 MoAb (Rituximab)	Fase II	Ongoing
Globulina anti-timocita (ATG)	Fase I	Ongoing
Globulina anti-timocita (ATG)	Fase II	Programmato
Anti-CD52 (Campath-1H)	Fase I	Programmato
Cellule di sangue di cordone ombelicale autologo	Fase I	Ongoing
Geni autologi ingegnerizzati	Fase I	Inizio 2007

Mod. da (19)

sono analizzabili con metodologie riproducibili da giorno a giorno o in rapporto alle diverse condizioni esaminate. Infatti, le Treg sono molto eterogenee, agiscono attraverso una numerosa serie di meccanismi e studiare la loro attività *in vitro* con l'obiettivo di rispecchiare la loro funzione *in vivo* non è ancora oggi proponibile (37, 38). Gli studi più interessanti sono stati condotti con l'insulina orale che, sulla base degli incoraggianti risultati ottenuti da Weiner nel modello murino, è stata somministrata nel *Diabetes Prevention Trial* (DPT) in parenti sia di primo sia di secondo grado di soggetti affetti da DMT1 (39). Questo studio, che ha avuto il grande vantaggio di permettere lo screening di circa 100.000 parenti, non ha prodotto alcun risultato per quanto riguarda sia il braccio che comprendeva soggetti trattati con insulina s.c. (poiché identificati come "ad alto rischio"), sia il braccio che includeva parenti di secondo grado definiti come soggetti a "rischio intermedio" (40). Attualmente si sta proseguendo uno studio nell'ambito di *TrialNet* in soggetti con alti anticorpi anti-insulina endogena (IAA). Il problema maggiore che si evince dall'analisi di questi dati deriva dall'osservazione che probabilmente la dose di insulina orale di 7,5 mg/die utilizzata nell'uomo è risultata essere da circa 5 a 8 volte minore di quella impiegata nel topo. In atto sono in corso *trials* con l'uso intranasale di insulina che rende più probabile una congrua dose di assorbimento mucosale rispetto alla via orale (41). Anche in questo caso si presume che il target terapeutico possa essere rappresentato dalle Treg ma, come già detto, è molto difficile poter indagare l'induzione di queste cellule.

Quando si esaminano i dati dei *trials* antigene-specifici effettuati nei DMT1 neodiagnosticati non si evidenzia alcun risultato positivo. La somministrazione della catena B dell'insulina in adiuvante incompleto di Freund si è dimostrata molto efficace nella prevenzione del diabete nell'animale da esperimento, agendo come induttore delle cellule *T helper* (Th)2 (42). I *trials* con l'insulina non hanno evidenziato risultati clinicamente rilevanti quando l'ormone è stato somministrato come autoantigene, mentre è risultato efficace nel concetto di riduzione dello "stress metabolico" delle β -cellule superstiti quando somministrato ai pazienti neodiagnosticati. Infatti, un trattamento

intensivo tipo *basal/bolus* è in grado di ripristinare la secrezione endogena di insulina probabilmente perché, riducendo il lavoro della β -cellula, si riesce a mascherare gli autoantigeni β -cellulari al sistema immunologico. Si ritiene possibile che il ripristino della condizione euglicemica possa di per sé favorire la rigenerazione e la replicazione delle β -cellule superstiti (43).

Una terza ipotesi si basa sul concetto che subito dopo la diagnosi si possa creare una modifica transitoria del profilo delle citochine che da proinfiammatorio, tipo Th1, divenga antinfiammatorio, tipo Th2, con produzione di IL-10 (44). Se ciò è vero, diviene estremamente importante inserire sin dall'esordio il concetto del raggiungimento in tempi brevi del buon controllo glicometabolico, approfittando di questa finestra abbastanza fugace.

Ad oggi i risultati più interessanti sono quelli ottenuti con la somministrazione dell'anticorpo monoclonale anti-CD3, trattato per eliminare il frammento Fc al fine di evitare il legame con le cellule T (45, 46). Con questo anticorpo è stata osservata una sindrome caratterizzata da un temporaneo rilascio di citochine regolatorie con solo una breve riduzione numerica delle cellule T. Subito dopo il trattamento si instaura una buona capacità di immunocompetenza con un interessante aumento delle cellule Treg esprimenti il recettore FoxP3. Purtroppo in questi casi si è osservata una tendenza alla riattivazione di infezione da Epstein-Barr virus (EBV).

3) Quali sono i benefici/le evidenze dell'efficacia clinica?

■) **Simona Cernea, Ilaria Barchetta, Paolo Pozzilli:** numerosi studi clinici di fase II/III hanno valutato l'efficacia e la sicurezza di vari agenti immunomodulatori in soggetti ad elevato rischio di diabete (studi di prevenzione primaria) e in soggetti affetti da DMT1 o con diabete autoimmune latente dell'adulto (LADA) (47).

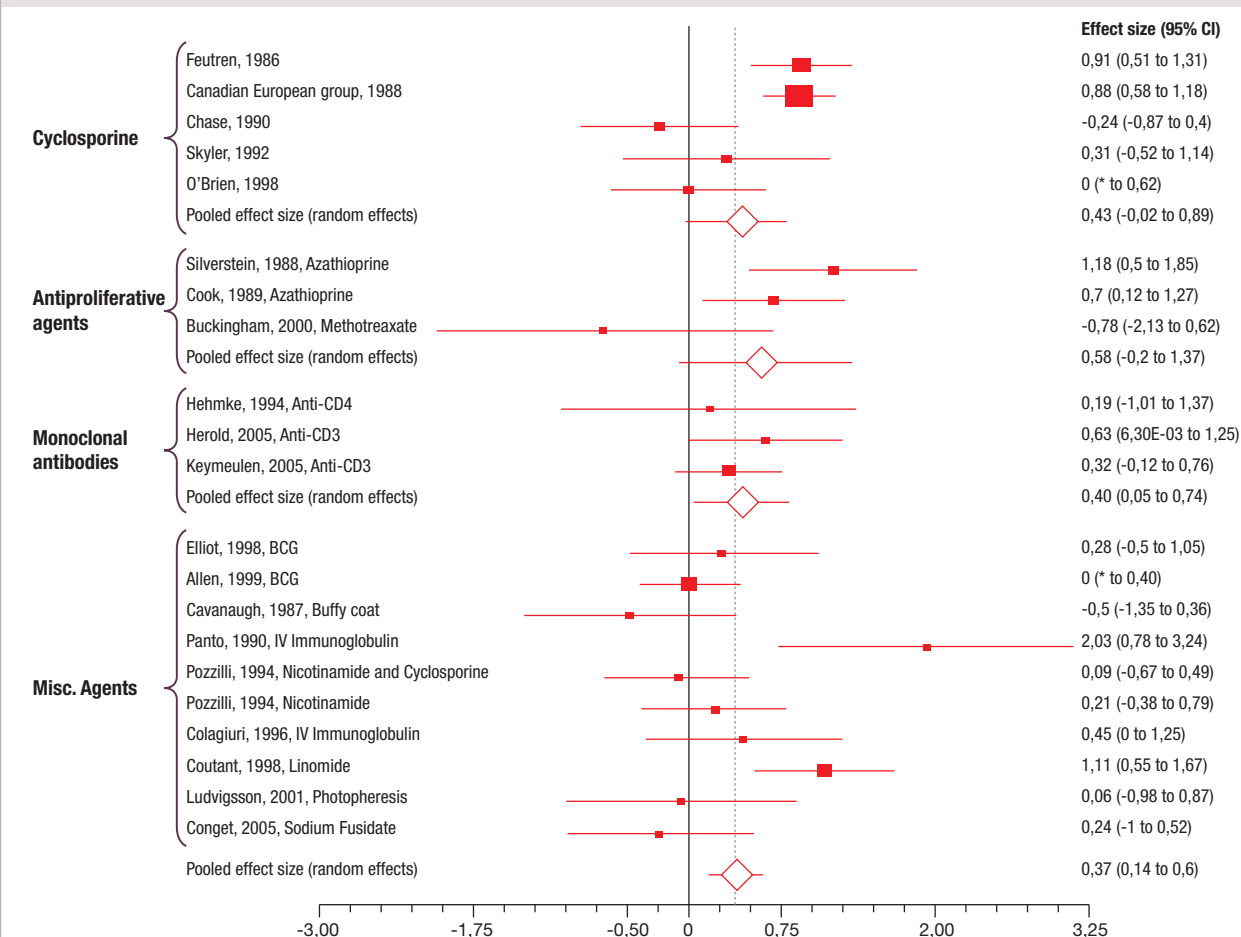
Sebbene due studi clinici effettuati su larga scala per valutare l'efficacia del trattamento preventivo del diabete con agenti antigene-specifici (*European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial*, ENDIT e *Diabetes Prevention Trial-Type 1*, DPT-1) abbiano mostrato risultati deludenti nel prevenire o ritardare l'insorgenza della malattia, una analisi *post-hoc* del DPT-1 ha indicato che i soggetti con alto titolo anticorpale che avevano ricevuto insulina orale hanno avuto un ritardo nello sviluppo del DMT1 (40, 48, 49). Questo indica che la chiave per il successo di studi di prevenzione potrebbe essere una selezione più rigorosa dei pazienti e questa ipotesi è attualmente alla base degli studi condotti dal *Type 1 Diabetes TrialNet* (<http://www.diabetestrialnet.org>) nei quali si utilizza insulina per la prevenzione della malattia in soggetti a rischio di diabete aventi le caratteristiche individuate nel sottogruppo del DPT-1 (50, 51). Altri studi hanno impiegato terapie antigene-specifiche a breve termine mirate ad alterare la risposta immunitaria in modo da apportare sostanziali benefici ai pazienti affetti da DMT1 o LADA. Un peptide immunomodulatorio umanizzato, derivato da HSP60 e modificato allo scopo di aumentare la sua stabilità *in vivo* (DiaPep277®), ha mostrato interessanti capacità di ottenere un miglior mantenimento del C-peptide nei soggetti con DMT1 di recente insorgenza (52-54). Al termine di 10, 12 e 18 mesi di follow-up il gruppo di intervento ha incrementato o mantenuto il livello medio di C-peptide ed è stata necessaria una quantità di insulina significativamente inferiore per ottenere lo stesso livello di HbA_{1c} rispetto al gruppo trattato con placebo. È interessante notare come, nei soggetti immunizzati, il farmaco agisce sul fenotipo di risposta al DiaPep277® attraverso la stimolazione della produzione di citochine Th2 (IL-10, IL-3). Inoltre, è stato condotto uno studio clinico randomizzato di fase II multicentrico in doppio-cieco nei pazienti con LADA per valutare la sicurezza, la tollerabilità e l'efficacia clinica, metabolica e immunologica di dosi multiple sottocutanee di DiaPep277®. I risultati non sono ancora stati pubblicati ma un *brief report* suggerisce una buona sicurezza e tollerabilità e una possibile risposta al DiaPep277® in questi pazienti (55). Similmente, il report di un studio clinico di fase II in doppio-cieco nei pazienti con LADA in trattamento con GAD umana ricombinante allume-formulata (*Diamyd*) ha mostrato, nel gruppo trattato con 20 µg, un aumento rispetto al *baseline* del C-peptide log basale e stimolato e delle cellule Treg nel sangue periferico; la sua efficacia è stata ulteriormente valutata nel *TrialNet intervention trials* (56). Risultati promettenti e degni di nota sono stati inoltre riportati nei due studi che hanno impiegato due differenti anticorpi monoclonali anti-CD3, umanizzati e modificati (per ridurre la tossicità), nei pazienti con recente esordio di DMT1 (45, 46, 57). Entrambi gli studi di fase II hanno mostrato una preservazione della funzione β -cellulare con un mantenimento di una maggiore secrezione endogena di insulina (valutata mediante il livello di C-peptide stimolato) nei gruppi trattati con anti-

CD3. Inoltre, è stata osservata una concomitante riduzione della HbA_{1c} e del fabbisogno insulinico nel gruppo trattato dopo un periodo di tempo di almeno 1 anno. Lo studio europeo riporta che il 75% del sottogruppo di pazienti con una massa pancreatica residua maggiore della media necessita di una dose di insulina <0,25 U/kg/die, dose praticamente compatibile con l'indipendenza insulinica clinica (45). Di certo sono necessari ulteriori sforzi al fine di identificare chiaramente la sottopopolazione di soggetti in grado di beneficiare a pieno di questi interventi e di definire la loro tempistica. Attualmente è chiaro che l'immuno-intervento nei pazienti con DMT1 offre un vantaggio in termini di preservazione della funzione β -cellulare residua.

» **Carla Giordano, Lucilla Mantione:** nelle Tabelle 4 e 5 sono riportati tutti gli studi di intervento effettuati nei pazienti con DMT1 neodiagnosticati. I risultati ad oggi raggiunti sono inconsistenti e soprattutto, sin dal primo trial con l'uso della ciclosporina, è stato evidenziato che, appena il farmaco viene sospeso, tutti i miglioramenti ottenuti sono persi nel giro di pochi mesi (58). In ogni caso, a fronte dei temporanei benefici, alcune conseguenze legate al farmaco sono persistenti, come ad esempio la nefrotossicità.

Una recente metanalisi, la prima applicata ai trials immunoterapici in pazienti DMT1, ha rivalutato i dati di efficacia degli interventi non antigene-specifici nel preservare la funzione β -cellulare in pazienti trattati (Figura 1).

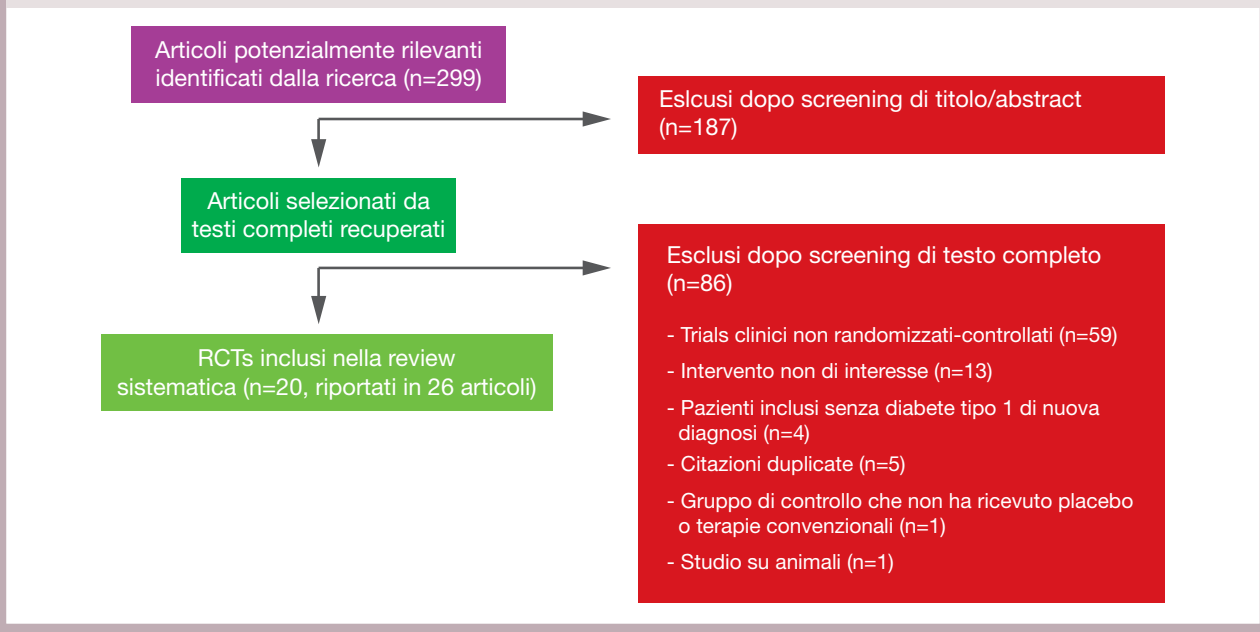
Figura 1 **Metanalisi degli studi condotti sugli effetti dell'immunoterapia nella preservazione della funzione β -cellulare in pazienti con DMT1 all'insorgenza**



La linea verticale rappresenta l'assenza dell'effetto terapeutico. I quadrati e le linee orizzontali rappresentano i punti stimati e gli intervalli di confidenza associati per ogni singolo confronto effettuato. I punti alla destra della linea verticale esprimono la protezione β -cellulare favorita dall'intervento immunoterapico rispetto ai pazienti controllo. I risultati sono espressi come SD (effect size)

Sono stati analizzati tutti i *trials* condotti nei pazienti neodiagnosticati che avessero almeno effettuato un follow-up superiore o uguale a 6 mesi. Sono stati valutati gli studi che avevano impiegato agenti antiproliferativi (methotrexate, azatioprina), anticorpi monoclonali (anti-CD3, anti-CD4), inibitori della calcineurina (ciclosporina) e altre immunoterapie non antigene-specifiche (fotoferesi, linomide, fusidina, *buffy coat*, immunoglobuline ev, bacillo di Calmette-Guérin, nicotinamide). Gli studi sono stati selezionati qualora condotti rispetto a soggetti controllo “neodiagnosticati” (non-storici) o trattati con placebo. Nella Figura 2 si osserva come sono stati selezionati i lavori. Si può notare che sono stati presi in considerazione articoli potenzialmente rilevanti e fra questi solo 20 hanno aderito ai semplici criteri di selezione stabiliti, ovvero gruppo trattato con placebo o gruppo controllo. La metanalisi è stata effettuata su un totale di 1187 pazienti. I risultati salienti hanno condotto all’osservazione che l’immunoterapia può preservare transitoriamente la funzione β -cellulare nei pazienti DMT1 se impiegata per un periodo almeno superiore ai 6 mesi. La metanalisi ha rilevato che il mantenimento del C-peptide è definibile come incerto.

Figura 2 **Metodologia di selezione degli studi immunoterapici in corso di DMT1 ai fini della valutazione dei criteri di idoneità adottati nella metanalisi**



Mod. da (59)

4) Quali sono gli effetti collaterali? Il rapporto rischio/beneficio è a favore di un immuno-intervento?

«**Simona Cernea, Ilaria Barchetta, Paolo Pozzilli:** in teoria, l’immunoterapia con peptidi potrebbe indurre la formazione di autoanticorpi contro il peptide somministrato o l’anafilassi ma, di fatto, negli studi condotti non è stato riferito alcun effetto collaterale così importante (40, 48, 51–55). Lo studio di prevenzione con insulina DPT-1 non ha riportato alcun episodio di ipoglicemia severa bensì una frequenza di ipoglicemia indotta dal trattamento simile a quella del gruppo trattato con placebo (40, 48). Gli effetti collaterali riscontrati nei protocolli DiaPep277® sono prevalentemente locali, includendo dolore, reazione o infiammazione nel sito di iniezione a risoluzione spontanea, febbre o reazioni allergiche (come l’orticaria). Gli investigatori hanno ritenuto che nessun effetto avverso serio verificatosi potesse essere correlato alla somministrazione del farmaco ad eccezione di un singolo

caso di proteinuria progressiva ed ematuria la cui associazione con il trattamento non è stata esclusa (questo soggetto è stato estromesso dal protocollo) (54). Lo studio *Diamyd* ha riportato che il 68% dei pazienti è andato incontro ad eventi avversi, principalmente a una sintomatologia simil-influenzale (rinofaringite) e tre eventi avversi sono stati giudicati essere associati al trattamento: un caso di *vitiligo* (in seguito riscontrato nel gruppo con placebo), un caso di lieve leucocitosi e un caso di leggera infiammazione nel sito di iniezione (entrambi i casi completamente risolti). Durante lo studio non si sono verificati né eventi avversi seri né decessi (56). L'anticorpo monoclonale anti-CD3 impiegato in due protocolli è stato modificato allo scopo di evitare il legame con la porzione Fc e il verificarsi di effetti collaterali (principalmente sotto forma di sindromi da rilascio di citochine). Si nota comunque una moderata attivazione delle cellule T a seguito del loro impiego. Questo conduce a un modesto rilascio di citochine e ad eventi avversi, come cefalea, febbricola, sintomi gastrointestinali e *rash*, ma questi sono stati episodi autolimitanti o rispondenti ai comuni interventi palliativi (con difenidramina e/o ibuprofene) (45, 46, 57). Nello studio europeo i pazienti con infezione primaria da EBV hanno manifestato una transitoria riattivazione, indicata dall'aumento del numero di copie virali nei monociti periferici dopo la prima dose di anti-CD3. Tale riattivazione è stata transitoria e autolimitante, non ha coinvolto altri virus e non si è rimmanifestata in nessun paziente durante l'intera durata del trattamento (4–7 anni). In circa il 40% dei soggetti trattati, 2–3 settimane dopo la somministrazione di anti-CD3, si sono prodotti anticorpi anti-idiotipo ma, nella maggior parte dei casi, sono scomparsi entro 6 mesi. Nonostante il loro potere neutralizzante, la loro presenza non ha influenzato l'efficacia del trattamento iniziale; potrebbero costituire un problema solo in caso di risomministrazione del farmaco. Concludiamo, dunque, che complessivamente le evidenze fin qui ottenute mostrano una buona tollerabilità e sicurezza delle immunoterapie come anche l'assenza di effetti collaterali maggiori riportati negli studi e la presenza di effetti minori, comunque autolimitanti e responsivi ai trattamenti palliativi. Secondo la nostra opinione, il giovamento di un trattamento efficace che interferisca con il processo autoimmune, sebbene accompagnato da lievi effetti collaterali, sposta definitivamente il rapporto rischio/beneficio in favore dell'utilizzo di queste terapie.

■) **Carla Giordano, Lucilla Mantione:** dalla metanalisi di Gandhi et al. (Figura 1), relativa ai *trials* di immunoterapia con ciclosporina (n=5), agenti antiproliferativi (n=3), anticorpi monoclonali (n=3) e agenti misti (n=10), risulta evidente che i benefici, gli effetti collaterali indesiderati, i costi, ecc. non sono deducibili oltre il 6° mese per tutti i pazienti (59). I risultati esaminati non permettono di considerare questi trattamenti come opzioni da inserire nel programma di cura del DMT1 rispetto alla ormai consacrata terapia ormonale sostitutiva con insulina. Inoltre, queste valutazioni di costo-beneficio risultano fortemente influenzate da semplici osservazioni cosiddette a breve termine, come ad esempio il numero di crisi ipoglicemiche. Poche conoscenze sugli effetti dell'immunoterapia a lungo termine, quali nefrotossicità, tumori, infezioni, ecc. possono essere dedotte (Tabella 6) (59).

5) Sono presenti altre modalità di trattamento efficaci?

■) **Simona Cernea, Ilaria Barchetta, Paolo Pozzilli:** l'unico trattamento disponibile finora per il DMT1 è la terapia sostitutiva con insulina che essenzialmente rimpiazza l'ormone endogeno mancante. È generalmente riconosciuto che, prima della perdita anatomica di β -cellule pancreatiche, sia presente un danno funzionale - suggerito dal verificarsi del periodo di luna di miele - e che la terapia insulinica possa prolungare questo periodo di remissione clinica migliorando la funzionalità β -cellulare (60, 61). Infatti, numerosi studi indicano che dopo l'inizio della terapia insulinica vi sia un transitorio miglioramento della sensibilità/azione insulinica (probabilmente attraverso un aumento della quota di glucosio captata dagli adipociti e da altri tessuti insulino-sensibili) che potrebbe spiegare la riduzione della dose insulinica giornaliera in questo periodo, con il mantenimento di un buon controllo metabolico (62–64). Inoltre, uno studio condotto in 95 pazienti DMT1 con un follow-up di 1 anno dopo la diagnosi ha indicato che l'inizio e la fine del periodo di remissione non si associavano né a significative modificazioni dei livelli di C-peptide, né al titolo di anticorpi anti-isole o anti-insulina (65). Questo suggerisce che la terapia insulinica, somministrata ai regimi richiesti per ottenere il controllo glicemico (che può implicare sia la dose sia la via di somministrazione), non interferisce con i processi autoimmuni e quindi non espleta effetti duraturi sulla preser-

Tabella 6 Trials controllati randomizzati inclusi nella metanalisi

Primo Autore	N° tot. di pazienti	N° gruppo di intervento	N° gruppo di controllo	Età	Agente	Dose, somministrazione frequenza, durata	Durata del trattamento	Follow-up (mesi)
Anti-proliferativi								
Buckingham 2000	10	5	5	7-12	Methotrexate	5 mg/m ² /a sett. po	12 mesi	36
Cook 1989	49	24	25	\	Azatioprina	2 mg/kg/al giorno po	12 mesi	12
Silverstein 1988	46	23	23	NR	Azatioprina	2 mg/kg/al giorno po	12 mesi	12
Allen 1999	94	47	47	5-18	BCG	2x10 ⁶ UFC in 0,1 mL di diluente i.d.	Una sola volta	24
Altro								
Elliot 1998	26	13	13	tutte	BCG	0,1 mg i.d	Una sola volta	18
Colagiuri 1996	52	17	35	tutte	IV Ig	IV Ig 2 g/kg ogni 2 mesi	12 mesi	12
Pantò 1990	16	8	8	tutte	IV Ig	0,4 g/kg per 1 sett.; quindi una volta/sett.	6 sett.	6
Conget 2005	28	15	13	18-34	Fusidina	500 mg po tre volte al giorno per 4 sett., quindi 500 mg po tre volte al giorno per due sett. Ogni mese	5 mesi	12
Cavanaugh 1987	22	12	10	7-28	Buffy coat	Un buffy coat a sett.	5 sett.	6
Pozzilli 1994	90	30	30	NR	Nicotinamide	25 mg/kg	12 mesi	12
Coutant 1998	63	42	21	10-20	Linomide	2,5 mg po al giorno	12 mesi	12
Ludvigsson 2001	49	25	24	10-18	Fotoferesi		Una sola volta	36
Anticorpi monoclonali								
Herold 2005	42	21	21	7,5-30	Anti-CD3		14 giorni	24
Keymeulen 2005	80	40	40	12-39	Anti-CD3		6 giorni	18
Hehmke 1994	11	5	6	NR	Anti-CD4		10 giorni	12
Inibitori T-cellulari								
O' Brien 1998	43	NR	NR	tutte	Ciclosporina	8,2 mg/kg/al giorno po	4 mesi	12
Pozzilli 1994	90	30	30	NR	Ciclosporina e Nicotinamide	Nicotinamide 25 mg/kg +Ciclosporina 5 mg/kg	12 mesi	12
Skyler 1992	23	10	13	tutte	Ciclosporina	10 mg/kg/al giorno	12 mesi	12
Chase 1990	43	22	21	8-36	Ciclosporina	10 mg/kg/al giorno po	4 mesi	36
Feutren 1986	122	63	59	15-40	Ciclosporina	7,5 mg/kg/al giorno po	>9 mesi	9
Canadian European Group 1988	188	93	94	10-35	Ciclosporina	10 mg/kg po	>9 mesi	12

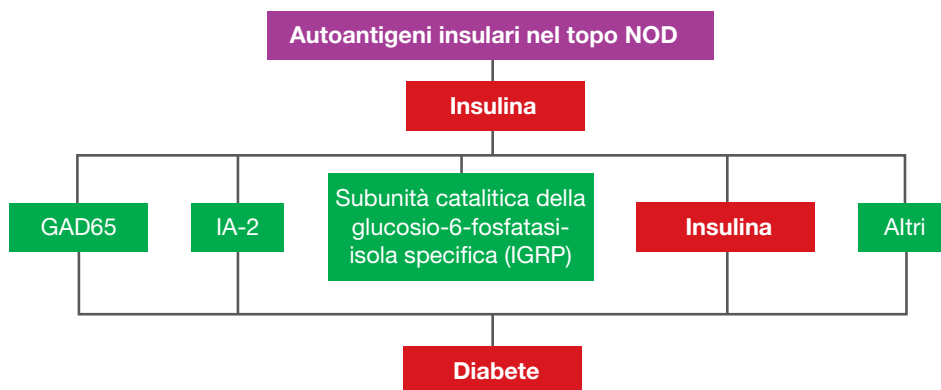
Mod. da (59)

vazione della massa e/o funzione β -cellulare. Questo dato è essenzialmente confermato dalla realtà clinica dal momento che, sebbene i pazienti DMT1 vengano trattati con insulina dopo la diagnosi, la malattia segue comunque il suo corso naturale verso la distruzione β -cellulare. Perciò, il regime (tollerogenico) e la tempistica della somministrazione insulinica potrebbero essere essenziali al fine di ottenere un arresto del processo autoimmune e un miglioramento del corso della malattia. Questo è, infatti, suggerito anche dall'evidenza che un intensivo (e non con-

venzionale) regime insulinico (possibilmente attraverso una insulinizzazione continua a basse dosi) potrebbe preservare la secrezione di C-peptide (66). Pertanto, alla luce di queste considerazioni, possiamo concludere che finora non è presente alcuna modalità (eccetto le emergenti terapie immuno-basali) di trattamento del DMT1 in grado di modificare effettivamente il processo immune diretto contro le β -cellule pancreatiche e di avere allo stesso modo un effetto diretto protettivo sulle stesse.

■) **Carla Giordano, Lucilla Mantione:** l'insulina rappresenta il principale autoantigene della β -cellula ed è il target primario per l'inizio del processo autoimmune nei soggetti giovani (Figura 3). L'insulina, infatti, è stata impiegata da molteplici decenni per la cura dei pazienti DMT1 e, più recentemente, è stata somministrata per via orale, intranasale o inalata in pazienti e in soggetti sani. Vi sono numerose evidenze che indicano che le vie intranasale o orale sono rassicuranti dal punto di vista della sicurezza. La somministrazione mucosale degli autoantigeni induce un'immunità protettiva con la potenzialità di sopprimere le immunoreazioni distruttive tipiche delle malattie autoimmuni. Infatti, i peptidi derivati dalla somministrazione orale o intranasale dell'antigene somministrato intervengono sul tessuto linfoide associato alla mucosa, oggi noto come il più incisivo determinante nei meccanismi di protezione dell'ospite nei confronti dei patogeni e di prevenzione delle reazioni avverse contro costituenti del cibo. Il concetto base si fonda sul principio che basse dosi di autoantigene, somministrato attraverso la superficie mucosale, sopprimano l'autoimmunità, inducendo cellule T regolatorie che a loro volta liberano citochine inibitorie, quali il TGF- β , IL-10 e IL-4, in particolare a livello dell'organo bersaglio. Se la somministrazione delle dosi di antigene è elevata si ritiene che si possa realizzare una condizione di anergia e/o la delezione delle cellule autoreattive. Nel topo *non obese diabetic* (NOD) la somministrazione orale o intranasale di insulina o di alcuni suoi peptidi induce le cellule T regolatorie che prevengono il diabete (67). Per quanto riguarda l'insulina orale, la dose utilizzata nei topi varia da 1 a 100 mg/kg/die secondo vari schemi di somministrazione. Nello studio di Zhang et al. la dose ottimale era uguale a 100 mg/kg due volte alla settimana, corrispondente a 300 mg/m/dose o 600 ng/m²/wk negli uomini (68). Un effetto parziale è stato riscontrato alla dose da 10 a 20 mg/kg/die ma non a quella da 1 a 2 mg/kg/die. La terapia con insulina orale si è dimostrata più efficace quando somministrata nei topi neonati. La via di somministrazione intranasale offre una buona alternativa a quella orale. Esperimenti in topi hanno evidenziato una maggiore biodisponibilità dell'antigene al sistema immunologico attraverso questa via di somministrazione rispetto a quella orale. La somministrazione intranasale nel topo NOD è stata associata alla soppressione del diabete anche quando il trattamento si instaurava dopo l'insorgenza dell'insulite a 8 settimane di vita. Nello stesso tempo è stato osservato un aumento delle cellule CD8 esprimenti l'IL-10 a livello dei linfonodi pancreatici e delle T cellule CD8 nella milza. Queste cellule T regolatorie esercitano la funzione di soppressione "antigene non specifica *bystander*" in risposta allo specifico antigene riconosciuto a livello dei linfonodi regionali (69).

Figura 3 L'insulina rappresenta il target primario nel processo autoimmunitario insulare e conduce alla successiva espressione di epitopi



6) Come identificare i partecipanti idonei agli studi di intervento?

«**Simona Cernea, Ilaria Barchetta, Paolo Pozzilli:** mentre non vi è un accordo generale che interventi precoci potrebbero offrire migliori possibilità per la conservazione funzionale e quantitativa della massa β -cellulare del pancreas, rimane ancora problematica la scelta dei giusti candidati prima dell'insorgenza di malattia poiché non sono definiti i marcatori che identificano con 100% di specificità e sensibilità i soggetti che svilupperanno il diabete. Allo stato attuale, la predizione è basata sulla suscettibilità genetica, sul risultato di test metabolici e sull'individuazione di autoanticorpi, ma molti soggetti geneticamente predisposti e con autoanticorpi circolanti sono destinati a non sviluppare mai il diabete o ad ammalarsi dopo molti anni (70).

Così, mentre non si è ancora in grado di predire in maniera accurata e robusta l'insorgenza della malattia, è invece facile (ed etico) svolgere protocolli di intervento in pazienti con una recente diagnosi di DMT1; questi soggetti hanno già un chiaro segno della malattia (iperglicemia), sono di certo fortemente motivati e il corso della malattia è ancora sensibile a una modulazione (71). Inoltre, questi protocolli richiedono l'impiego di un esiguo numero di pazienti nell'arco di un breve periodo di tempo per dimostrare l'efficacia dell'intervento.

La *Immunology of Diabetes Society* ha pubblicato delle linee-guida per la selezione dei soggetti da includere nei protocolli di intervento (72). A parte la diagnosi di DMT1 effettuata attraverso i criteri dell'*American Diabetes Association* (ADA), è richiesta la presenza di altri parametri, inclusi la positività per almeno un anticorpo [GAD65, insulina (se in terapia insulinica da meno di 2 settimane), anti-tirosina fosfatasi (IA-2), o *islet cell antibody* (ICA)], livelli di C-peptide $\geq 0,2$ nmol/L dopo il test di tolleranza con pasto misto liquido (eseguito in una fase di stabilità metabolica del paziente), età ≤ 35 anni (per *trials* di fase II e III) e ≥ 18 anni (per *trials* di fase I). Questi criteri sono considerati necessari e sufficienti per identificare i soggetti con diabete autoimmune e con una sufficiente funzionalità residua β -cellulare condizione, questa, che permette di valutare l'efficacia della terapia d'intervento.

«**Carla Giordano, Lucilla Mantione:** il punto cruciale per il raggiungimento di un rapido controllo glicometabolico nel paziente DMT1 neodiagnosticato nasce prima di tutto dal mantenimento di uno stretto contatto e dialogo non solo con il soggetto interessato ma anche con la famiglia. Tutti gli studi clinici hanno evidenziato che mai come nel periodo adolescenziale divengono importanti alcune misure, quali la negoziazione, l'alleanza terapeutica fra il diabetologo e il giovane adolescente, la chiara definizione dei tempi e modi per il raggiungimento del soddisfacente valore di HbA_{1c}, ecc. L'esperienza clinica ha evidenziato che, quando i genitori permettono agli adolescenti di avere un'autonomia gestionale per il management del proprio diabete, senza un'adeguata maturità cognitiva e sociale, i giovani avranno maggiori problemi nel corso della fase postdiagnosi. Quindi, un aspetto critico molto importante è rappresentato dal riuscire a trovare le vie perché genitori e membri familiari siano di supporto, ma non degli intrusi, nel programma di cura giornaliera del giovane diabetico. La creazione di uno stretto rapporto di empatia e la condivisa alleanza terapeutica possono facilitare il raggiungimento della fase di remissione. In sintesi, quest'ultima è fortemente influenzata dallo stato sociale, psicologico e culturale del paziente DMT1 e della sua famiglia. La famiglia cerca nel corso dei primi mesi la possibilità di guarigione e, ad oggi, tutti i pazienti che hanno partecipato a *trials* di immunoterapia, seppure non esiste documentazione scientificamente adeguata, lo hanno fatto probabilmente nella speranza di sospendere o ritardare nel tempo le misure terapeutiche tradizionali, quali la terapia insulinica, la dietoterapia, gli aspetti psicologici di insuccesso derivati dall'esordio di una patologia cronica. Il candidato ideale dovrebbe essere un soggetto con stabilità psichica che sia selezionato sulla base non solo dei test specifici di autoimmunità e glicometabolici, ma anche attraverso test psicologici somministrati da addetti ai lavori, quali psichiatri o psicologi adeguatamente formati (candidato informato). L'informazione sul perché inserire il soggetto in un *trial* di immunoterapia dovrebbe essere dettagliata, con chiare informazioni sul tipo di successo che si potrà ottenere, ovvero il parziale recupero o mantenimento della secrezione endogena residua di insulina. Ciò solleva il problema dell'eticità dell'immunoterapia: se ad oggi non esiste un caso di guarigione, il soggetto che partecipa deve esser cosciente che solo nel corso del follow-up a distanza di anni si potrà valutare ciò per cui è servita la sua partecipazione. I familiari dovranno anch'essi essere informati e, se genitori di un minore, devono acquisire il necessario bagaglio di informazioni al fine di evitare che la partecipazione del proprio figlio/a al *trial* di immunoterapia non risulti una miracolosa speranza di guarigione.

Informazione e consenso informato sono prerequisiti indispensabili per qualsiasi *trial* di immunoterapia che si voglia avviare.

Per l'identificazione dei soggetti a rischio occorre considerare i **marcatori genetici**, i **marcatori autoanticorpali** e i **parametri metabolici**.

Riguardo ai marcatori genetici, neonati ad alto rischio di DMT1 possono essere identificati prima che l'autoimmunità insulare sia palese. Neonati che hanno un parente di primo grado con storia familiare di DMT1 e HLA a rischio, quali il genotipo DR3/4-DQ8 o DR4-DQ8/DR4-DQ8 hanno un rischio di sviluppare autoanticorpi durante l'infanzia di circa il 20% (o anche più). In alcuni casi il rischio di sviluppare autoanticorpi insulari può superare il 50%. Nella popolazione *BabyDIAB* il 55% dei neonati che avevano storia familiare di primo grado o che avevano il DR3/4-DQ8 o DR4-DQ8/DR4-DQ8 sviluppavano autoanticorpi tipici del diabete nei primi anni di vita e la maggior parte di coloro che avevano pluri-autoanticorpi insulari aveva un rischio maggiore di manifestare la malattia (73). La tipizzazione HLA è stata utilizzata come screening per la selezione di soggetti ad alto rischio nello studio *Diabetes Autoimmunity Study in the Young* (DAISY) che ha analizzato circa 2000 bambini in Colorado. Lo screening del genotipo DR/DQ ha permesso l'identificazione di un aumento di circa il 20% di rischio in questa popolazione con la stima di circa l'80% di casi di futuro diabete in questa coorte selezionata. I partecipanti sono stati seguiti con periodicità per i livelli di autoanticorpi (74). In UK tali dati sono stati confermati in una coorte di soggetti parenti di primo grado di pazienti con DMT1 (75). C'è accordo unanime che lo screening degli antigeni di classe II nella popolazione generale assieme ai livelli autoanticorpali potrebbe essere molto utile. Altri *loci* sono sospettati come capaci di conferire il rischio ma non ci sono ancora dati certi.

Per quanto riguarda i marcatori autoanticorpali, al momento della presentazione clinica del DMT1 l'85–90% dei pazienti possiede almeno uno o più anticorpi che possono essere positivi anche da più di 10 anni prima dell'esordio clinico della malattia. Negli studi di screening coloro che risultano positivi a due o più autoanticorpi sono considerati a rischio di progressione per il DMT1. Nel DPT-1 si è dimostrato che il rischio aumentava con la presenza di più autoanticorpi. Il rischio a 5 anni andava dal 6,7% di coloro con positività solo per l'ICA al 63,5% in quelli con positività per ICA, IA-2 e GAD65 e IAA. La positività per due autoanticorpi, antiGAD e anti-IA-2, era associata a un rischio del 71%. Quindi, il titolo degli autoanticorpi è predittivo della velocità di progressione (40, 76).

Considerando i parametri metabolici, a tutt'oggi si ritiene che un soggetto diagnosticato che si presenti alla prima osservazione con franca chetoacidosi, elevata HbA_{1c} e alti titoli di autoanticorpi anti-β-cellula pancreatica sia un candidato non idoneo poiché rappresenterebbe un soggetto che è stato ormai depauperato di qualsiasi traccia di funzione β-pancreatica residua. In effetti, la commissione di esperti dell'ADA ha stabilito i criteri relativi alla selezione dei soggetti e al follow-up in corso di immunoterapia (72). I problemi maggiori sono relativi ai soggetti a rischio poiché in costoro deve essere valutato con molta attenzione il valore di funzionalità residua e per tale motivo dovranno essere utilizzati i parametri più accurati di insulino-secrezione (77).

I dati prospettici del DPT-1 hanno evidenziato un lento declino delle risposte del C-peptide prima della diagnosi con un decremento dell'82% in coloro che avevano partecipato al braccio insulina per via parenterale, rispetto al 90% in quelli con insulina orale. Le differenze sono state spiegate con lo stimolo utilizzato per misurare le risposte. In particolare, nel corso del DPT-1 è stato utilizzato per la valutazione della funzione β-cellulare il test di tolleranza al pasto misto (*mixed meal tolerance test*, MMTT), che si è dimostrato come il test più valido quale indicatore per lo sviluppo successivo della comparsa di DMT1 (76, 77).

Bibliografia

1. Gale EA. The rise of childhood type 1 diabetes in the 20th century. *Diabetes* 51: 3353–3361, 2002.
2. Aanstoot HJ, Anderson BJ, Daneman D, et al. The global burden of youth diabetes: Perspectives and potential. Chapter one: Diabetes in children: Epidemiology. *Pediatric Diabetes* 8 (Suppl. 8): 10–18, 2007.
3. Soltesz G, Patterson CC, Dahlquist G; EURODIAB Study Group. Worldwide childhood type 1 diabetes incidence – what can we learn from epidemiology? *Pediatric Diabetes* 8 (Suppl. 6): 6–14, 2007.
4. Tuomilehto J, Virtala E, Karvonen M, et al. Increase in incidence of insulin-dependent diabetes mellitus among children in Finland. *Int J Epidemiol* 24: 984–992, 1995.
5. Dahlquist G, Mustonen L. Analysis of 20 years of prospective registration of childhood onset diabetes time trends and birth cohort effects. Swedish Childhood Diabetes Study Group. *Acta*

- Paediatr 89: 1231-1237, 2000.
6. Hislop AL, Fegan PG, Schlaeppli MJ, et al. Prevalence and associations of psychological distress in young adults with type 1 diabetes. *Diabet Med* 25: 91-96, 2008.
 7. Cohen N, Minshall ME, Sharon-Nash L, et al. Continuous subcutaneous insulin infusion versus multiple daily injections of insulin: Economic comparison in adult and adolescent type 1 diabetes mellitus in Australia. *Pharmacoeconomics* 25: 881-897, 2007.
 8. Sibal L, Law HN, Gebbie J, et al. Predicting the development of macrovascular disease in people with type 1 diabetes: A 9-year follow-up study. *Ann N Y Acad Sci* 1084: 191-207, 2006.
 9. Walsh MG, Zgibor J, Borch-Johnsen K, et al; DiaComp Investigators. A multinational assessment of complications in type 1 diabetes: The DiaMond substudy of complications (DiaComp) level 1. *Diab Vasc Dis Res* 3: 84-92, 2006.
 10. Ebeling P, Koivisto VA. Occurrence and interrelationships of complications in insulin-dependent diabetes in Finland. *Acta Diabetologica* 34: 33-38, 1997.
 11. Nathan DM, Cleary PA, Backlund JY, et al. Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (DCCT/EDIC) Study Research Group. Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. *N Engl J Med* 353: 2643-2653, 2005.
 12. Bate KL, Jerums G. Preventing complications of diabetes. *Med J Aust* 179: 498-503, 2003.
 13. The Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group. Retinopathy and nephropathy in patients with type 1 diabetes four years after a trial of intensive therapy. *N Engl J Med* 342: 381-389, 2000.
 14. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. Effects of age, duration and treatment of insulin-dependent diabetes mellitus on residual beta cell function: Observations during eligibility testing for the Diabetes Control and Complications Trial (DCCT). *J Clin Endocrinol Metab* 65: 30-36, 1987.
 15. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. Effect of intensive therapy on residual β -cell function in patients with type 1 diabetes in the diabetes control and complications trial. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 128: 517-523, 1998.
 16. Ludvigsson J, Heding LG, Larsson Y, et al. C-peptide in juvenile diabetics beyond the postinitial remission period. Relation to clinical manifestation at onset of diabetes, remission and diabetic control. *Acta Paediatr Scand* 66: 177-184, 1977.
 17. Ludvigsson J, Heding LG. Beta-cell function in children with diabetes. *Diabetes* 27 (Suppl. 1): 230-234, 1978.
 18. Steffes MW, Sibley S, Jackson M, et al. Beta-cell function and the development of diabetes-related complications in the diabetes control and complications trial. *Diabetes Care* 26: 832-836, 2003.
 19. Staeva-Veieira T, Peakman M, Von Herrath M. Translational mini-review series on type 1 diabetes: Immune-based therapeutic approaches for type 1 diabetes. *Clinical and Experimental Immunology* 148: 17-31, 2007.
 20. Meier JJ, Bhushan A, Butler AE, et al. Sustained beta cell apoptosis in patients with long-standing type 1 diabetes: Indirect evidence for islet regeneration? *Diabetologia* 48: 2221-2228, 2005.
 21. Meier JJ, Lin JC, Butler AE, et al. Direct evidence of attempted beta cell regeneration in an 89-year-old patient with recent-onset type 1 diabetes. *Diabetologia* 49: 1838-1844, 2006.
 22. Bruno G, Cerutti F, Merletti F, et al. Piedmont Study Group for Diabetes Epidemiology. Residual beta-cell function and male/female ratio are higher in incident young adults than in children: The registry of type 1 diabetes of the province of Turin, Italy, 1984-2000. *Diabetes Care* 28: 312-317, 2005.
 23. Sabbah E, Savola K, Ebeling T, et al. Genetic, autoimmune, and clinical characteristics of childhood- and adult-onset type 1 diabetes. *Diabetes Care* 23: 1326-1332, 2000.
 24. Valdes AM, Thomson G, Erlich HA, et al. Association between type 1 diabetes age of onset and HLA among sibling pairs. *Diabetes* 48: 1658-1661, 1999.
 25. Stiller CR, Dupré J, Gent M, et al. Effects of cyclosporine immunosuppression in insulin-dependent diabetes mellitus of recent onset. *Science* 223: 1362-1367, 1984.
 26. Silverstein J, Maclaren N, Riley W, et al. Immunosuppression with azathioprine and prednisone in recent-onset insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 319: 599-604, 1988.
 27. Eisenbarth GS, Srikanta S, Jackson R, et al. Anti-thymocyte globulin and prednisone immunotherapy of recent onset type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Res* 2: 271-276, 1985.
 28. Bougnères PF, Landais P, Boisson C, et al. Limited duration of remission of insulin dependency in children with recent overt type I diabetes treated with low-dose cyclosporin. *Diabetes* 39: 1264-1272, 1990.
 29. Parving HH, Tarnow L, Nielsen FS, et al. Cyclosporine nephrotoxicity in type 1 diabetic patients. A 7-year follow-up study. *Diabetes Care* 22: 478-483, 1999.
 30. Chatenoud L, Bluestone J. CD3-specific antibodies: A portal to the treatment of autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 7: 622-632, 2007.
 31. Bisikirska B, Colgan J, Luban J, et al. TCR stimulation with modified anti-CD3 mAb expands CD8+ T cell population and induces CD8+CD25+ Tregs. *J Clin Invest* 115: 2904-2913, 2005.
 32. Hoorrens A, Pipeleers D. Nicotinamide protects human beta cells against chemically-induced necrosis, but not against cytokine-induced apoptosis. *Diabetologia* 42: 55-59, 1999.
 33. Young DL, Ramanujan S, Kreuwel HT, et al. Mechanisms mediating anti-CD3 antibody efficacy: Insights from a mathematical model of type 1 diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 1079: 369-373, 2006.
 34. Gale EA. Molecular mechanisms of beta-cell destruction in IDDM: The role of nicotinamide. *Horm Res* 45 (Suppl. 1): 39-43, 1996.
 35. Larche M, Wraith DC. Peptide-based therapeutic vaccines for allergic and autoimmune diseases. *Nat Med* 11 (Suppl. 4): S69-76, 2005.
 36. Peakman M, Dayan CM. Peptide immunotherapy: Fighting fire with fire? *Immunology* 104: 361-366, 2001.
 37. Chatenoud L, Salomon B, Bluestone JA. Suppressor T-cells - they're back and critical for regulation of autoimmunity! *Immunol Rev* 182: 149-163, 2001.
 38. Shevach EM. From vanilla to 28 flavors: Multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity* 25: 195-201, 2006.
 39. Khourey SJ, Hancock WW, Weiner HL. Oral tolerance to myelin

- basic protein and natural recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis are associated with downregulation of inflammatory cytokines and differential upregulation of transforming growth factor beta, interleukin 4, and prostaglandin E expression in the brain. *J Exp Med* 176: 1355-1364, 1992.
40. Skyler JS, Krischer JP, Wolfsdorf J, et al. Effects of oral insulin in relatives of patients with type 1 diabetes. The Diabetes Prevention Trial - Type 1. *Diabetes Care* 28: 1068-1076, 2005.
 41. Harrison LC, Honeyman MC, Steele CE, et al. Pancreatic beta-cell function and immune responses to insulin after administration of intranasal insulin to humans at risk for type 1 diabetes. *Diabetes Care* 27: 2348-2355, 2004.
 42. Muir A, Peck A, Clare-Salzler M, et al. Insulin immunization of nonobese diabetic mice induces a protective insulinitis characterized by diminished intraslet interferon-gamma transcription. *J Clin Invest* 95: 628-634, 1995.
 43. Walker JD. Insulin, beta-cell rest, and high risk of type I diabetes mellitus. *Lancet* 341: 927-928, 1993.
 44. Alizadeh BZ, Hanifi-Moghaddam P, Eerligh P, et al. Association of interferon-gamma and interleukin 10 genotypes and serum levels with partial clinical remission in type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol* 145: 480-484, 2006.
 45. Keymeulen B, Vandemeulebroucke E, Ziegler AG, et al. Insulin needs after CD3-antibody therapy in new-onset type 1 diabetes. *N Engl J Med* 352: 2598-2608, 2005.
 46. Herold KC, Gitelman SE, Masharani U, et al. A single course of anti-CD3 monoclonal antibody hOKT3gamma1 (Ala-Ala) results in improvement in C-peptide responses and clinical parameters for at least 2 years after onset of type 1 diabetes. *Diabetes* 54: 1763-1769, 2005.
 47. Pozzilli P. Immuno-intervention and preservation of beta-cell function in type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 23: 255-256, 2007.
 48. Diabetes Prevention Trial - Type 1 Diabetes Study Group. Effects of insulin in relatives of patients with type 1 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 346: 1685-1691, 2002.
 49. Gale EA, Bingley PJ, Emmett CL, et al. European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial (ENDIT) Group. European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial (ENDIT): A randomised controlled trial of intervention before the onset of type 1 diabetes. *Lancet* 363: 925-931, 2004.
 50. Pozzilli P. The DPT-1 trial: A negative result with lessons for future type 1 diabetes prevention. *Diabetes Metab Res Rev* 18: 257-259, 2002.
 51. Skyler JS. Prediction and prevention of type 1 diabetes: Progress, problems, and prospects. *Clin Pharmacol Ther* 81: 768-771, 2007.
 52. Raz I, Elias D, Avron A et al. β -cell function in new-onset type 1 diabetes and immunomodulation with a heat-shock protein peptide (DiaPep277): A randomised, doubleblind, phase II trial. *Lancet* 358: 1749-1753, 2001.
 53. Schloot NC, Meierhoff G, Lengyel C, et al. Effect of heat shock protein peptide DiaPep277 on β -cell function in paediatric and adult patients with recent-onset diabetes mellitus type 1: Two prospective, randomised, double blind phase II trials. *Diabetes Metab Res Rev* 23: 276-285, 2007.
 54. Huurman VA, Decochez K, Mathieu C, et al. Therapy with the hsp60 peptide DiaPep277 in C-peptide positive type 1 diabetes patients. *Diabetes Metab Res Rev* 23: 269-275, 2007.
 55. Pozzilli P, Guglielmi C. Immunomodulation for the prevention of SPIDDM and LADA. *Ann N Y Acad Sci* 1079: 90-98, 2006.
 56. Agardh CD, Cilio CM, Lethagen A, et al. Clinical evidence for the safety of GAD65 immunomodulation in adult-onset autoimmune diabetes. *J Diabetes Complications* 19: 238-246, 2005.
 57. Herold KC, Hagopian W, Auger JA, et al. Anti-CD3 monoclonal antibody in new-onset type 1 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 346: 1692-1698, 2002.
 58. Dupre J, Stiller CR, Gent M, et al. Clinical trials of cyclosporine in IDDM. *Diabetes Care* 11 (Suppl. 1): 37-44, 1988.
 59. Gandhi GY, Murad MH, Flynn DN, et al. Immunotherapeutic agents in type 1 diabetes: A systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2008 Jan 10. [Epub ahead of print].
 60. Heinze E, Thon A. Honeymoon period in insulin-dependent diabetes mellitus. *Pediatrician* 12: 208-212, 1983-1985.
 61. Lombardo F, Valenzise M, Wasniewska M, et al. Two-year prospective evaluation of the factors affecting honeymoon frequency and duration in children with insulin dependent diabetes mellitus: The key-role of age at diagnosis. *Diabetes Nutr Metab* 15: 246-251, 2002.
 62. Gray RS, Cowan P, Duncan LJ, et al. Reversal of insulin resistance in type 1 diabetes following initiation of insulin treatment. *Diabet Med* 3: 18-23, 1986.
 63. Arrieta-Blanco FJ, Pulido N, Suarez A, et al. High glucose uptake by adipocytes in a type 1 diabetic patient with a partial 'honeymoon' period. *Diabet Med* 15: 788-90, 1998.
 64. Yki-Järvinen H, Koivisto VA. Natural course of insulin resistance in type I diabetes. *N Engl J Med* 315: 224-230, 1986.
 65. Martin S, Pawlowski B, Greulich B, et al. Natural course of remission in IDDM during 1st yr after diagnosis. *Diabetes Care* 15: 66-74, 1992.
 66. Shah SC, Malone JJ, Simpson NE. A randomized trial of intensive insulin therapy in newly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 320: 550-554, 1989.
 67. Nakayama M, Abiru N, Moriyama H, et al. Prime role for an insulin epitope in the development of type 1 diabetes in NOD mice. *Nature* 435: 220-223, 2005.
 68. Petersen JS, Bregenholt S, Apostolopoulos V, et al. Coupling of oral human or porcine insulin to the B subunit of cholera toxin (CTB) overcomes critical antigenic differences for prevention of type I diabetes. *Clin Exp Immunol* 134: 38-45, 2003.
 69. Harrison LC, Hafler DA. Antigen-specific therapy for autoimmune disease. *Curr Opin Immunol* 12: 704-711, 2000.
 70. Gianani R, Eisenbarth GS. The stages of type 1A diabetes: 2005. *Immunol Rev* 204: 232-249, 2005.
 71. Petrovsky N, Silva D, Schatz DA. Prospects for the prevention and reversal of type 1 diabetes mellitus. *Drugs* 62: 2617-2635, 2002.
 72. Greenbaum CJ, Harrison LC; Immunology of Diabetes Society. Guidelines for intervention trials in subjects with newly diagnosed type 1 diabetes. *Diabetes* 52: 1059-1065, 2003.
 73. Ziegler AG, Schmid S, Huber D, et al. Early infant feeding and risk of developing type 1 diabetes-associated autoantibodies. *JAMA* 290: 1771-1772, 2003.
 74. Baschal EE, Aly TA, Babu SR, et al. HLA-DPB1*0402 protects against type 1A diabetes autoimmunity in the highest risk DR3-

- DQB1*0201/DR4-DQB1*0302 DAISY population. *Diabetes* 56: 2405–2409, 2007.
75. Thomson G, Valdes AM, Noble JA, et al. Relative predispositional effects of HLA class II DRB1-DQB1 haplotypes and genotypes on type 1 diabetes: A meta-analysis. *Tissue Antigens* 70: 110–127, 2007.
76. Sosenko JM, Palmer JP, Greenbaum CJ, et al. Patterns of metabolic progression to type 1 diabetes in the Diabetes Prevention Trial-Type 1. *Diabetes Care* 29: 643–649, 2006.
77. Sherr J, Sosenko J, Skyler J, et al. Prevention of type 1 diabetes: The time has come. *Nature Clinical Practice Endocrinology and Metabolism* 4: 334–343, 2008.

