

Vaccini per il diabete di tipo 1: a che punto siamo?

Federica Vecchio¹, Roberto Mallone^{1,2}

¹Université de Paris, Institut Cochin, CNRS, INSERM, 75014 Paris, France;

²Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Service de Diabétologie et Immunologie Clinique, Cochin Hospital, 75014 Paris, France

DOI: <https://doi.org/10.30682/ildia2101c>

PERCHÉ SVILUPPARE UN VACCINO PER IL DIABETE DI TIPO 1?

Il diabete di tipo 1 (DT1) è una patologia autoimmune in cui la distruzione delle cellule beta porta ad una produzione di insulina assente o insufficiente (1-2). Ad oggi, la gestione del DT1 è ancora fortemente focalizzata sulle conseguenze metaboliche di una malattia che è su base autoimmune. La terapia insulinica è notevolmente migliorata, ma rimane un trattamento ormonale sostitutivo che non modifica la patologia, in quanto non interviene sui suoi meccanismi eziopatogenetici. Pertanto, è necessario comprendere il processo autoimmune sottostante per attuare efficaci trattamenti mirati a prevenire e trattare il DT1. L'autoimmunità del DT1 è diretta contro vari autoantigeni della cellula beta (3) che sono oggetto di studi mirati, tra l'altro, allo sviluppo di vaccini per prevenire l'insorgenza della patologia nei soggetti a rischio, o per modularne l'aggressività in soggetti con malattia conclamata.

Nell'ambito del DT1, utilizzare il termine "vaccino" può risultare piuttosto fuorviante, poiché l'obiettivo è quello di indurre l'effetto opposto rispetto alla vaccinazione convenzionale, ovvero inibire la risposta immunitaria nei confronti dell'antigene utilizzato. I vaccini immunogenici classici rappresentano uno degli interventi di salute pubblica di maggior successo e continuano ad avere grande impatto nella prevenzione di molte malattie in-

fettive. Essi si basano sull'attivazione, l'espansione e la differenziazione di cloni di linfociti T memoria che riconoscono specificamente particolari antigeni virali o batterici e sono così in grado di fornire una risposta rapida in caso di nuova esposizione a tale agente patogeno. Nella maggior parte dei vaccini immunogenici è necessaria la presenza di adiuvanti, che possono variare in struttura e componenti, e che determinano l'interazione con sistemi di recettori dell'immunità innata favorendo a valle l'attivazione e la differenziazione di cellule dell'immunità adattativa (4). Al contrario, i vaccini tollerogenici sono

FAD ECM "il Diabete"

Questa rassegna fa parte di un percorso di **formazione a distanza** accreditato a livello nazionale e disponibile gratuitamente nell'aula virtuale della SID (www.fad.siditalia.it).

Per partecipare al corso occorre:

1. Leggere la rassegna (disponibile on-line)
2. Registrarsi all'aula e iscriversi al corso "il Diabete"
3. Rispondere on-line al quiz di verifica e compilare il questionario di valutazione dell'evento FAD.

Una volta eseguito con successo il test di valutazione e compilato il questionario di valutazione dell'evento, sarà cura della Segreteria ECM della SID far pervenire l'attestato ECM del corso ai diretti interessati nei tempi e nelle modalità stabiliti dalla regolamentazione vigente.

Per ulteriori informazioni: www.fad.siditalia.it

progettati in modo che gli antigeni del vaccino vengano riconosciuti in un contesto non attivato e non infiammatorio, tale da favorire il meccanismo della tolleranza immunologica, con l'attivazione, espansione e differenziazione di cellule T regolatorie specifiche per gli antigeni di interesse.

Le malattie autoimmuni sono caratterizzate da una risposta immunitaria diretta contro uno o più autoantigeni a cui consegue la perdita della tolleranza immunologica. Diversi antigeni beta cellulari come (pro)insulina, GAD, IA-2 e ZnT8 sono stati identificati nel DT1. Il nostro laboratorio ha recentemente ampliato questa lista con la descrizione di diversi nuovi antigeni derivati dai granuli secretori delle cellule beta, tra cui la secretogranina-5, l'urocortina-3 e la proconvertasi-2 (5-6). Tuttavia, la comparsa di auto-anticorpi che riconoscono gli antigeni classici del DT1 in individui a rischio di sviluppare la malattia è eterogenea, suggerendo che il riconoscimento di alcuni antigeni o di altri potrebbe variare da individuo a individuo, ed essere dunque il primo ostacolo allo sviluppo di un vaccino efficace. Ciononostante, alcuni di questi antigeni sono stati oggetto di studio e hanno portato allo sviluppo di vaccini che sono già stati testati o sono in corso di sperimentazione clinica o preclinica. I punti forti di queste strategie vaccinali rispetto ad altri approcci di immunoterapia, per esempio con anticorpi monoclonali anti-CD3 (7), è la selettività della loro azione sui linfociti responsabili della malattia. Ne deriva un profilo di sicurezza in generale migliore, argomento importante per delle terapie preventive destinate a persone a rischio ma che non sono ancora clinicamente malate.

COME E CHE VACCINO SOMMINISTRARE?

Diverse vie di somministrazione sono state considerate al fine di sviluppare un vaccino efficace per il DT1. Per quanto riguarda l'insulina, il Diabetes Prevention Trial (DPT)-1 nei primi anni Novanta ha permesso lo screening di più di 100.000 parenti di primo e secondo grado di soggetti affetti da DT1. Due trial di prevenzione sono stati in seguito sviluppati: il primo utilizzando insulina somministrata per via parenterale (endovenosa ed in seguito sottocutanea); il secondo utilizzando la via orale. Nel primo sono stati coinvolti 339 soggetti su cui era stato stimato un rischio elevato di sviluppare DT1 entro 5 anni sulla base della positività degli anticorpi e della perdita della prima

fase della secrezione insulinica. Tuttavia, in questi soggetti, seguiti per una media di 3,7 anni, l'analisi della progressione clinica (stimata mediante test orale di tolleranza al glucosio, OGTT) non ha dato il risultato sperato (8). Il secondo trial, effettuato su 372 soggetti, ha avuto una durata di 4,3 anni durante i quali l'insulina è stata somministrata per via orale. La prima analisi dei risultati lasciava intuire un secondo fallimento. Tuttavia, in seguito ad una seconda analisi, si è osservato un effetto favorevole in un sottogruppo di individui con alti titoli di auto-anticorpi anti-insulina (9), sottolineando la necessità di una migliore selezione dei soggetti da includere nei trial in base al profilo autoimmune individuale (10-11).

Diverse altre vie di somministrazione sono state dunque considerate, tra cui la via sottocutanea, intradermica, orale e intranasale (12). Nella scelta della modalità di somministrazione, è importante considerare le caratteristiche anatomiche, funzionali e immunologiche dei diversi tessuti tipiche di ogni via. La struttura e l'organizzazione spaziale dei tessuti, l'interfaccia epiteliale, la presenza e la localizzazione di particolari cellule immunitarie, sono tutti fattori che hanno un impatto sull'esito finale. A questo proposito, la somministrazione nasale si presenta come una via promettente per la vaccinazione tollerogena, per l'ambiente tollerogenico delle mucose. Le superfici mucose infatti sono continuamente esposte a numerosi antigeni ambientali. Oltre alla barriera epiteliale coperta dal muco e alla secrezione di peptidi antimicrobici, una rete immunitaria specializzata e complessa è coinvolta nell'immuno-sorveglianza di questi tessuti (13). Inoltre, i tessuti nasali mostrano una superficie relativamente grande per l'assorbimento di antigeni, coperta solo da un sottile strato di muco, e sono altamente vascolarizzati, non richiedono dosi elevate di antigene e costituiscono una via non invasiva (14). Questa via è stata per esempio testata in un trial australiano (15) in cui sono stati arruolati pazienti LADA (anticorpo-positivi ma non-insulino-dipendenti al momento del reclutamento), con l'idea che l'autoimmunità probabilmente meno aggressiva presente in questa forma di DT1 lento potesse essere più facile da controllare. Questo studio non ha mostrato un'efficacia clinica, ma ha documentato l'induzione di una tolleranza specifica per l'insulina, in vitro ed in vivo. È stata anche testata la somministrazione intradermica di un peptide della proinsulina, basata sui risultati po-

sitivi di studi preclinici (16) e di un trial pilota di immunoterapia peptidica (PIT) che aveva mostrato sicurezza, tollerabilità e modificazioni compatibili con l'induzione di una tolleranza immunologica (17). Questo studio (18) ha utilizzato due diverse dosi con effetti equivalenti: assenza di effetti secondari maggiori, un piccolo effetto sulla secrezione residua di insulina misurata come peptide C, ma un effetto più importante sulla riduzione delle dosi di insulina e sull'indice IDA_{A1c} (una misura dell'HbA_{1c} corretta per la dose di insulina utilizzata). Gli studi condotti su campioni prelevati dai pazienti arruolati in questo studio hanno mostrato un incremento della secrezione della citochina regolatoria IL-10 in risposta alla proinsulina, mentre la secrezione della citochina pro-infiammatoria IFN- γ non mostrava cambiamenti. Un'interpretazione possibile di questo risultato è che l'effetto regolatorio indotto possa essere dominante rispetto all'effetto di eliminazione dei linfociti T patogeni. In effetti, gli autori hanno osservato un aumento transitorio dell'espressione di FOXP₃ nei linfociti T regolatori, che rappresenta abitualmente un indice di una attività regolatoria più efficace. Malgrado alcuni limiti (la possibile perdita del doppio cieco in quanto il peptide induceva una reazione eritematosa nel sito di iniezione a differenza del placebo; il follow-up di soli 6 mesi dopo la fine del trattamento; l'assenza di documentazione delle modificazioni indotte nel gruppo placebo), questo studio è fino ad ora quello che ha ottenuto i risultati più significativi utilizzando una strategia vaccinale. Nel progettare un vaccino tollerogenico, oltre alla via di somministrazione e alla scelta dell'antigene, è indispensabile considerare la formulazione del vaccino stesso. Ad esempio, gli studi che hanno utilizzato la decarbossilasi dell'acido glutammico (GAD) aggiungendo dell'alluminio come adiuvante, hanno mostrato una difficoltà non sorprendente nell'induzione specifica di una risposta tollerogenica piuttosto che immunogenica (19). In effetti, tutti gli altri vaccini testati fino ad oggi non prevedono la presenza di un adiuvante, in quanto l'antigene deve essere riconosciuto in un contesto non infiammatorio per poter favorire una risposta tollerogenica.

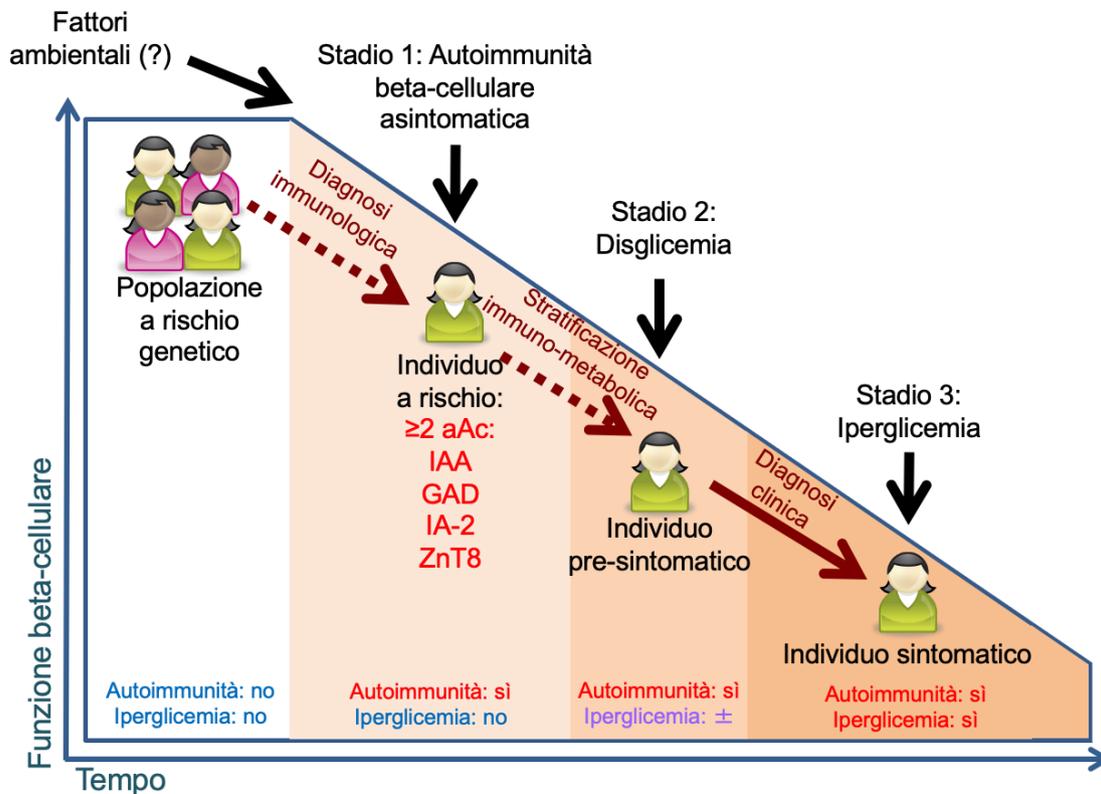
QUANDO SOMMINISTRARE IL VACCINO?

Parlare di prevenzione nel DT₁ potrebbe non essere appropriato quando l'intervento è mirato a soggetti che sono già positivi ad uno o più autoanticorpi, poiché questi

stessi marcatori indicano un processo autoimmune già in atto (Fig. 1). Una soluzione in questo senso potrebbe essere rappresentata dalla strategia seguita dal trial di fase 1 Pre-POINT (20), che ha trattato soggetti geneticamente predisposti a sviluppare il DT₁ (in quanto portatori di alleli HLA di predisposizione), ma ancora negativi agli autoanticorpi. Inoltre, va considerato che recenti meta-analisi mostrano che i primi segni misurabili di autoimmunità (gli auto-anticorpi) compaiono spesso durante i primi 2 anni di vita (21-22), suggerendo che sarebbe opportuno intervenire durante la vita neonatale per prevenire l'autoimmunità. Ciò richiede delle vie di somministrazione non invasive e con un eccellente profilo di sicurezza. Il nostro laboratorio cerca di sviluppare dei vaccini in tal senso, creando degli antigeni legati ad un frammento Fc di immunoglobulina (23). La somministrazione per via orale di tali antigeni potrebbe dunque sfruttare il recettore Fc neonatale che permette al neonato di assorbire gli anticorpi contenuti nel latte materno.

In un soggetto predisposto a sviluppare il DT₁, l'autoimmunità inizia con una fase in cui un singolo antigene, molto probabilmente la proinsulina, stimola un numero limitato di linfociti T, ma la conseguente distruzione della beta cellula porta al rilascio di altri antigeni e all'attivazione di un maggior numero di linfociti, rendendo la reazione autoimmune più difficile da controllare. Questo fenomeno, noto come "antigen spreading", sottolinea ancora una volta la necessità di un intervento precoce. Rimane tuttavia difficile intervenire con un cocktail di antigeni, perché sono probabilmente troppo numerosi e riconosciuti in maniera variabile secondo gli individui. Un'idea innovativa recente è costituita dall'utilizzo di nanoparticelle che potrebbero favorire il meccanismo definito "tolerance spreading". In questo senso, il gruppo di P. Santamaria ha creato delle cellule presentatrici dell'antigene artificiali rivestendo delle nanoparticelle di ossido di ferro con complessi HLA di classe II caricati con peptidi antigenici, capaci di presentare l'antigene in assenza di molecole costimolatorie con conseguente soppressione dei linfociti T CD₄⁺ autoreattivi e la loro conversione in un fenotipo regolatorio, conferendo protezione dallo sviluppo del diabete e di altre malattie autoimmuni in modelli murini (24). Questa applicazione, che rimane tuttavia al momento limitata alla sola fase preclinica, potrebbe rappresentare la base per studi di intervento sull'uomo.

Figura 1 ♦ In un soggetto geneticamente a rischio, il DT1 si sviluppa attraverso 3 stadi successivi definiti in base alla presenza di auto-anticorpi (aAc) e/o disglicemia/iperglicemia: stadio 1: autoimmunità (almeno 2 aAc positivi), glicemia normale; stadio 2: autoimmunità et disglicemia (perdita della prima fase di insulinosecrezione); stadio 3: DT1 clinico, autoimmunità ed iperglicemia sintomatica

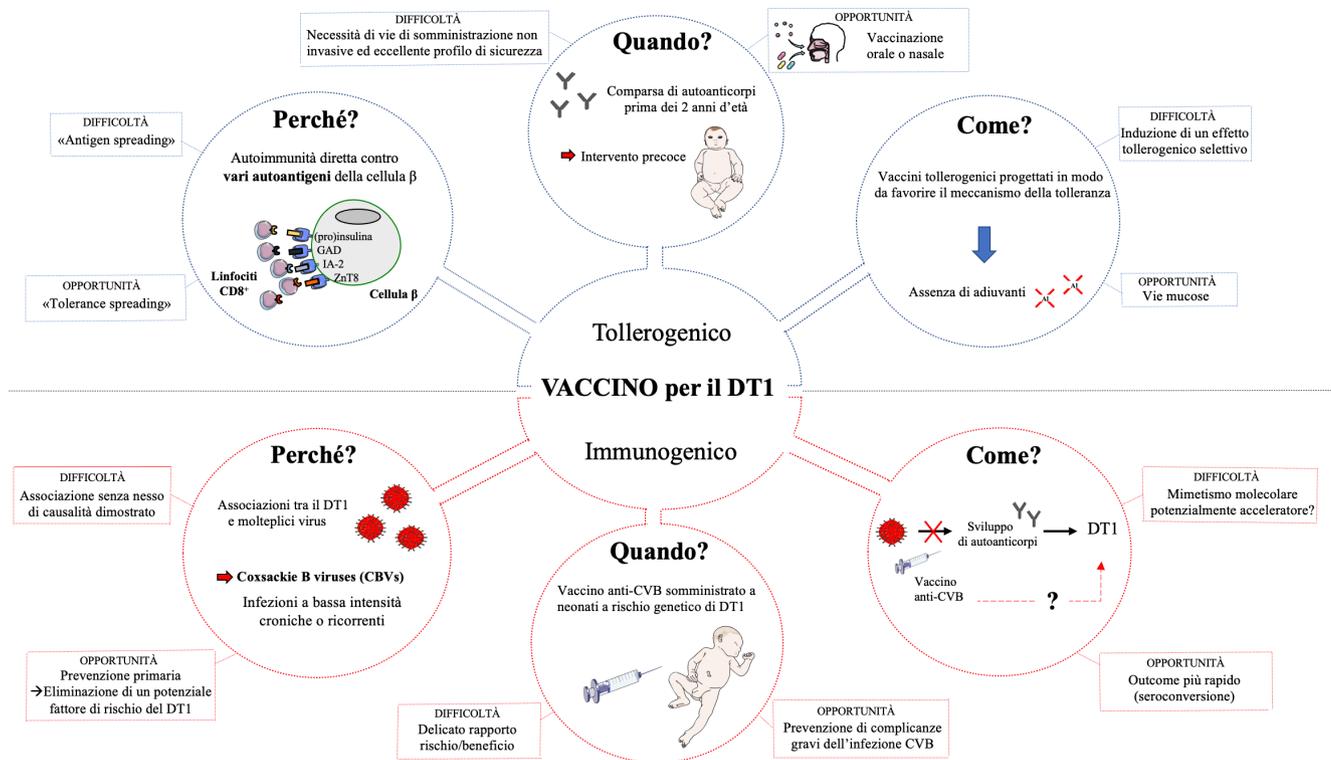


I VACCINI ANTI-VIRALI PER LA PREVENZIONE DEL DT1

Le infezioni virali possono svolgere un ruolo chiave nella perdita della tolleranza immunitaria portando alla presentazione di un antigene "simile" ad un auto-antigene (meccanismo di mimetismo molecolare) (25), oppure innescando la produzione di citochine che dis-regolano la tolleranza portando ad una presentazione di antigeni in un contesto infiammatorio. Inoltre, la produzione di citochine pro-infiammatorie può a sua volta promuovere l'espressione di HLA sulla membrana cellulare e quindi facilitare la presentazione di auto-antigeni. Questo aumento dell'espressione beta-cellulare dell'HLA di classe I è una delle caratteristiche del DT1 a livello istopatologico, e riflette probabilmente una risposta all'interferone. Questo fattore potrebbe avere un ruolo chiave nel DT1 poiché, aumentando la presentazione degli antigeni da parte delle cellule beta, aumenta la loro visibilità nei confronti dei linfociti T autoreattivi.

Le infezioni virali sono state a lungo considerate tra i possibili fattori ambientali scatenanti del DT1, e numerosi studi hanno segnalato associazioni tra il DT1 e una varietà di virus (26). Tutti i virus chiamati in causa condividono quattro caratteristiche: 1) sono responsabili di infezioni precoci (in accordo con la comparsa precoce dei primi auto-anticorpi nella maggioranza dei bambini che svilupperanno in seguito un DT1); 2) la sieropositività è molto diffusa; 3) la trasmissione è oro-fecale; e 4) si tratta di virus che possono infettare le cellule beta. Tra questi, il Rotavirus, che è una comune causa di gastroenterite infantile, contiene sequenze di peptidi che sono simili ad autoantigeni beta-cellulari, e potrebbe quindi giocare un ruolo nell'attivazione dell'autoimmunità attraverso il suddetto meccanismo di mimetismo molecolare. Tuttavia, gli studi più approfonditi e le associazioni più solide con il DT1 sono stati riportati con gli Enterovirus, principalmente i Coxsackie virus B (CVB), sia clinicamente che sperimentalmente. Ad oggi, numerosi studi in coorti di bambini a

Figura 2 ♦ L'identificazione dei fattori eziologici del DT1, tra cui le infezioni da CVB, e lo sviluppo di approcci per contrastare il sottostante processo autoimmune sono alla base della creazione di vaccini rispettivamente immunogenici (parte bassa della figura) e tollerogenici (parte alta). La figura illustra il perché, quando e come intervenire con ciascuno di questi vaccini, e le difficoltà e opportunità offerte da ciascuno di questi aspetti



rischio genetico di DT1 hanno stabilito l'associazione tra infezioni enterovirali e DT1, più precisamente con la comparsa degli auto-anticorpi (27-29). Gli studi istopatologici su pancreas hanno confermato questa associazione ma anche mostrato che i segni di infezione sono riscontrabili in un numero limitato di isole (30-31), osservazione che potrebbe indicare delle infezioni persistenti a bassa intensità, ricorrenti o croniche. Un vaccino anti-CVB è stato recentemente sviluppato (32) e sarà prossimamente testato in bambini a rischio genetico di DT1 per verificare se la prevenzione dell'infezione riduce il rischio successivo di sviluppo degli auto-anticorpi. Si tratta dunque in questo caso di un vaccino classico, simile al vaccino anti-polio inattivato somministrato ai neonati, al fine di eliminare un potenziale fattore di rischio del DT1 e, al tempo stesso, prevenire altre possibili complicanze gravi dell'infezione da CVB (32). Studi sono in corso per capire la risposta immunologica all'infezione naturale, che resta poco conosciuta, al fine di ottimizzare il rapporto rischio-beneficio. In particolare, è importante escludere la partecipazione di meccanismi di mimetismo mole-

colare, che potrebbero portare ad una accelerazione piuttosto che ad una prevenzione dell'autoimmunità contro le cellule beta.

CONCLUSIONE

Ad oggi non esiste una cura per il DT1 e l'aumento a livello mondiale della sua incidenza richiede, da una parte, l'identificazione dei fattori eziologici e, dall'altra, degli approcci per neutralizzare il processo autoimmune che ne è alla base. Entrambi gli aspetti sono oggetto di sviluppo di vaccini al fine di prevenire l'insorgenza della malattia nei soggetti a rischio (Fig. 2), o limitarne la progressione in quelli già clinicamente malati. I risultati preclinici incoraggianti in modelli murini non si sono tradotti in benefici clinici significativi nei trials che li hanno seguiti, ma alcune eccezioni iniziano ad apparire, e gli studi meccanicistici ci aiutano a comprendere la ragione di questi successi finora limitati, che riflettono probabilmente un momento di intervento che è troppo tardivo. Nuove strategie basate su interventi più precoci (prima dell'ap-

parizione degli autoanticorpi), su agenti terapeutici in grado di amplificare l'effetto tollerogeno e/o su vaccini in grado di prevenire le infezioni virali potenzialmente in causa sono in corso di esplorazione. I prossimi anni dovrebbero apportare delle risposte fondamentali in questo senso.

BIBLIOGRAFIA

- Mallone R, Eizirik DL. Presumption of innocence for beta cells: why are they vulnerable autoimmune targets in type 1 diabetes? *Diabetologia* 63: 1999-2006, 2020.
- Carré A, Richardson SJ, Larger E, Mallone R. Presumption of guilt for T cells in type 1 diabetes: lead culprits or partners in crime depending on age of onset? *Diabetologia* 2020. doi.org/10.1007/s00125-020-05298-y.
- James EA, Mallone R, Kent SC, DiLorenzo TP. T-Cell Epitopes and Neo-epitopes in Type 1 Diabetes: A Comprehensive Update and Reappraisal. *Diabetes* 69: 1311-1335, 2020.
- Di Pasquale A, Preiss S, Tavares Da Silva F, Garçon N. Vaccine Adjuvants: from 1920 to 2015 and Beyond. *Vaccines* 3: 320-343, 2015.
- Gonzalez-Duque S, Azoury ME, Colli ML, Afonso G, Turatsinze JV, Nigi L, Lalanne AI, Sebastiani G, Carre A, Pinto S, Culina S, Corcos N, Bugliani M, Marchetti P, Armanet M, Diedisheim M, Kyewski B, Steinmetz LM, Buus S, You S, Dubois-Laforgue D, Larger E, Beressi JP, Bruno G, Dotta F, Scharfmann R, Eizirik DL, Verdier Y, Vinh J, Mallone R. Conventional and Neo-antigenic Peptides Presented by beta Cells Are Targeted by Circulating Naïve CD8+ T Cells in Type 1 Diabetic and Healthy Donors. *Cell Metab* 28: 946-960, 2018.
- Azoury ME, Tarayrah M, Afonso G, Pais A, Colli ML, Maillard C, Lavaud C, Alexandre-Heymann L, Gonzalez-Duque S, Verdier Y, Vinh J, Pinto S, Buus S, Dubois-Laforgue D, Larger E, Beressi JP, Bruno G, Eizirik DL, You S, Mallone R. Peptides Derived From Insulin Granule Proteins are Targeted by CD8(+) T Cells Across MHC Class I Restrictions in Humans and NOD Mice. *Diabetes* 2020. doi.org/10.2337/db20-0013.
- Herold KC, Bundy BN, Long SA, Bluestone JA, DiMeglio LA, Dufort MJ, Gitelman SE, Gottlieb PA, Krischer JP, Linsley PS, Marks JB, Moore W, Moran A, Rodriguez H, Russell WE, Schatz D, Skyler JS, Tsalikian E, Wherrett DK, Ziegler AG, Greenbaum CJ. Type 1 Diabetes TrialNet Study G: An Anti-CD3 Antibody, Teplizumab, in Relatives at Risk for Type 1 Diabetes. *N Engl J Med* 381: 603-613, 2019.
- Diabetes Prevention Trial-Type 1 Diabetes Study G: Effects of insulin in relatives of patients with type 1 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 346: 1685-1691, 2002.
- Skyler JS, Krischer JP, Wolfsdorf J, Cowie C, Palmer JP, Greenbaum C, Cuthbertson D, Rafkin-Mervis LE, Chase HP, Leschek E. Effects of oral insulin in relatives of patients with type 1 diabetes: The Diabetes Prevention Trial-Type 1. *Diabetes Care* 28: 1068-1076, 2005.
- Culina S, Mallone R. Immune biomarkers in immunotherapeutic trials for type 1 diabetes: Cui prodest? *Diabetes Metab* 38: 379-385, 2012.
- Mallone R, Roep BO. Biomarkers for immune intervention trials in type 1 diabetes. *Clin Immunol* 149: 286-296, 2013.
- Culina S, Boitard C, Mallone R. Antigen-based immune therapeutics for type 1 diabetes: magic bullets or ordinary blanks? *Clin Dev Immunol* 2011: 286248, 2011. doi: 10.1155/2011/286248.
- Brandtzaeg P. Mucosal immunity: induction, dissemination, and effector functions. *Scand J Immunol* 70: 505-515, 2009.
- Lamichhane A, Azegamia T, Kiyono H. The mucosal immune system for vaccine development. *Vaccine* 32: 6711-6723, 2014.
- Fourlanos S, Perry C, Gellert SA, Martinuzzi E, Mallone R, Butler J, Colman PG, Harrison LC. Evidence that nasal insulin induces immune tolerance to insulin in adults with autoimmune diabetes. *Diabetes* 60: 1237-1245, 2011.
- Gibson VB, Nikolic T, Pearce VQ, Demengeot J, Roep BO, Peakman M. Proinsulin multi-peptide immunotherapy induces antigen-specific regulatory T cells and limits autoimmunity in a humanized model. *Clin Exp Immunol* 182: 251-260, 2015.
- Thrower SL, James L, Hall W, Green KM, Arif S, Allen JS, Van-Krinks C, Lozanoska-Ochser B, Marquesini L, Brown S, Wong FS, Dayan CM, Peakman M: Proinsulin peptide immunotherapy in type 1 diabetes: report of a first-in-man Phase I safety study. *Clin Exp Immunol* 155: 156-165, 2009.
- Alhadj Ali M, Liu YF, Arif S, Tatovic D, Shariff H, Gibson VB, Yusuf N, Baptista R, Eichmann M, Petrov N, Heck S, Yang JHM, Tree TIM, Pujol-Autonell I, Yeo L, Baumard LR, Stenson R, Howell A, Clark A, Boulton Z, Powrie J, Adams L, Wong FS, Luzio S, Dunseath G, Green K, O'Keefe

- A, Bayly G, Thorogood N, Andrews R, Leech N, Joseph F, Nair S, Seal S, Cheung H, Beam C, Hills R, Peakman M, Dayan CM. Metabolic and immune effects of immunotherapy with proinsulin peptide in human new-onset type 1 diabetes. *Sci Transl Med* 9: eaaf7779, 2017.
19. Axelsson S, Cheramy M, Hjorth M, Pihl M, Akerman L, Martinuzzi E, Mallone R, Ludvigsson J, Casas R. Long-Lasting Immune Responses 4 Years after GAD-Alum Treatment in Children with Type 1 Diabetes. *PLoS One* 6: e29008, 2011.
 20. Bonifacio E, Ziegler AG, Klingensmith G, Schober E, Bingley PJ, Rottenkolber M, Theil A, Eugster A, Puff R, Peplow C, Buettner F, Lange K, Hasford J, Achenbach P. Group P-PS: Effects of high-dose oral insulin on immune responses in children at high risk for type 1 diabetes: the Pre-POINT randomized clinical trial. *JAMA* 313: 1541-1549, 2015.
 21. Parikka V, Nanto-Salonen K, Saarinen M, Simell T, Ilonen J, Hyoty H, Veijola R, Knip M, Simell O: Early seroconversion and rapidly increasing autoantibody concentrations predict prepubertal manifestation of type 1 diabetes in children at genetic risk. *Diabetologia* 55: 1926-1936, 2012.
 22. Ziegler AG, Bonifacio E, Group B-BS: Age-related islet autoantibody incidence in offspring of patients with type 1 diabetes. *Diabetologia* 55: 1937-1943, 2012.
 23. Culina S, Gupta N, Boisgard R, Afonso G, Gagnerault MC, Dimitrov J, Osterbye T, Justesen S, Luce S, Attias M, Kyewski B, Buus S, Wong FS, Lacroix-Desmazes S, Mallone R: Materno-fetal transfer of preproinsulin through the neonatal Fc receptor protects from autoimmune diabetes. *Diabetes* 64: 3532-3542, 2015.
 24. Clemente-Casares X, Blanco J, Ambalavanan P, Yamanoichi J, Singha S, Fandos C, Tsai S, Wang J, Garabatos N, Izquierdo C, Agrawal S, Keough MB, Yong VW, James E, Moore A, Yang Y, Stratmann T, Serra P, Santamaria P: Expanding antigen-specific regulatory networks to treat autoimmunity. *Nature* 530: 434-440, 2016.
 25. Afonso G, Mallone R. Infectious triggers in type 1 diabetes: is there a case for epitope mimicry? *Diabetes Obes Metab* 15(Suppl 3): 82-88, 2013.
 26. Rodriguez-Calvo T, Sabouri S, Anquetil F, von Herrath MG. The viral paradigm in type 1 diabetes: Who are the main suspects? *Autoimmun Rev* 15: 964-969, 2016.
 27. Yeung WC, Rawlinson WD, Craig ME: Enterovirus infection and type 1 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis of observational molecular studies. *BMJ* 342: d35, 2011.
 28. Laitinen OH, Honkanen H, Pakkanen O, Oikarinen S, Hankaniemi MM, Huhtala H, Ruokoranta T, Lecouturier V, Andre P, Harju R, Virtanen SM, Lehtonen J, Almond JW, Simell T, Simell O, Ilonen J, Veijola R, Knip M, Hyoty H: Coxsackievirus B1 Is Associated With Induction of beta-Cell Autoimmunity That Portends Type 1 Diabetes. *Diabetes* 63: 446-455, 2014.
 29. Vehik K, Lynch KF, Wong MC, Tian X, Ross MC, Gibbs RA, Ajami NJ, Petrosino JF, Rewers M, Toppari J, Ziegler AG, She JX, Lernmark A, Akolkar B, Hagopian WA, Schatz DA, Krischer JP, Hyoty H, Lloyd RE, Group TS: Prospective virome analyses in young children at increased genetic risk for type 1 diabetes. *Nat Med* 25: 1865-1872, 2019.
 30. Krogvold L, Edwin B, Buanes T, Frisk G, Skog O, Anagandula M, Korsgren O, Undlien D, Eike MC, Richardson SJ, Leete P, Morgan NG, Oikarinen S, Oikarinen M, Laiho JE, Hyoty H, Ludvigsson J, Hanssen KF, Dahl-Jorgensen K. Detection of a low-grade enteroviral infection in the islets of langerhans of living patients newly diagnosed with type 1 diabetes. *Diabetes* 64: 1682-1687, 2015.
 31. Dunne JL, Richardson SJ, Atkinson MA, Craig ME, Dahl-Jorgensen K, Flodstrom-Tullberg M, Hyoty H, Insel RA, Lernmark A, Lloyd RE, Morgan NG, Pugliese A. Rationale for enteroviral vaccination and antiviral therapies in human type 1 diabetes. *Diabetologia* 62: 744-753, 2019.
 32. Stone VM, Hankaniemi MM, Laitinen OH, Sioofy-Khojine AB, Lin A, Diaz Lozano IM, Mazur MA, Marjomaki V, Lore K, Hyoty H, Hytonen VP, Flodstrom-Tullberg M. A hexavalent Coxsackievirus B vaccine is highly immunogenic and has a strong protective capacity in mice and nonhuman primates. *Sci Adv* 6: eaaz2433, 2020.