

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO- BIOKEMIJSKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

KATARINA LALIĆ

ZAGREB, 2022.

Katarina Lalić

Imunoterapija dijabetesa tipa 1

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Opća klinička biokemija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Roberte Petlevski.

- SADRŽAJ -

1. UVOD	1
1.1. Dijabetes tipa 1	1
1.1.1. Imunopatogeneza	2
1.1.2. Čimbenici razvoja	2
1.1.3. Simptomi i komplikacije	3
1.1.4. Dijagnostika	4
1.1.5. Trenutna terapija	4
1.2. Imunoterapija	4
2. OBRAZLOŽENJE TEME	5
3. MATERIJALI I METODE	6
4. REZULTATI I RASPRAVA	7
4.1. Imunoterapija dijabetesa tipa 1	7
4.2. Imunoterapija antitijelima	8
4.2.1. Anti CD3.....	8
4.2.2. Anti CD20.....	11
4.2.3. Antitimocitni globulini.....	12
4.3. Blokatori kostimulacije	14
4.3.1. Fuzijski protein CTLA4- antitijelo.....	15
4.3.2. Fuzijski protein LFA3- antitijelo.....	16
4.4. Antigen specifična imunoterapija	18
4.4.1. Inzulin.....	19
4.4.2. GAD 65	20

4.4.3.	Peptid 277	22
4.5.	Terapija s utjecajem na citokine	24
4.5.1.	Terapija usmjerena prema TNF- α	24
4.5.1.1.	Golimumab	24
4.5.1.2.	Etanercept	25
4.5.2.	Terapija s utjecajem na IL-2.....	26
4.5.3.	Terapija s utjecajem na IL-1.....	27
4.6.	Terapija autolognim regulatornim T limfocitima	28
4.7.	Kombinirana imunoterapija.....	29
4.7.1.	Daklizumab i mikofenolat mofetil	29
4.7.2.	Anti IL-21 i liraglutid.....	31
5.	ZAKLJUČCI	33
6.	POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA	34
7.	LITERATURA	36
8.	SAŽETAK/ SUMMARY	45
9.	TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

Šećerna bolest ili dijabetes kronični je poremećaj koji nastaje kao posljedica nedovoljnog lučenja hormona inzulina iz beta (β) stanica Langerhansovih otočića gušterače ili zbog nemogućnosti djelovanja inzulina na ciljne stanice u tijelu. (Guyton i Hall, 2017) Nedostatak ili smanjena učinkovitost inzulina uzrokuje stanje kronične hiperglikemije koja s vremenom dovodi do poremećaja u metabolizmu masti i proteina. (Štraus i Petlevski, 2009) Postoje različiti tipovi dijabetesa koji se mogu podijeliti u 4 kategorije: dijabetes tipa 1, dijabetes tipa 2, trudnički (gestacijski) dijabetes i ostali specifični oblici. (American Diabetes Association, 2021)

1.1. Dijabetes tipa 1

Dijabetes tipa 1 (DT1) je autoimuna endokrinološka bolest koja nastaje kao posljedica uništenja β stanica gušterače koje proizvode polipeptidni hormon inzulin. Inzulin djeluje na brojne stanice u tijelu potičući ih na unos i iskorištenje glukoze u svrhu dobivanja energije. Postoje dva tipa DT1- autoimuni i idiopatski. Autoimuni DT1 posljedica je prisutnosti autoreaktivnih T limfocita usmjerenih prema β stanicama gušterače, a na autoimunu etiologiju ukazuje prisutnost autoantitijela usmjerenih na stanične komponente β stanica. Ukoliko u krvi pacijenta nisu pronađena autoantitijela smatra se da se radi o idiopatskom DT1. (Štraus i Petlevski, 2009)

Razvoj autoimunog DT1 može se podijeliti u tri stadija (Insel i sur., 2015):

Stadij 1: prisutna dva ili više autoantitijela povezana s DT1; održana normoglikemija

Stadij 2: prisutna dva ili više autoantitijela povezana s DT1; prisutna disglukemija

Stadij 3: pojava tipičnih kliničkih simptoma DT1

1.1.1. Imunopatogeneza

Početkom imunopatogeneze autoimunog DT1 smatra se apoptoza β stanica Langerhansovih otočića uslijed čega oslobođeni stanični sadržaj postaje skup potencijalnih autoantigena sa sposobnošću pokretanja imunskog odgovora usmjerenog prema β stanicama gušterače. (Cabrera i sur., 2012) Sastavnice β stanica čiji su dijelovi molekula najčešći autoantigeni su dvije izoforme enzima dekarboksilaze glutaminske kiseline (engl. glutamic acid decarboxylase, GAD)- 65 i 67, hormon inzulin, transporter cinka 8 (ZnT-8) i autoantigeni stanica otočića (engl. islet cell autoantigen, ICA) 69 i 512. (Arvan i sur., 2012) Osim navedenih proteina tijekom apoptoze β stanica otpuštaju se protein toplinskog šoka 60 (engl. heat shock protein 60, HSP60) i proteini visoke mobilnosti (engl. high mobility group box, HMGB) koji imaju ulogu alarmina i izravno djeluju na aktivaciju dendritičkih stanica i makrofaga vezanjem preko receptora sličnog Tollu 2 (engl. Toll like receptor 2, TLR2). Oslobođene stanične proteine fagocitiraju i prerađuju dendritičke stanice koje odlaze u pankreasni limfni čvor gdje preko glavnih molekula tkivne podudarnosti II (engl. major histocompatibility complex II, MHCII) prezentiraju prerađene peptide naivnim autoreaktivnim T limfocitima s površinskim staničnim diferencijacijskim antigenom (engl. cluster of differentiation, CD) 4. Autoreaktivni CD4+ T limfociti pomoću T staničnog receptora (engl. T cell receptor, TCR) prepoznaju vlastite antigene kao strane, a njihovo postojanje u pankreasnom limfnom čvoru posljedica je neispravne pozitivne i negativne selekcije T limfocita u timusu. Aktivirani naivni CD4+ T limfociti ovisno o interakciji s dendritičkom stanicom mogu sazrijeti u nekoliko različitih podtipova sa sposobnošću aktiviranja ostalih stanica imunskog sustava i njihovog usmjerenja prema β stanicama Langerhansovih otočića u gušterači. (Zhong i sur., 2011)

1.1.2. Čimbenici razvoja

Početno uništenje β stanica gušterače koje pokreće DT1 skup je međudjelovanja genetskih i okolišnih čimbenika. Najčešći genetski čimbenik rizika za razvoj DT1 povezan je s polimorfizmima gena sustavne tkivne snošljivosti (engl. human leukocyte antigen, HLA) koji kodiraju za brojne proteine nužne za predočavanje antigena imunokompetentim stanicama u tijelu. Među genima izvan HLA sustava, rizik za razvoj DT1 povećan je ukoliko postoje

polimorfizmi gena *INS* i *PTPN22*. *INS* kodira za inzulin, a polimorfizmi unutar tog gena povezani su sa smanjenom ekspresijom inzulina u timusu što posljedično dovodi do preživljenja autoreaktivnih T limfocita. *PTPN22* kodira za protein tirozin fosfatazu, a mutacije gena također omogućuju preživljenje autoreaktivnih stanica u timusu. Najčešćim okolišnim čimbenicima razvoja DT1 smatraju se virusne infekcije enterovirusima u ranom djetinjstvu. Uništenje β stanica posredovano virusima može biti posljedica direktne citolize ili rezultat molekularne mimikrije između sastavnice β stanica i virusnih čestica koja dovodi do usmjeravanja imunskog odgovora na β stanice gušterače. (Van Belle i sur., 2011)

1.1.3. Simptomi i komplikacije

Klinički simptomi DT1 nerijetko se pokazuju tek nekoliko godina nakon samog početka bolesti kada je tkivo gušterače toliko oštećeno da svojim djelovanjem više ne može održavati normoglikemiju u ljudskom organizmu. Najčešći simptomi DT1 su suhoća usta i žeđ, učestalo mokrenje, umor, smetnje vida, stalna glad uz nagli gubitak tjelesne mase i česte infekcije. Komplikacije DT1 mogu se podijeliti na akutne i kronične. Među akutne komplikacije ubrajaju se ketoacidoza, laktatna acidoza te hipoglikemija kod pacijenata na terapiji inzulinom. (Štraus i Petlevski, 2009) Kronične komplikacije DT1 u organizmu započinju neopaženo, bez vidljivih i osjetnih posljedica te se razvijaju dugi niz godina uz trajno i ireverzibilno uništenje određenih organa u tijelu. Osnova nastanka kroničnih komplikacija je oštećenje krvnih žila te se, s obzirom na krvne žile koje su zahvaćene, kronične komplikacije DT1 mogu podijeliti na makrovaskularne i mikrovaskularne. Makrovaskularne komplikacije obuhvaćaju koronarnu bolest srca, cerebrovaskularnu bolest i perifernu vaskularnu bolest dok mikrovaskularne komplikacije uključuju oštećenja mikrovaskulature u mrežnici (retinopatije), bubrezima (nefropatije) i živcima (neuropatije). (Boras i sur., 2011)

1.1.4. Dijagnostika

Općenita dijagnostika dijabetesa temelji se na utvrđivanju stanja hiperglikemije praćene simptoma karakterističnima za bolest. Ukoliko je koncentracija glukoze u uzorku venske plazme izvađene natašte veća od 7 mmol/L ili nakon testa oralnog opterećenja glukozom veća od 11,1 mmol/L, mjerenje koncentracije glukoze potrebno je ponoviti idućeg dana kako bi se potvrdila konačna dijagnoza. (Vučić Lovrenčić, 2011) Jednom kada je dijagnosticiran dijabetes potrebno je utvrditi o kojem tipu se radi. Detektiranjem antitijela usmjerenih prema inzulinu i/ili dekarboksilazi glutaminske kiseline isključuje se dijabetes tipa 2, a potvrđuje autoimuni oblik DT1. (www.ncbi.nlm.nih.gov)

1.1.5. Trenutna terapija

Nedostatak inzulina prouzročen uništenjem β stanica potrebno je nadoknaditi inzulinskim pripravcima koji se apliciraju supkutanim injekcijama, inzulinskim olovkama ili inzulinskim pumpama. Ovisno o vremenu potrebnom za početak njihovog djelovanja, postizanju maksimalne koncentracije i trajanju djelovanja unutar ljudskog organizma pripravci se dijele u 4 skupine: brzo djelujući (inzulini lispro, aspart i glulizin), kratko djelujući (humulin R), srednje dugo djelujući (humulin N) i dugo djelujući (detemir, glargin). Terapija inzulinom je doživotna. (Nolte Kennedy, 2012)

1.2. Imunoterapija

Imunoterapija je vrsta terapije koja je usmjerena prema moduliranju imunskog odgovora u svrhu liječenja stanja prouzročenih pretjeranom ili oslabljenom aktivnošću imunskog sustava. U svrhu imunomodulacije mogu se koristiti biološke molekule (antitijela, citokini), imunosupresivni lijekovi, cjepiva te vitamini i minerali s utjecajem na imunski sustav. Danas se imunoterapija najčešće primjenjuje za liječenje tumorskih i autoimunih bolesti te za sprječavanje odbacivanja transplantiranih organa. (www.ncbi.nlm.nih.gov)

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Trenutna terapija DT1 nadomjescima inzulina liječi posljedicu bolesti pritom ne utječući na usporenje progresivnog uništenja β stanica gušterače. Brojna istraživanja provedena su u svrhu raspetljavanja zamršenog klupka imunopatogeneze DT1, a s gotovo svakim novim otkrićem javila se i ideja o imunoterapiji usmjerenoj prema specifičnoj sastavnici imunskog sustava koja bi mogla dovesti bolest do stanja dugotrajne remisije.

Cilj ovog preglednog diplomskog rada je prikazati dosadašnje pristupe i istraživanja primjene imunoterapije u pokušaju liječenja dijabetesa tipa 1 te na temelju njih donijeti zaključak o učinkovitosti takve terapije.

3. MATERIJALI I METODE

Za potrebe pisanja ovog diplomskog rada korištena je stručna i znanstvena literatura povezana s imunopatogenezi i imunoterapijom dijabetesa tipa 1 pronađena pomoću tražilice GoogleScholar i u bazi podataka PubMed.

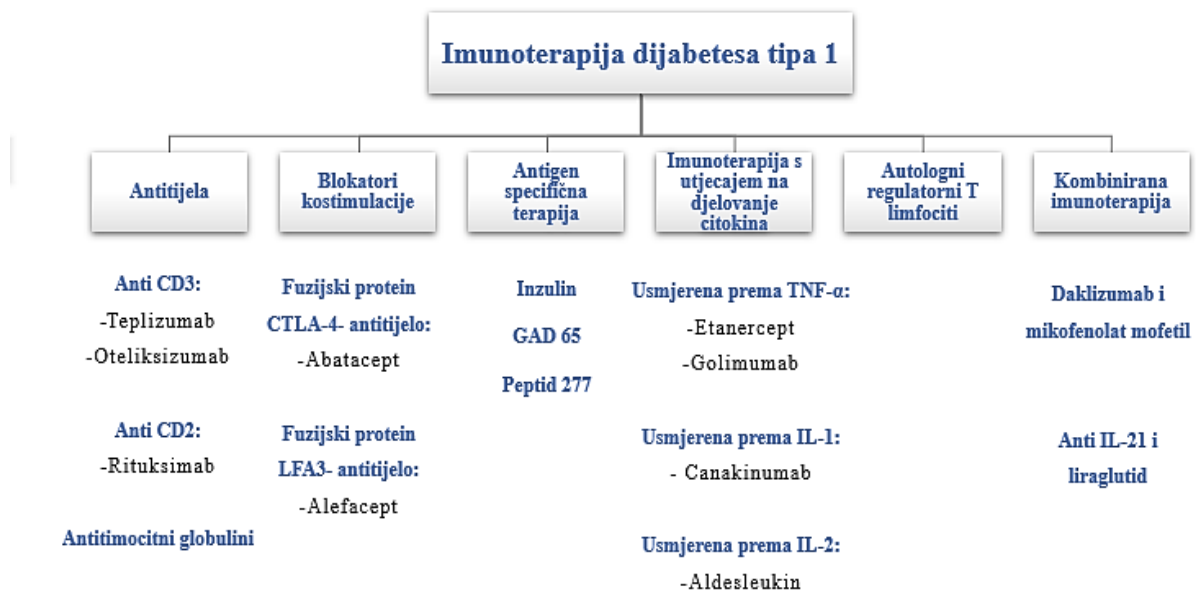
Provedena klinička ispitivanja kao i njihovi rezultati pronađena su u internetskoj bazi ClinicalTrials.gov.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Imunoterapija dijabetesa tipa 1

Prvi pristup imunoterapiji DT1 zabilježen je 1980. godine primjenom imunosupresiva ciklosporina koji ima posredni inhibitorski učinak na protein kalcijneurin potreban za aktivaciju T limfocita. Terapija je uspješno usporila razvoj DT1, ali zbog štetnih učinaka uslijed dugotrajne primjene (nefrotoksičnost i povećan rizik razvoja tumora) terapija ciklosporinom nikad nije odobrena za liječenje DT1. Unatoč opasnim nuspojavama, čija šteta nadmašuje korist terapije ciklosporinom, pozitivni rezultati ostvareni u usporavanju imunosnog uništenja tkiva gušterače ukazali su na moguću autoimunu pozadinu DT1 te otvorili vrata novim pristupima liječenja usmjerenima prema moduliranju autoimunog odgovora imunosnog sustava pri stanju DT1. (Warshauer i sur., 2020)

Slika 1 prikazuje pristupe imunoterapiji DT1, a u daljnjem tekstu opisani su mehanizmi djelovanja pojedinih pristupa kao i rezultati provedenih kliničkih ispitivanja njihove sigurnosti i učinkovitosti.



Slika 1 Sažeti prikaz pristupa imunoterapiji DT1

4.2. Imunoterapija antitijelima

Imunoterapija antitijelima pristup je kojim se dizajniranjem specifičnih antitijela omogućuje ciljano aktivirajuće ili blokirajuće djelovanje prema topljivim molekulama i površinskim staničnim biljezima imunskog sustava. Proizvodnja antitijela razlikuje se ovisno o tome radi li se o monoklonskim ili poliklonskim antitijelima. Monoklonska antitijela (mAt) proizvode se korištenjem kulture klonalnih plazma stanica koje proizvode željena specifična antitijela usmjerena prema jednom epitopu određenog antigena. Poliklonska antitijela (pAt) proizvode se unosom specifičnog antigena u tijelo životinje nakon čega se sakuplja životinjski serum koji sadrži antitijela usmjerena prema različitim epitopima određenog antigena. (Gault i McClenaghan, 2009)

4.2.1. Anti CD3

CD3 molekula je kompleks prisutan na površini T limfocita sastavljen od dva epsilon i dva zeta te gama i delta lanca. Prilikom interakcije TCR- peptid- MHC (I ili II) dolazi do konformacijske promjene TCR-a koja se prenosi na transmembranske lance CD3 molekule. Dijelovi lanaca smješteni u unutrašnjosti stanice imaju motiv aktivacije imunoreceptora na bazi tirozina (engl. imunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM) koji se uslijed konformacijske promjene fosforiliraju citosolnim kinazama što pokreće niz unutarstaničnih reakcija koje dovode do aktivacije CD4+ i CD8+ T limfocita. (Delves i sur., 2017)

Moduliranje prijenosa signala primljenog preko TCR-a moguće je ostvariti intravenskom primjenom anti CD3 mAt. Točan mehanizam ovakvog imunoterapijskog pristupa još nije u potpunosti razjašnjen. Smatra se da anti CD3 mAt imaju agonističko djelovanje na receptor pri čemu stvaraju signal koji dovodi do anergije ili apoptoze aktiviranih efektorskih T limfocita uz izostanak takvog djelovanja na regulacijske T limfocite. Apoptozirajući T limfociti iz stanice otpuštaju transformirajući faktor rasta β (engl. transforming growth factor beta, TGF- β) koji posreduje usmjeravanju imunskog odgovora prema toleranciji na način da potiče ekspresiju gena za protein imunskog odgovora 3 (engl. Forkhead box protein 3, FOXP3) u efektorskim CD4+ T limfocitima usmjeravajući ih tako prema imunosupresivnom fenotipu koji ima

moгуćnost usmjeravanja imunosne reakcije prema toleranciji. Istovremeno sa stvaranjem signala mođe doći do internalizacije ili odvajanja kompleksa mAt- CD3 s površine što onemogućuje daljnje signaliziranje TCR molekule na površini autoreaktivnog T limfocita ukoliko prepozna specifičan autoantigen. (Kuhn i Weiner, 2016)

Za imunoterapijsko lijećenje DT1 razmatraju se dva anti- CD3 mAt: teplizumab i oteliksizumab. Oba mAt usmjerena su prema epsilon lancu CD3 kompleksa, a njihovi Fc dijelovi nemaju sposobnost vezanja za Fc receptore. Razlikuju se prema podrijetlu- teplizumab je humanizirano antitijelo, a oteliksizumab je djelomično kimerno, a djelomično humanizirano antitijelo. (Kuhn i Weiner, 2016)

Učinkovitost teplizumaba u liječenju DT1 ispitana je u nekoliko istraživanja čiji su rezultati prikazani u tablici 1.

Tablica 1 Rezultati kliničkih ispitivanja teplizumaba

Godina Početka istraživanja	Broj Sudionika, dob i faza	Cilj istraživanja	Rezultat	Izvor
2005.	83; 8-30; Faza 2	Ispitati utjecaj teplizumaba na očuvanje proizvodnje C peptida kod ispitanika s DT1 nakon dvije godine od pojave kliničkih simptoma.	Dvije godine od početka primjene terapije zabilježen je usporen pad C peptida, pad koncentracije glikiranog hemoglobina i smanjenje doze inzulinske terapije u skupini koja je primila teplizumab u odnosu na placebo skupinu.	Herold i sur., 2013
2010.	76; ≤18 godina; Faza 2	Ispitati utjecaj teplizumaba na odgodu razvoja DT1 kod pacijenata s povećanim rizikom.	Rezultati dobiveni praćenjem stanja ispitanika nekoliko godina rezultiralo je odgodom početka DT1 za prosječno dvije godine kod pacijenata koji su primali teplizumab.	Herold i sur., 2019
2019.	300; 8-17, Faza 3	Ispitati utjecaj teplizumaba na odgodu razvoja DT1 kod pacijenata s povećanim rizikom.	Rezultati istraživanja se očekuju 2023. godine.	www.clinicaltrials.gov
2020.	Očekuje se 30 ispitanika; Faza 2	Istraživanje je nastavak na ono koje su proveli Harold i sur. 2019. godine, a cilj mu je ispitati sigurnost teplizumaba.	Rezultati se očekuju 2024. godine.	www.clinicaltrials.gov

Istraživanje koje su proveli Harold i suradnici rezultiralo je učinkovitošću teplizumaba u odgodi početka DT1. 2020. godine pokrenuto je novo kliničko istraživanje, kao nastavak na prethodno spomenuto istraživanje, čiji je cilj praćenje farmakokinetike i imunogeničnosti teplizumaba. Rezultati tog kliničkog ispitivanja očekuju se 2024. godine. Također je u tijeku kliničko ispitivanje učinka teplizumaba faze 3 koje se provodi na velikom broju ispitanika, a čiji se rezultati očekuju 2023. godine.

Rezultati kliničkih ispitivanja oteliksizumaba prikazani su u tablici 2. Prvo istraživanje provedeno 2008. godine nije rezultiralo očuvanjem funkcije β stanica pri dozi od 3,1 mg oteliksizumaba. Stoga je 2014. godine započeto novo istraživanje s ciljem određivanja doze oteliksizumaba koja je sigurna i učinkovita. Zabilježena je učinkovitost u očuvanju proizvodnje C peptida pri dozi od 9,0 mg oteliksizumaba uz mali broj slučajeva reaktivacije Epstein- Barrovog virusa.

Tablica 2 Rezultati kliničkih ispitivanja oteliksizumaba

Godina početka istraživanja	Broj sudionika; dob; faza	Cilj istraživanja	Rezultati istraživanja	Izvor
2008.	272;12-45 ; Faza 3	Ispitati učinak oteliksizumaba na očuvanje funkcije β stanica pri dozi od ukupno 3,1 mg.	Vrijednosti C peptida, glikiranog hemoglobina i doze inzulinske terapije nisu se razlikovale između skupine koja je primila oteliksizumab i placebo skupine. Smanjenje doze uzrokovalo je smanjen broj reaktivacija Epstein- Barrovog virusa.	Aronson i sur., 2014
2014.	30; 16-27; Faza 1/2	Ispitati dozu oteliksizumaba koja je sigurna, dobro tolerirana i koja dovodi do pozitivnog imunosnog odgovora kod sudionika s DT1.	18 mjeseci nakon početka ispitivanja zabilježena je učinkovitost oteliksizumaba u očuvanju proizvodnje C peptida pri dozama od 9,0 mg. Pri višim dozama nije zabilježena učinkovitost u očuvanju funkcije β stanica. Povećanjem doze zabilježen je povećan broj reaktivacija Epstein- Barrovog virusa.	Keymeulen i sur., 2020

4.2.2. Anti CD20

CD20 je transmembranski protein specifičan za B limfocite. Građen je kao polipeptidni lanac s 4 transmembranske domene čija su oba kraja smještena u unutrašnjosti stanice, a prolaskom kroz staničnu membranu formiraju se dvije izvanstanične petlje. Na površini B limfocita CD20 je prisutan u homodimernom obliku te je povezan s MHCII molekulom i B staničnim receptorom (engl. B cell receptor, BCR). (Pavlasova i Mraz, 2020) Prilikom aktivacije BCR-a (prepoznavanjem antigena na TCR-u T limfocita) CD20 se odvaja od BCR-a i grupira na membrani stvarajući homotetramer za kojeg se smatra da ima ulogu ionskog kanala za kalcij koji je potreban za unutarstanično signaliziranje i aktivaciju B limfocita. (Sharman, 2019) Tijekom imunopatogeneze DT1 B limfociti imaju ulogu proizvodnje antitijela usmjerenih prema autoantigenima, proupalnih citokina i prezentiranja antigena. (Boldison i Wong, 2021) Proizvedena autoantitijela usmjerena su prema unutarstaničnim komponentama i nemaju ulogu u antitijelima posredovanoj citotoksičnosti β stanica, ali su korisna u diferencijalnoj dijagnostici. (Bloem i Roep, 2017)

Imunoterapijski pristup intravenske primjene anti-CD20 mAt dovodi do deplecije B limfocita pomoću nekoliko mehanizama: o komplementu ovisna citotoksičnost, o antitijelu ovisna stanična toksičnost, o antitijelu ovisna fagocitoza i direktno pokretanje apoptoze. (Pavlasova i Mraz, 2020) Učinkovitost ovakvog pristupa u liječenju DT1 ispitana je primjenom rituksimaba koji je po strukturi monoklonsko kimerno antitijelo klase G_1 usmjereno prema CD20 molekuli. (Selewski i sur., 2010) U tablici 3 prikazani su rezultati provedenog kliničkog ispitivanja.

Rezultati provedenog kliničkog ispitivanja ukazuju na protektivan učinak rituksimaba u očuvanju funkcije β stanica uz minimalan razvoj neželjenih nuspojava no učinkovitost ovakve terapije nije dugotrajna.

Tablica 3 Rezultati kliničkog ispitivanja učinka rituksimaba

Godina Početka istraživanja	Broj sudionika i dob	Cilj istraživanja	Rezultati	Izvor
2006.	87; 8-40; Faza 2	Ispitati učinak rituksimaba u prevenciji napredovanja uništenja β stanica.	Rezultati sakupljeni godinu dana nakon početka istraživanja pokazali su povećane koncentracije C peptida, smanjen postotak glikiranog hemoglobina i smanjenje doze egzogenog inzulina kod pacijenata koji su primili rituksimab. Deplecija B limfocita uzrokovana rituksimabom nije imala dugoročan učinak. Zabilježene su blage nuspojave bez slučajeva neutropenije ni učestalih infekcija. Dvije godine nakon primitka rituksimaba nije zabilježeno značajno poboljšanje stanja DT1 u odnosu na sudionike iz placebo skupine.	Pescovitz i sur., 2009

4.2.3. Antitimocitni globulini

Antitimocitni globulini (ATG) su pAt klase G usmjerena prema površinskim biljezima ljudskih T limfocita. Smjesa ATG-a pripravlja se imunizacijom zečeva, konja ili koza izoliranim humanim timocitima ili stanicama T stanične linije nakon čega iz seruma životinje slijedi izolacija frakcije poliklonskih antitijela koja su usmjerena prema specifičnim površinskim antigenima T limfocita. (Lopez i sur., 2006) Komercijalni pripravak antitimocitnih globulina Thymoglobulin sadrži antitijela usmjerena prema CD2, CD3, CD4, CD8, CD11a, CD18, CD25, CD44 i CD45. (www.thymoglobulin.com)

Vežanjem antitijela za površinu T limfocita dolazi do uništenja T limfocita koje može biti posredovano s tri različita mehanizma- komplementom posredovana citoliza, fagocitoza opsoniranih T limfocita makrofagima ili poticanje Fas ligandom posredovane apoptoze. Dodatan učinak ATG-a u sprječavanju imunskog odgovora posredovanog T limfocitima postiže se vežanjem ATG-a za površinske adhezijske molekule i receptore za citokine kojima je omogućena kemotaksija T limfocita. (Duftner i sur.,2012)

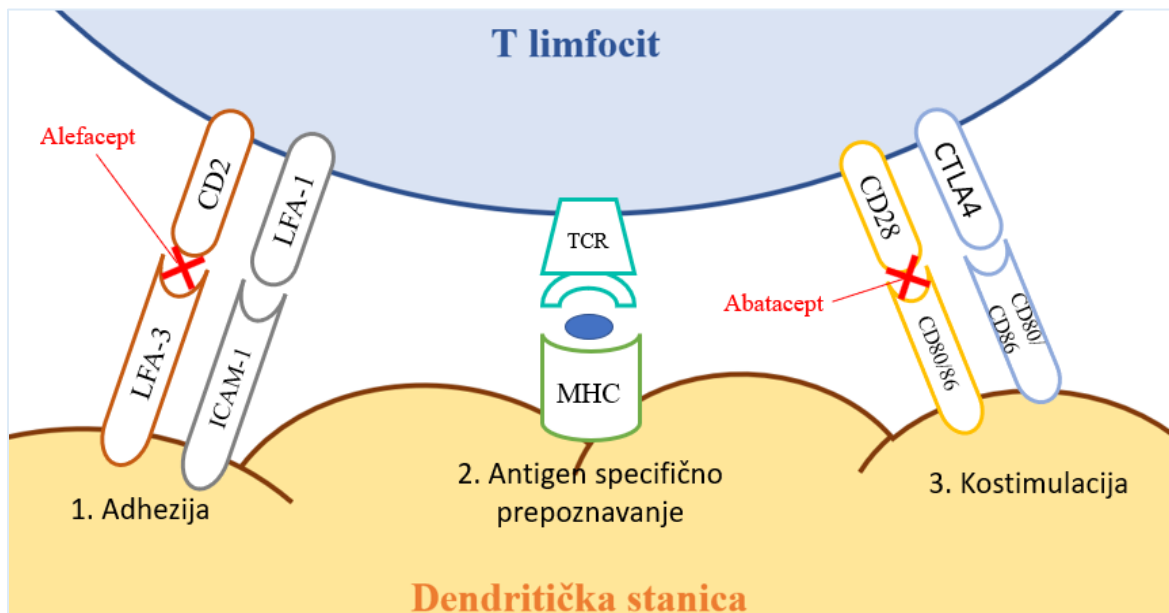
Provedena su dva klinička ispitivanja čiji su rezultati navedeni u tablici 4. Oba klinička ispitivanja ukazuju na potencijal ATG-a u očuvanju funkcije β stanice i proizvodnje inzulina što se odražava povećanjem koncentracije C peptida u krvi.

Tablica 4 Rezultati kliničkih ispitivanja ATG-a

Godina početka istraživanja	Broj Sudionika; dob; faza	Cilj istraživanja	Rezultat	Izvor
2007.	58; 12-35; Faza 2	Ispitati utjecaj ATG-a na usporenje progresije ranog stadija DT1.	Dvije godine nakon intravenskog primitka ATG-a zabilježen je pad brojčanih koncentracija gotovo svih podtipova T limfocita (uključujući i regulatorne (T reg)). Kod pacijenata starosti između 22 i 35 godina zabilježene su značajno više vrijednosti C peptida u odnosu na placebo skupinu. Kod pacijenata mlađih od 22 godine nije zabilježen protektivan učinak ATG-a. Nije zabilježen porast učestalosti infekcija.	Gitelman i sur., 2016
2016.	89; 12-45; Faza 2	Ispitati učinkovitost primjene samog ATG-a i uz dodatak granulocitnog faktora stimulacije rasta kolonije (engl. granulocyte colony stimulating factor, G-CSF).	U usporedbi s placebo, niske doze ATG-a su usporile pad koncentracije C peptida i smanjile koncentraciju glikiranog hemoglobina dok primjena ATG-a uz GCSF nije imala značajan učinak na poboljšanje stanja DT1. Dvije godine nakon početnog primitka terapije, vrijednosti koncentracije glikiranog hemoglobina bile su značajno niže kod pacijenata koji su primili ATG u odnosu na pacijente koji su primili placebo pripravak. Također je omjer broja Treg i konvencionalnih CD4+ T limfocita bio povećan kod pacijenata koji su primili ATG	Haller i sur., 2019

4.3. Blokatori kostimulacije

Za aktiviranje autoreaktivnih T limfocita potrebno je stvaranje imunodne sinapse između autoreaktivnog T limfocita i dendritičke stanice (DS) koja prenosi prerađeni autoantigen iz gušterače u pankreasni limfni čvor. Imunosna sinapsa (slika 2) uključuje stvaranje veza između adhezijskih, antigen specifičnih i kostimulacijskih molekula na površini prethodno spomenutih stanica. (Dustin, 2014)



Slika 2 Prikaz imunodne sinapse i meta imunoterapeutika

Prvi korak u stvaranju imunodne sinapse je ostvarivanje veze između adhezijskih molekula. Adhezijske molekule koje ulaze u interakciju su: limfocitnoj funkciji pridruženi antigen 3 (engl. lymphocyte function associated antigen 3, LFA-3) na površini DS i CD2 na površini T limfocita te unutarstanična adhezijska molekula 1 (engl. intracellular adhesion molecule 1, ICAM-1) na površini DS i limfocitnoj funkciji pridruženi antigen 1 (engl. lymphocyte function associated antigen 1, LFA-1) na površini T limfocita. Jednom kada se uspostave veze između adhezijskih molekula, antigen specifične molekule dovoljno su približene kako bi ušle u interakciju, a među njih se ubrajaju TCR i MHC. Ukoliko TCR molekula na površini T limfocita prepozna peptid predstavljen preko MHC molekule kao nešto strano dolazi

do stvaranja prvog signala i ekspresije kostimulacijskih molekula. Kostimulacijske molekule koje ulaze u interakciju su CD80 i CD86 (DS) s CD28 (T limfocit), te se ostvarivanjem veza između njih stvara drugi signal koji dovodi do potpune aktivacije T limfocita. (Delves i sur., 2017)

Aktivirani T limfociti reguliraju svoj status ekspresijom koinhibicijskog antigena 4 povezanog s citotoksičnim T limfocitima (engl. cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4, CTLA-4) koji ima ulogu receptora za ligande CD80 i CD86 eksprimirane na površini DS. Ostvarivanjem interakcije između CTLA-4 i CD 80 ili CD86 dolazi do inhibicije aktivnosti djelovanja T limfocita. (Rowshanravan i sur., 2018)

Kostimulacijske molekule na površini T limfocita razmatrane su kao potencijalna meta imunoterapeutika s ciljem sprječavanja aktivacije autoreaktivnih T limfocita. Nedostatak ostvarivanja kostimulatorne veze dovodi do anergije ili apoptoze autoreaktivnih T limfocita što je pozadina djelovanja ovakvog imunoterapeutskog pristupa. (Delves i sur., 2017)

4.3.1. Fuzijski protein CTLA4- antitijelo

Abatacept je fuzijski protein građen od izvanstanične domene molekule CTLA-4 i kristalizabilnog fragmenta (engl. fragment crystallizable, Fc) ljudskog antitijela klase G₁. Mehanizam djelovanja uključuje vezanje abatacepta preko CTLA-4 domene lijeka za CD80/CD86 koji se nalaze na površini dendritičke stanice blokirajući tako interakciju s CD28 molekulom na površini T limfocita. Na taj način sprječava se prijenos kostimulacijskog signala s DS na T limfocit, a time i aktivacija T limfocita. (www.go.drugbank.com)

Temeljem rezultata kliničkih ispitivanja prikazanih u tablici 5, abatacept nije učinkovit u očuvanju funkcije β stanica. Potencijalni uzrok neučinkovitosti abatacepta je primjena abatacepta u pre niskim dozama ili postojanje alternativnih kostimulacijskih puteva kojima T limfociti izbjegavaju ovisnost o CD28 za aktivaciju. (Warshauer i sur.,2020)

Tablica 5 Rezultati kliničkih ispitivanja abatacepta

Godina početka istraživanja	Broj sudionika; dob; faza	Cilj istraživanja	Rezultati	Izvor
2008.	122; 6-36; Faza 2	Ispitati učinkovitost abatacepta u očuvanju funkcije β stanica u ranom stadiju DT1.	U razdoblju od dvije godine ispitanici su primili 27 infuzija. Unutar 6 mjeseci od primjene terapije, koncentracije C peptida u krvi nakon obroka bile su više kod ispitanika koji su primali abatacept nego kod placebo skupine. Nakon 6 mjeseci od primitka terapije zabilježeno je paralelno smanjenje funkcije β stanica u skupini koja je primala abatacept s placebo skupinom.	Orban i sur., 2011
2011.	122; 6-36; Faza 2	Ovo istraživanje nastavak je na prethodno istraživanje iz 2008. godine. Cilj je ispitati učinkovitost abatacepta tri godine nakon intravenske primjene.	Tri godine nakon primitka terapije i dalje je zabilježen paralelan pad koncentracije C peptida u krvi između dvije skupine. Zabilježene su smanjene vrijednosti glikiranog hemoglobina u krvi ispitanika koji su primali abatacept u odnosu na ispitanike iz placebo skupine.	Orban i sur., 2014

4.3.2. Fuzijski protein LFA3- antitijelo

Fuzijski protein alefacept građen je od dvije LFA3 molekule povezane s Fc ljudskog antitijela klase G1. Svoje djelovanje ostvaruje vezanjem za CD2 molekulu prisutnu na površini memorijskih CD4+ i CD8+ T limfocita. Vezanjem alefacepta za CD2 spriječena je adhezija CD2 molekule T limfocita i LFA-3 molekule dendritičke stanice čime je onemogućena aktivacija memorijskih CD4+ i CD8+ T limfocita. Dodatan učinak alefacepta postignut je djelovanjem stanica prirodnih ubojica koje preko Fc receptora prepoznaju Fc alefacepta te dovode do apoptoze obilježenih T limfocita. (Rigby i sur., 2015)

U tablici 6 prikazani su rezultati kliničkog ispitivanja učinka alefacepta. Očuvanje funkcije β stanica dvije godine nakon terapije ukazuje na dobar potencijal alefacepta u ostvarivanju dugotrajne remisije DT1. Također smanjenje broja CD4+ i CD8+ T limfocita uz povećanje broja regulatornih T limfocita omogućuje usmjeravanje imunskog sustava prema toleranciji.

Tablica 6 Rezultati kliničkih ispitivanja alefacepta

Godina početka istraživanja	Broj sudionika; dob; faza	Cilj istraživanja	Rezultat	Izvor
2011.	49; 12-35; faza 2	Ispitati protektivan učinak alefacepta na β stanice u ranom stadiju DT1.	Rezultati dobiveni 24 mjeseca nakon primitka alefacepta pokazali su pozitivan učinak alefacepta na povećanje koncentracije C peptida, očuvanje β stanica, smanjenje doze egzogenog inzulina i smanjenje broja hipoglikemijskih događaja u odnosu na placebo skupinu. Također je zabilježeno smanjenje broja memorijskih CD4+ i CD8+ T limfocita i povećanje broja regulatornih T limfocita	Rigby i sur.,2015

4.4. Antigen specifična imunoterapija

Cilj antigen specifične terapije (AST) u liječenju DT1 je usmjeravanje imunskog odgovora prema toleranciji antigena naspram kojih je utvrđena autoreaktivnost T limfocita. Antigeni se mogu unijeti u organizam u cjelovitom obliku ili kao imunogenični fragmenti antigena. Unos fragmenata antigena bolji je pristup kojim se izbjegava procesuiranje antigena u dendritičkim stanicama koje bi moglo potaknuti ekspresiju kostimulacijskih molekula na njihovoj površini.

Fragment unijetog antigena direktno se veže za specifično mjesto na praznim MHCII molekulama dendritičkih stanica u mirovanju, dok se cjeloviti antigen dendritičke stanice procesuiraju te potom predstavljaju na površinu preko MHCII molekule. Prilikom interakcije s autoreaktivnim T limfocitima dolazi do ostvarivanja veze između TCR-a i MHCII molekule, no zbog smanjene ekspresije kostimulacijskih molekula (CD80 i CD86) na površini dendritičkih stanica u mirovanju ne dolazi do aktivacije naivnih autoreaktivnih CD4⁺ T limfocita već oni ulaze u stanje anergije. U takvom stanju mogu prijeći u različite fenotipove regulatornih T limfocita u kojima je povećana ekspresija gena za koinhibitorne molekule (CTLA-4) i IL-10. IL-10 uzrokuje smanjenje antigen prezentirajućih svojstava aktivnih dendritičkih stanica i na taj način ublažava mogućnost aktiviranja autoreaktivnih T limfocita što usmjerava imunsku reakciju prema toleranciji. (Richardson i Wraith, 2020)

Antigen može biti unjet u organizam različitim putevima što doprinosi učinkovitosti ovakvog oblika terapije. Smatra se da intralimfatički unos antigena dovodi do boljeg učinka terapije nego unos antigena oralnim ili supkutanim putem. (Senti i Kündig, 2015)

Najčešći autoantigeni u DT1 su GAD 65 i GAD 67, hormon inzulin, ZnT-8, ICA 69 i ICA 512. (Arvan i sur., 2012) Imunoterapijski pristupi čija je učinkovitost ispitana u liječenju DT1 su inzulin, GAD 65 te fragment HSP60.

4.4.1. Inzulin

Autoreaktivnost usmjerena prema inzulinu smatra se glavnim pokretačem imunskog odgovora prema β stanicama gušterače. (Zhang i sur., 2008) Provedena klinička ispitivanja čiji su rezultati navedeni u tablici 7 ispitala su sigurnost i učinak oralne primjene analoga inzulina na odgodu razvoja DT1 kod osoba s povećanim rizikom.

Imunoterapijski pristup primjene oralnog inzulina nije rezultirao očuvanjem funkcije β stanica te je u dva od tri istraživanja zabilježena povećana aktivacija imunskog sustava što umjesto očuvanja β stanica može dovesti do njihovog dodatnog autoimunog uništenja.

Tablica 7 Rezultati kliničkih ispitivanja učinkovitosti inzulina

Godina početka istraživanja	Broj sudionika; dob; faza	Put unosa	Cilj istraživanja	Rezultat	Izvor
2007.	25; 2-7; Faza 1/2	Oralno	Ispitati sigurnost oralne primjene inzulina kod djece s genetskim rizikom za razvoj DT1.	Pri dozama oralnog inzulina od 67,5 mg zabilježen je povećan broj CD4+ T limfocita i povećana koncentracija serumskog imunoglobulina G usmjerenog prema oralnom inzulinu.	Bonifacio i sur., 2015
2007.	560; 3-45; Faza 3	Oralno	Ispitati odgoda li oralna primjena inzulina razvoj DT1 kod osoba s povećanim rizikom.	Tri godine nakon primitka terapije nisu zabilježeni pozitivni učinci u prevenciji i odgodi DT1 u odnosu na placebo skupinu. Nisu zabilježene ozbiljne nuspojave.	Krischer i sur., 2017
2015.	44; 6 mjeseci- 3 godine; Faza 1/2	Oralno	Ispitati odgoda li oralna primjena inzulina razvoj DT1 kod djece s povećanim rizikom.	Nije zabilježen povoljan učinak na odgodu početka DT1. Nisu zabilježene ozbiljne nuspojave, ali zabilježena je intenzivna aktivacija autoreaktivnih T limfocita koji odgovaraju na inzulin.	Assfalg i sur., 2021.

4.4.2. GAD 65

GAD 65 je enzim uključen u proizvodnju gama aminomaslačne kiseline (engl. gamma aminobutiric acid, GABA) koja se skladišti u sekretornim mikrovezikulama β stanica gušterače. Smatra se da GABA svoje djelovanje ostvaruje potičući α stanice Langerhansovih otočića na proizvodnju glukagona. Gotovo 80 % pacijenata koji imaju povećan rizik za razvoj DT1 ili boluju od DT1 pokazuje imunoreaktivnost prema GAD65 koja se očituje prisutnošću anti-GAD 65 antitijela u krvi. (Arvan i sur., 2012)

Provedeno je nekoliko kliničkih ispitivanja učinkovitosti egzogene primjene GAD 65 u ostvarivanju imunosne tolerancije naspram GAD 65 autoantigena. U istraživanjima je primijenjen rekombinantni humani GAD 65 u kombinaciji s adjuvantom aluminijskim hidroksidom tvrtke Diamyd unesen supkutanim ili intralimfatičkim putem (u ingvinalni limfni čvor). (Morales i Thraikill, 2011) Rezultati provedenih istraživanja prikazani su u tablici 8.

Prema rezultatima kliničkih ispitivanja primjena GAD 65-alum pokazala se neučinkovitom u održavanju funkcije β stanica neovisno o putu unosa terapije. Istraživanje provedeno 2005. godine zabilježilo je povećanu ekspresiju FOXP3 i faktora transformacije rasta β (engl. transforming growth factor beta, TGF- β) kod ispitanika koji su primili GAD 65 supkutanim putem što ukazuje na potencijalni učinak GAD 65 na usmjeravanje imunosnog odgovora prema toleranciji.

Tablica 8 Rezultati kliničkih ispitivanja primjene GAD 65

Godina početka istraživanja	Broj sudionika ; dob; faza	Način unosa	Cilj istraživanja	Rezultat	Izvor
2005.	70; 10-18; Faza 2	Supkutano	Ispitati učinkovitost GAD 65-alum u očuvanju funkcije β stanica.	Zabilježeno je povećanje doze inzulinske terapije i nije zabilježena značajna razlika u vrijednosti glikiranog hemoglobina u odnosu na placebo skupinu. Ekspresija FOXP3 proteina i TGF- β u GAD 65-alum skupini je povećana.	Ludvigsson i sur., 2008
2009.	145; 3-45 ; Faza 2	Supkutano	Ispitati učinkovitost GAD 65-alum u očuvanju funkcije β stanica.	Ispitanici su primili GAD 65- alum u nekoliko doza (ukupno 40 μ g i 60 μ g). Godinu dana nakon primjene terapije nije zabilježen pozitivan utjecaj terapije na očuvanje proizvodnje inzulina.	Wherrett i sur., 2011
2010.	50; 4-18; faza 2	Supkutano	Ispitati sigurnost i učinkovitost GAD 65-alum na odgodu početka DT1 kod djece i adolescenata s povećanim rizikom.	Terapija nije ostvarila učinak u očuvanju β stanica. Nisu zabilježene ozbiljne nuspojave i terapija se smatra sigurnom.	Elding Larsson i sur., 2018
2017.	109; 12-24; Faza 2	Intralimfatično	Ispitati učinkovitost intralimfatične GAD 65-alum terapije uz dodatak vitamina D na očuvanje proizvodnje inzulina.	15 mjeseci nakon primjene terapije nisu zabilježene značajne razlike u koncentraciji C peptida, glikiranog hemoglobina i doze inzulinske terapije između sudionika koji su primili terapiju i sudionika iz placebo skupine. Nisu zabilježene ozbiljne nuspojave.	Ludvigsson i sur., 2021

4.4.3. Peptid 277

Prilikom razaranja β stanica među oslobođenim staničnim sadržajem nalazi se HSP60 s ulogom alarmina koji vezanjem za TLR2 na površini rezidentnih makrofaga i dendritičkih stanica te direktno uzrokuje njihovu aktivaciju. Navedeni protein dendritičke stanice mogu procesuirati i predstaviti autoreaktivnim limfocitima u pankreasnom limfnom čvoru. Upravo je peptid 277 autoantigeni fragment HSP60 koji ima imunogeničnu sposobnost. Komercijalni pripravak peptida 277 naziva DiaPep277 dobiva se izolacijom iz HSP60. (Nicholas i sur., 2011)

Mehanizam djelovanja peptida 277 je aktivacija DS i usmjeravanje njihovog odgovora na proizvodnju interleukina (IL) 10 koji djeluje imunosupresijski potičući usmjeravanje diferencijacije naivnih CD4+ T limfocita u podtip 2, a ne u podtip 1 koji posreduje uništenju β stanica. (Moin i sur., 2021)

Provedeno je nekoliko kliničkih ispitivanja učinka supkutane primjene DiaPep277 čiji su rezultati navedeni u tablici 9. Dio istraživanja ukazuje na očuvanje funkcije β stanica dok drugi dio istraživanja ukazuje na neučinkovitost DiaPep277 terapije. Temeljem navedenih rezultata teško je donijeti zaključak o korisnosti ovakvog oblika imunoterapije u liječenju DT1.

Tablica 9 Rezultati kliničkih ispitivanja DiaPep277

Godina početka istraživanja	Broj sudionika; Faza	Cilj istraživanja	Rezultat	Izvor
2001.	35; Faza 2	Ispitati učinkovitost primjene DiaPep277 kod pacijenata s nedavno dijagnosticiranim DT1.	Nakon 10 mjeseci od primitka DiaPep277 koncentracija C peptida ostala je očuvana. Zabilježen je porast doze inzulinske terapije kod ispitanika iz placebo skupine, ali ne i kod ispitanika koji su primili DiaPep277. Zabilježen je porast broja pomagačkih T limfocita tipa 2 u DiaPep277 skupini.	Raz i sur.,2001
2006.	48; Faza 1/2	Ispitati učinkovitost primjene DiaPep277 kod pacijenata s nedavno dijagnosticiranim DT1.	Smanjenje brzine pada koncentracije C peptida zabilježeno je samo kod skupine koja je primala DiaPep277 u dozi od 2,5 mg, dok pri nižim dozama nije zabilježen takav učinak. Nakon 18 mjeseci od primjene DiaPep277 zabilježene su povećane vrijednosti glikiranog hemoglobina, a doza egzogenog inzulina ostala je ista. Nisu zabilježene ozbiljne nuspojave.	Huurman i sur., 2007
2007.	30; Faza 2	Ispitati sigurnost i učinkovitost primjene DiaPep277 u očuvanju funkcije β stanica kod djece s nedavno dijagnosticiranim DT1.	Godinu dana nakon primitka DiaPep277 nije zabilježeno poboljšanje razine C peptida u odnosu na placebo skupinu. Vrijednosti glikiranog hemoglobina i egzogenog inzulina nisu se značajno razlikovale između skupina. Nisu zabilježene ozbiljne nuspojave.	Lazar i sur., 2007
2010.	457; Faza 3	Ispitati učinkovitost i sigurnost primjene DiaPep277 u očuvanju funkcije β stanica.	Zabilježeno je očuvanje proizvodnje C peptida uz smanjenje vrijednosti glikiranog hemoglobina kod pacijenata koji su primili DiaPep277 u odnosu na placebo skupinu.	Raz i sur., 2014

4.5. Terapija s utjecajem na citokine

Citokini su potencijalna meta djelovanja imunoterapeutika zbog sposobnosti usmjeravanja različitih međustaničnih interakcija između β stanica i stanica imunskog sustava. Cilj ovakvog imunoterapeutskog pristupa je ublažiti upalnu imunosnu reakciju blokiranjem djelovanja proupalnih citokina ili potaknuti regulatorne sastavnice imunskog sustava na djelovanje egzogenom primjenom protuupalnih citokina. (Lu i sur., 2020)

4.5.1. Terapija usmjerena prema TNF- α

Prilikom apoptoze β stanica gušterače, među oslobođenim staničnim molekulama nalaze se HSP60 i HMGB koji se vežu preko TLR2 receptora na površini makrofaga i dendritičkih stanica te pokreću niz unutarstaničnih reakcija koje rezultiraju aktivacijom nuklearnog faktora kapa B. On djeluje kao promotor gena za proupalne citokine među kojima se nalazi i faktor tumorske nekroze α (engl. tumor necrosis factor alpha, TNF- α). (Liu i sur.,2017; Yehualashet, 2020). Osobe koje boluju od DT1 imaju povećanu koncentraciju TNF- α u serumu u odnosu na zdrave pojedince. (Qiao i sur., 2017)

TNF- α svoje djelovanje ostvaruje preko dva tipa receptora- CD120a i CD120b. CD120a je konstitutivno eksprimiran na površini gotovo svih stanica s jezgrom te je preko njega posredovana stanična apoptoza, dok je CD120b inducibilno eksprimiran na površini makrofaga i perifernih T limfocita te je preko njega posredovana proliferacija, diferencijacija i proizvodnja citokina. Receptori se mogu enzimskim procesom odvojiti od stanične membrane i cirkulirati krvlju u topljivom obliku u kojem imaju potencijal ostvarivanja antagonističkog učinka na TNF- α . (Hijdra i sur.,2012)

4.5.1.1. Golimumab

Golimumab je mAt klase G_1 usmjereno prema topljivom i transmembranskom obliku TNF- α molekule (Mazumdar i Greenwald, 2009). Svoj inhibitorni učinak ostvaruje steričkim ometanjem vezanja TNF- α za CD120a i CD120b čime se onemogućuje proupalni učinak na B i T

limfocite i apoptoza neimunskih stanica. (Ono i sur., 2018) U tablici 10 su prikazani rezultati istraživanja učinka golimumaba kao imunoterapeutika za DT1.

Tablica 10 Rezultati kliničkog ispitivanja golimumaba

Godina početka istraživanja	Broj sudionika; dob; faza	Cilj istraživanja	Rezultati	Izvor
2016.	84; 6-21; Faza 2	Ispitati učinkovitost golimumaba u održavanju funkcije β stanica kod pacijenata s ranim stadijem DT1.	Zabilježeno je smanjenje koncentracije potrebne doze inzulinske terapije i povećanje proizvodnje endogenog inzulina kod sudionika iz skupine kojoj je supkutanim putem primijenjen golimumab u odnosu na skupinu koja je primila placebo pripravak. Od neželjenih nuspojava zabilježene su blage i umjerene infekcije te neutropenija.	Quattrin i sur., 2020

Blokiranje TNF- α ne rezultira samo sprječavanjem aktivacije T i B limfocita, već i ostalih stanica imunskog sustava poput neutrofila. (Hastings i sur.,2010) Rezultati ovog istraživanja ukazuju na neutropeniju kao nuspojavu primjene golimumaba što može biti posljedica nedostatka aktivnosti TNF- α što dovodi do učestalije pojave infekcija.

4.5.1.2. Etanercept

Fuzijski protein etanercept proizveden je rekombinantnom DNA tehnologijom. Građen je od dvije kopije izvanstanične domene TNF- α receptora i Fc dijela humanog imunoglobulina klase G₁. Mehanizam djelovanja ostvaruje vezanjem TNF- α molekule pri čemu sprječava njeno vezanje za endogene receptore. (Molta, 2007) U tablici 11 su prikazani rezultati provedenog kliničkog ispitivanja učinka etanercepta u liječenju DT1.

Rezultati ovog istraživanja ukazuju na potencijal etanercepta u održavanju funkcije β stanica no za potvrdu sigurnosti i učinkovitosti etanercepta u liječenju DT1 potrebno je provesti kliničko istraživanje na većem broju ispitanika.

Tablica 11 Rezultati kliničkog ispitivanja etanercepta

Godina početka istraživanja	Broj sudionika; dob; faza	Cilj istraživanja	Rezultat	Izvor
2009.	18; 7-18; Faza 2	Ispitati učinkovitost etanercepta u očuvanju funkcije β stanica kod mlađih pacijenata.	Nakon 24 tjedna od primitka etanercepta zabilježene su niže koncentracije glikiranog hemoglobina i povećana proizvodnja endogenog inzulina kod sudionika koji su primali etanercept u odnosu na placebo pripravak.	Mastrandrea i sur., 2009

4.5.2. Terapija s utjecajem na IL-2

Aldesleukin je rekombinantni interleukin 2 (IL-2) koji svoje djelovanje ostvaruje vezanjem za CD25 molekulu koja je jedna od tri podjedinice receptora za IL-2. CD25 molekula prisutna je na površini različitih fenotipova efektorskih CD4⁺ T limfocita, no u različitoj mjeri. Površinska ekspresija CD25 povećana je kod CD4⁺ FOXP3⁺ fenotipa regulatornih T limfocita na koje aldesleukin u manjim dozama ostvaruje bolji učinak nego na ostale fenotipove CD4⁺ T limfocita. (Marcovecchio i sur., 2020) Vezanjem aldesleukina za CD25 na površini CD4⁺ FOXP3⁺ T limfocita osigurava se njihov razvoj i funkcionalnost što usmjerava imunski sustav prema stanju tolerancije. (Hulme i sur., 2012)

U tijeku je kliničko ispitivanje učinkovitosti aldesleukina koje je prikazano u tablici 12 čiji se rezultati očekuju krajem 2022. godine.

Tablica 12 Klinička ispitivanja učinkovitosti aldesleukina

Godina početka istraživanja	Broj sudionika; dob; faza	Cilj istraživanja	Rezultat	Izvor
2019.	41; 6-18; Faza 2	Ispitati učinkovitost aldesleukina u očuvanju proizvodnje inzulina kod djece i adolescenata s DT1.	Rezultati kliničkog ispitivanja očekuju se krajem 2022. godine.	Marcovecchio i sur., 2020.

4.5.3. Terapija s utjecajem na IL-1

IL-1 je proupalni citokin koji ostvaruje direktan učinak na β stanice. Vežanjem IL-1 na receptor za IL-1 koji je prisutan na površini β stanica dolazi do stvaranja signala koji se prenosi u unutrašnjost stanice čiji je krajnji ishod apoptoza β stanica. (Lu i sur., 2020)

Canakinumab je humano mAt klase G1 usmjereno prema β tipu interelukina 1 (IL-1 β). Vežanjem mAt za IL-1 β neutralizirano je djelovanje citokina na β stanice. (Bettiol i sur. , 2019) U tablici 13 prikazan je rezultat kliničkog ispitivanja utjecaja canakinumaba na očuvanje funkcionalnost β stanica.

Ovakav imunoterapijski pristup nije se pokazao učinkovitim u održavanju remisije DT1, a razlog neuspjeha može biti prekasno početak primjene canakinumaba. Terapija bi možda pokazivala bolji učinak ukoliko se primjeni u stadiju prije razvoja DT1, no potrebno je provesti nova klinička ispitivanja čiji će sudionici biti osobe s povećanim rizikom za razvoj DT1. (Moran i sur., 2013)

Tablica 13 Rezultati kliničkog ispitivanja učinkovitosti canakinumaba

Godina početka istraživanja	Broj sudionika; dob; faza	Cilj istraživanja	Rezultat	Izvor
2010.	71; 6-45; faza 2	Ispitati utjecaj canakinumaba na očuvanje β stanica u ranom stadiju DT1.	Rezultati sakupljeni godinu dana nakon primitka terapije pokazali su neznačajnu razliku između koncentracije C peptida u krvi ispitanika koji su primili canakinumab i ispitanika iz placebo skupine. Nisu zabilježene ozbiljne nuspojave.	Moran i sur., 2013

4.6. Terapija autolognim regulatornim T limfocitima

Treg sudjeluju u supresiji imunskog odgovora lučenjem protuupalnih citokina IL-10 i TGF- β te direktnom interakcijom preko koinhibicijske CTLA-4 molekule. Najučestaliji fenotip Treg na površini ima CD25 molekulu koja ima visoki afinitet za IL-2 te FOXP3 koji je nužan za razvoj i održavanje funkcije Treg. (Visperas i Vignali, 2016) Istraživanja provedena na djeci s rizikom za razvoj DT1 pokazala su povezanost brzine progresije DT1 s brojem Treg. Smanjen broj inzulinspecifičnih Treg povezan je s bržom progresijom DT1 do kliničkih simptoma. (Zahran i sur., 2012)

Intravenskim unosom autolognih antigen specifičnih Treg može se nadomjestiti nedostatak Treg. Postupak provođenja terapije autolognim Treg podrazumijeva izolaciju Treg iz periferne krvi pacijenta koji boluje od DT1, umnažanje antigen specifičnih Treg *ex vivo* te njihov povratak u tijelo pacijenta. (Bluestone i sur., 2015)

Provedena su dva klinička ispitivanja sigurnosti i učinkovitosti primjene infuzije autolognih Treg čiji su rezultati prikazani u tablici 14. Iako je u oba klinička ispitivanja uključen

mali broj ispitanika, rezultati ukazuju na dugotrajnu učinkovitost i sigurnost primjene autolognih Treg.

Tablica 14 Rezultati kliničkih ispitivanja primjene autolognih Treg

Godina početka istraživanja	Broj sudionika; dob; faza	Cilj istraživanja	Rezultat	Izvor
2010.	10; 8-16; Faza 1/2	Ispitati utjecaj primjene autolognih regulatornih T limfocita u održavanju remisije DT1.	Šest mjeseci nakon primitka terapije uspoređene su koncentracije C-peptida, glukoze, glikiranog hemoglobina i doze inzulinske terapije između dvije skupine. Značajna razlika zabilježena je u vrijednostima C- peptida i doze inzulinske terapije. Koncentracija C-peptida bila je veća u krvi pacijenata koji su primili terapiju, a doza inzulinske terapije značajno manja. Kod ispitanika nisu zabilježene nuspojave te se ovakav oblik terapije smatra sigurnim	Marek-Trzonkowska i sur., 2012
2012.	14; 19-43; Faza 1/2	Ispitati sigurnost i učinkovitost infuzije autolognih Treg u očuvanju funkcije β stanica.	Primjena terapije autolognih T reg rezultirala trajnim porastom broja FOXP3+ CD4+ CD25+ fenotipa Treg i održavanje stalnih vrijednosti C peptida u razdoblju od dvije godine nakon primjene terapije što ukazuje na pozitivan učinak autolognih Treg u očuvanju funkcije β stanica.	Bluestone i sur., 2015

4.7. Kombinirana imunoterapija

4.7.1. Daklizumab i mikofenolat mofetil

Daklizumab je mAt klase G₁ koje je usmjereno prema α podjedinici CD25 molekule koja ima ulogu receptora za IL-2. CD25 molekula prisutna je konstitutivno na površini CD4+ FOXP3+ fenotipa regulatornih T limfocita, a inducibilno na površini aktiviranih CD4+ i CD8+ T limfocita. Mehanizam djelovanja daklizumaba leži u blokiranju vezanja IL-2 za CD25 pri čemu

se sprječava daljnja proliferacija aktiviranih CD4+ i CD8+ T limfocita, ali i Treg. (Kim i Baker, 2016)

Mikofenolat mofetil (MMF) je inhibitor enzima inozin monofosfat dehidrogenaze uključenog u sintezu gvanozina. Enzim postoji u dvije izoforme, od kojih je izoforma 2 najzastupljenija u aktiviranim T i B limfocitima i na nju MMF ostvaruje bolji inhibitorski učinak nego na izoformu 1 koja je prisutna u drugim tipovima stanica. Smanjenje sinteze gvanozina uslijed inhibicije inozin monofosfat dehidrogenaze MMF-om posljedično dovodi do nemogućnosti sinteze DNA molekule odnosno ostvaruje se citostatični učinak koji je najizraženiji u T i B limfocitima. (Allison, 2005)

I daklizumab i MMF djeluju imunosupresijski te je cilj ovakvog kombiniranog pristupa očuvati funkciju β stanica smirivanjem imunskog odgovora naspram njih. Do sada je provedeno jedno kliničko ispitivanje utjecaja samog daklizumaba i u kombinaciji s MMF-om u održavanju funkcije β stanica gušterače. Rezultati kliničkog ispitivanja navedeni u tablici 17.

Tablica 15 Rezultati kliničkog ispitivanja učinkovitosti kombinacije daklizumaba i mikofenolat mofetila u liječenju DT1

Godina početka istraživanja	Broj sudionika; dob; faza	Cilj istraživanja	Rezultat	Izvor
2004.	126; 8-45; Faza 2	Ispitati utjecaj primjene samog daklizumaba i u kombinaciji s MMF-om u sprječavanju uništenja β stanica imunskim sustavom u ranom stadiju DT1.	Dvije godine nakon primitka samog daklizumaba ili u kombinaciji s MMF-om nije zabilježeno poboljšanje u proizvodnji C peptida. Zabilježen je veći broj infekcija u odnosu na placebo skupinu.	Gottlieb i sur., 2010

Temeljem rezultata provedenog ispitivanja, kombinirana terapija daklizumaba i MMF-a ne uspijeva održati funkciju β stanica. Ovakav imunoterapeutski pristup sa sobom nosi mnogo

rizika, jedan od kojih je potencijalno smanjenje broja regulatornih T limfocita koji imaju važnu ulogu u reguliranju imunosnog odgovora.

4.7.2. Anti IL-21 i liraglutid

IL-21 je citokin kojeg u najvećoj mjeri proizvode podtip 17 pomagačkih T limfocita (engl. T helper 17, Th17) i folikularni pomagački T limfociti (engl. T follicular helper, Tfh). Vežanjem za površinski receptor za IL-21 prisutan na brojnim stanicama imunosnog sustava ostvaruje raznoliko djelovanje. Proupalni učinak zamijećen je poticanjem proliferacije i razvoja Th17, Tfh, CD8+ T limfocita, makrofaga, diferencijacije B limfocita u aktivirane plazma stanice te smanjenje usmjeravanja diferencijacije T limfocita u regulatorni podtip. Jedini protuupalni učinak ostvaruju smanjenjem sposobnosti dendritičkih stanica za preradu i prezentiranje antigena. Pacijenti s DT1 imaju povećanu koncentraciju IL-21 u krvi. (Long i sur., 2019)

Liraglutid je sintetski oblik glukagonu sličnog peptida 1 (engl. glucagon like peptide 1, GLP-1) koji vežanjem na receptor za GLP-1 prisutan na površini β stanica dovodi do povećanog izlučivanja inzulina i posljedičnog smanjenja izlučivanja glukagona. Smatra se da GLP-1 smanjuje apoptozu β stanica gušterače te potiče njihovu proliferaciju i razvoj. (Nolte Kennedy, 2012)

Ideja iza ovakvog pristupa leži u supresiji imunosnog sustava primjenom anti-IL21 antitijela koje vežanjem IL-21 onemogućava njegov proupalni učinak uz istovremeno poticanje regeneracije β stanica gušterače liraglutidom. (Von Herrath i sur., 2021) Rezultati provedenog kliničkog ispitivanja primjene anti-IL-21 i liraglutida navedeni su u tablici 16.

Temeljem rezultata provedenog kliničkog ispitivanja ovakav kombinirani pristup u održavanju funkcionalnosti β stanica pokazao se učinkovitim, ali ne i dugotrajnim.

Tablica 16 Rezultat kliničkog ispitivanja kombinacije anti-IL-21 i liraglutida

Godina početka istraživanja	Broj sudionika; dob; faza	Cilj istraživanja	Rezultat	Izvor
2015.	308; 18-45; faza 2	Ispitati učinkovitost istovremene primjene anti- IL-21 i liraglutida u očuvanju preživljenja β stanica i smanjenju komplikacija imunoterapijskog liječenja.	<p>Nakon 54 tjedna od primitka terapije, zabilježeno je značajno smanjenje pada koncentracije C peptida nakon obroka kod sudionika koji su primili miješanu terapiju u odnosu na one koji su primili samo IL-21, liraglutid ili placebo, no takav učinak nije bio dugotrajan.</p> <p>Vrijednosti glikiranog hemoglobina nisu se značajno razlikovale između skupina.</p> <p>Od nuspojava su zabilježeni poremećaji probavnog sustava koji su česta posljedica terapije liraglutidom</p>	Von Herrath i sur., 2021

5. ZAKLJUČCI

- Najveći potencijal u održavanju remisije DT1 pokazuju teplizumab, alefacept i antitimocitni globulini, a sva tri imunoterapijska pristupa usmjerena su prema sprječavanju aktivacije T limfocita.
- Nijedna imunoterapija ne uspijeva u potpunosti izliječiti DT1 nego samo usporiti progresiju bolesti.
- Vrijeme početka primjene terapije pokazalo se značajnim. Temeljem prikazanih rezultata kliničkih ispitivanja, imunoterapija je učinkovitija ako se s njenom primjenom započne u ranom stadiju bolesti ili čak i prije razvoja bolesti dok je veća očuvanost mase gušterače.
- Trenutno nijedna imunoterapija nije odobrena za liječenje dijabetesa tipa 1.

6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

KRATICE

AST- antigen specifična terapija

ATG- antitimocitni globulini

BCR- B stanični receptor (engl. B cell receptor)

CD- stanični diferencijacijski antigen (engl. cluster of differentiation)

CTLA-4- antigen 4 povezan s citotoksičnim T limfocitima (engl. cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4)

DS- dendritička stanica

DT1- dijabetes tipa 1

Fc- kristalizabilni fragment (engl. fragment crystallizable)

FOXP3- protein imunskog odgovora 3 (engl. forkhead box protein 3)

GABA- gama aminomaslačna kiselina (engl. gama aminobutiric acid)

GAD- dekarboksilaza glutaminske kiseline (engl. glutamic acid decarboxilase)

G-CSF- granulocitni faktor stimulacije rasta kolonije (engl. granulocyte colony stimulating factor)

GLP-1- glukagonu sličan peptid 1 (engl. glucagon like peptide 1)

HLA- sustavna tkivna snošljivost (engl. human leukocyte antigen)

HSP60- protein toplinskog šoka (engl. heat shock protein 60)

HMGB- protein visoke mobilnosti (engl. high mobility group box)

ICA69- autoantigen stanica otočića 69 (engl. islet cell autoantigen 69)

ICAM-1- unutarstanična adhezijska molekula 1 (engl. intracellular adhesion molecule)

IL- interleukin

ITAM- motiv aktivacije imunoreceptora na bazi tirozina (engl. immunoreceptor tyrosine-based activation motif)

LFA-1- limfocitnoj funkciji pridruženi antigen 1 (engl. lymphocyte function associated antigen 1)

LFA-3- limfocitnoj funkciji pridruženi antigen 3 (engl. lymphocyte function associated antigen 3)

mAt- monoklonsko antitijelo

MHC I ili II- glavna molekula tkivne podudarnosti I ili II(engl. major histocompatibility complex I ili II)

MMF- mikofenolat mofetil

pAt- poliklonsko antitijelo

TCR- T stanični receptor (engl. T cell receptor)

Tfh- folikularni pomagački T limfocit (engl. T follicular helper)

TGF- β - transformirajući faktor rasta beta (engl. transforming growth factor beta)

Th17- podtip 17 pomagačkih T limfocita (engl. T helper 17)

TLR2- receptor sličan Tollu 2 (engl. Toll like receptor 2)

TNF- α - faktor tumorske nekroze alfa (engl. tumor necrosis factor alpha)

Treg- regulatorni T limfocit

ZnT-8 – transporter cinka 8

SIMBOLI

α - alfa

β - beta

γ - gama

7. LITERATURA

- Abatacept, 2007., <https://go.drugbank.com/drugs/DB01281> , pristupljeno 05. 05. 2022.
- Allison A. Mechanisms of action of mycophenolate mofetil. *Lupus*, 2005, 14(3), 2-8.
- American Diabetes Association. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes- 2021. *Diabetes Care*, 2021, 44, 15–33.
- Aronson R, Gottlieb PA, Christiansen JS, Donner TW, Bosi E, Bode BW, Pozzilli P i DEFEND Investigator Group. Low-dose oteelixizumab anti-CD3 monoclonal antibody DEFEND-1 study: results of the randomized phase III study in recent-onset human type 1 diabetes. *Diabetes care*, 2014, 37(10), 2746–2754.
- Arvan P, Pietropaolo M, Ostrov D, Rhodes CJ. Islet Autoantigens: Structure, Function, Localization, and Regulation. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 2012, 2, a007658.
- Assfalg R, Knoop J, Hoffman KL, Pfirrmann M, Zapardiel-Gonzalo JM, Hofelich A, Eugster A, Weigelt M, Matzke C, Reinhardt J, Fuchs Y, Bunk M, Weiss A, Hippich M, Halfter K, Hauck SM, Hasford J, Petrosino JF, Achenbach P, Bonifacio E, Ziegler AG. Oral insulin immunotherapy in children at risk for type 1 diabetes in a randomised controlled trial. *Diabetologia*, 2021, 64(5), 1079-1092.
- At-Risk for Type 1 Diabetes Extension Study, 2020,
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04270942> , pristupljeno 21.05.2022.
- Bettiol A, Lopalco G, Emmi G, Cantarini L, Urban ML, Vitale A. Unveiling the Efficacy, Safety, and Tolerability of Anti-Interleukin-1 Treatment in Monogenic and Multifactorial Autoinflammatory Diseases. *Int J Mol Sci.*, 2019, 20(8), 1898.
- Bloem SJ, Roep BO. The elusive role of B lymphocytes and islet autoantibodies in (human) type 1 diabetes. *Diabetologia*, 2017, 60, 1185–1189.
- Bluestone JA, Buckner JH, Fitch M, Gitelman SE, Gupta S i sur. Type 1 diabetes immunotherapy using polyclonal regulatory T cells. *Sci Transl Med*, 2015, 7(315), 315ra189.

Boldison J, Wong FS. Regulatory B Cells: Role in Type 1 Diabetes. *Front. Immunol*, 2021, 12, članak broj 746187.

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; Pre-POINT Study Group. 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*, 2015, 313(15), 1541-1549.

Boras J, Brkljačić N, Artuković-Nadinić I. Makrovaskularne komplikacije šećerne bolesti. U: Uloga laboratorija u dijagnostici i praćenju šećerne bolesti. Vučić Lovrenčić, urednica, Zagreb, Medicinska naklada, 2011, str. 41.

Cabrera SM, Rigby MR, Mirmira RG. Targeting regulatory T cells in the treatment of type 1 diabetes mellitus. *Curr Mol Med*, 2012, 12(10), 1261-1272.

Delves PJ, Seamus MJ, Burton dr, Roitt IM. Roitt's Essential Immunology, London, Wiley Blackwell, 2017, str. 107, 190, 203-207.

Duftner C, Dejaco C, Hengster P, Bijuklic K, Joannidis M, Margreiter R, Schirmer M. Apoptotic effects of antilymphocyte globulins on human pro-inflammatory CD4+CD28- T-cells. *PLoS One*, 2012, 7(3), e33939.

Dustin ML. The Immunological Synapse. *Cancer Immunol Res*, 2014, 2(11), 1023-1033.

Elding Larsson H, Lundgren M, Jonsdottir B, Cuthbertson D, Krischer J. Safety and efficacy of autoantigen-specific therapy with 2 doses of alum-formulated glutamate decarboxylase in children with multiple islet autoantibodies and risk for type 1 diabetes: A randomized clinical trial. *Pediatr Diabetes*, 2018, 19(3), 410-419.

Gault VA, McClenaghan NH. Understanding bioanalytical chemistry: Principles and applications. Chichester, Wiley-Blackwell, 2009, str. 201.

Gitelman SE, Gottlieb PA, Felner EI, Willi SM, Fisher LK, Moran A. Antithymocyte globulin therapy for patients with recent-onset type 1 diabetes: 2 year results of a randomised trial. *Diabetologia*, 2016, 59(6), 1153-61.

Gottlieb PA, Quinlan S, Krause-Steinrauf H i sur. Failure to preserve beta-cell function with mycophenolate mofetil and daclizumab combined therapy in patients with new-onset type 1 diabetes. *Diabetes Care*, 2010, 33(4), 826-832.

Guyton AC, Hall JE. Medicinska fiziologija. Zagreb, Medicinska naklada, 2017, str. 994.

Haller MJ, Long SA, Blanchfield JL, Schatz DA, Skyler JS, Krischer JP, Bundy BN, i sur. Type 1 Diabetes TrialNet ATG-GCSF Study Group. Low-Dose Anti-Thymocyte Globulin Preserves C-Peptide, Reduces HbA_{1c}, and Increases Regulatory to Conventional T-Cell Ratios in New-Onset Type 1 Diabetes: Two-Year Clinical Trial Data. *Diabetes*, 2019, 68(6), 1267-1276.

Hastings R, Ding T, Butt S, Gadsby K, Zhang W, Moots RJ, Deighton C. Neutropenia in patients receiving anti-tumor necrosis factor therapy. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 2010, 62(6), 764-769.

Herold KC, Gitelman SE, Ehlers MR, Gottlieb PA, Greenbaum CJ, Hagopian W, Boyle KD, Keyes-Elstein L, Aggarwal S, Phippard D, Sayre PH, McNamara J, Bluestone JA; AbATE Study Team. Teplizumab (anti-CD3 mAb) treatment preserves C-peptide responses in patients with new-onset type 1 diabetes in a randomized controlled trial: metabolic and immunologic features at baseline identify a subgroup of responders. *Diabetes*, 2013, 62(11), 3766-74.

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 Group. An Anti-CD3 Antibody, Teplizumab, in Relatives at Risk for Type 1 Diabetes. *N Engl J Med*, 2019, 381(7), 603-613.

Hijdra D, Vorselaars AD, Grutters JC, Claessen AM, Rijkers GT. Differential expression of TNFR1 (CD120a) and TNFR2 (CD120b) on subpopulations of human monocytes. *J Inflamm (Lond)*, 2012, 9(1), 38.

Hulme MA, Wasserfall CH, Atkinson MA, Brusko TM. Central role for interleukin-2 in type 1 diabetes. *Diabetes*. 2012, 61(1), 14-22.

Huurman VA, Decochez K, Mathieu C, Cohen IR, Roep BO. Therapy with the hsp60 peptide DiaPep277™ in C-peptide positive type 1 diabetes patients. *Diabetes Metab. Res. Rev.*, 2007, 23, 269-275.

Immunotherapy, 2021, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519046/> , pristupljeno 15.05.2022.

Insel RA, Dunne JL, Atkinson MA, Chiang JL, Dabelea D i sur. Staging presymptomatic type 1 diabetes: a scientific statement of JDRF, the Endocrine Society, and the American Diabetes Association. *Diabetes Care*, 2015, 38(10), 1964-1974.

Keymeulen B, van Maurik A, Inman D, Oliveira J, McLaughlin R, Gittelman RM, Roep BO, Gillard P, Hilbrands R, Gorus F, Mathieu C, Van de Velde U, Wisniacki N, Napolitano A. A randomised, single-blind, placebo-controlled, dose-finding safety and tolerability study of the anti-CD3 monoclonal antibody oteelixizumab in new-onset type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2021, 64(2), 313-324.

Kim AP, Baker DE. Daclizumab. *Hosp Pharm*, 2016, 51(11), 928-939.

Krischer JP, Schatz DA, Bundy B, Skyler JS, Greenbaum CJ, Writing Committee for the Type 1 Diabetes TrialNet Oral Insulin Study Group. Effect of Oral Insulin on Prevention of Diabetes in Relatives of Patients With Type 1 Diabetes: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*, 2017, 318(19), 1891-1902.

Kuhn C, Weiner HL. Therapeutic anti-CD3 monoclonal antibodies: from bench to bedside. *Immunotherapy*, 2016, 8(8), 889-906.

Lazar L, Ofan R, Weintrob N, Avron A, Tamir M, Elias D, Phillip M, Josefsberg Z. Heat-shock protein peptide DiaPep277 treatment in children with newly diagnosed type 1 diabetes: a randomised, double-blind phase II study. *Diabetes Metab Res Rev*. 2007, 23(4), 286-91.

Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther*, 2017, 2, 17023.

Long D, Chen Y, Wu H, Zhao M, Lu Q. Clinical significance and immunobiology of IL-21 in autoimmunity. *J Autoimmun.* 2019, 99, 1-14.

Lopez M, Clarkson MR, Albin M, Sayegh MH, Najafian N. A Novel Mechanism of Action for Anti-Thymocyte Globulin: Induction of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Regulatory T Cells. *JASN*, 2006, 17(10), 2844-2853.

Lu J, Liu J, Li L, Lan Y, Liang Y. Cytokines in type 1 diabetes: mechanisms of action and immunotherapeutic targets. *Clin Transl Immunology*, 2020, 9(3), e1122.

Ludvigsson J, Faresjö M, Hjorth M, Axelsson S, Chéramy M i sur. GAD Treatment and Insulin Secretion in Recent-Onset Type 1 Diabetes. *NEJM*, 2008, 359, 1909-1920.

Ludvigsson J, Sumnik Z, Pelikanova T, Nattero Chavez L, Lundberg E, Rica I, Martínez-Brocca MA, Ruiz de Adana M, Wahlberg J, Katsarou A, Hanas R, Hernandez C, Clemente León M, Gómez-Gila A, Lind M, Lozano MF, Sas T, Samuelsson U, Pruhova S, Dietrich F, Puente Marin S, Nordlund A, Hannelius U, Casas R. Intralymphatic Glutamic Acid Decarboxylase With Vitamin D Supplementation in Recent-Onset Type 1 Diabetes: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Phase Iib Trial. *Diabetes Care*, 2021, 44(7), 1604-1612.

Marcovecchio ML, Wicker LS, Dunger DB i sur. Interleukin-2 Therapy of Autoimmunity in Diabetes (ITAD): a phase 2, multicentre, double-blind, randomized, placebo-controlled trial [version 1; peer review: 2 approved]. *Wellcome Open Res*, 2020, 5, 49.

Marek- Trzonkowska N, Mysliwiec M, Dobyszek A, Grabowska M, Techmanska I i sur. Administration of CD4⁺CD25^{high}CD127⁻ regulatory T cells preserves β -cell function in type 1 diabetes in children. *Diabetes Care*, 2012, 35(9), 1817-1820.

Mastrandrea L, Yu J, Behrens T, Buchlis J, Albin C, Fournier S, Quattrin T. Etanercept treatment in children with new-onset type 1 diabetes: pilot randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Diabetes Care*, 2009,32(7),1244-1249.

Mazumdar S, Greenwald D. Golimumab. *MAbs*. 2009, 1(5), 422-431.

Moin ASM, Nandakumar M, Diane A, Dehbi M, Butler AE. The Role of Heat Shock Proteins in Type 1 Diabetes. *Front Immunol*, 2021, 11, 612584.

Molta T. Etanercept. U: Biologics in General Medicine. Wolf-Henning B, Heinfried RH, urednici, Heidelberg, Springer Berlin, 2007, str. 32-41.

Moran A, Bundy B, Becker DJ, DiMeglio LA, Gitelman SE, Goland R. Interleukin-1 antagonism in type 1 diabetes of recent onset: two multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trials. *Lancet*, 2013, 381(9881), 1905-1915.

Morales AE, Thrailkill KM. GAD-alum immunotherapy in Type 1 diabetes mellitus. *Immunotherapy*, 2011, 3(3), 323-232.

Nicholas D, Odumosu O, Langridge WH. Autoantigen based vaccines for type 1 diabetes. *Discov Med*, 2011, 11(59), 293-301.

Nolte Kennedy MS. Pancreatic Hormones & Antidiabetic Drugs. U: Basic & Clinical Pharmacology. Frassetto D, D'Annunci Henriquez R, urednice, New York, The McGraw-Hill, 2012, str. 747-752, 760.

Ono M, Horita S, Sato Y, Nomura Y, Iwata S, Nomura N. Structural basis for tumor necrosis factor blockade with the therapeutic antibody golimumab. *Protein Sci*. 2018, 27(6), 1038-1046.

Orban T, Bundy B, Becker DJ, DiMeglio LA, Gitelman SE, Goland R, Gottlieb PA. Costimulation modulation with abatacept in patients with recent-onset type 1 diabetes: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2011, 378 (9789), 412–419.

Orban, T., Bundy, B., Becker, D. J., Dimeglio, L. A., Gitelman, S. E., Goland, R., Gottlieb, PA. Costimulation modulation with abatacept in patients with recent-onset type 1 diabetes: follow-up 1 year after cessation of treatment. *Diabetes care*, 2014, 37(4), 1069–1075.

Pavlasova G, Mraz M. The regulation and function of CD20: an “enigma” of B-cell biology and targeted therapy. *Haematologica*, 2020, 105(6), 1494-1506.

Pescovitz MD, Greenbaum CJ, Krause-Steinrauf H, Becker DJ, Gitelman SE, Goland R, Gottlieb PA, Marks JB, McGee PF, Moran AM, Raskin P, Rodriguez H, Schatz DA, Wherrett D, Wilson DM, Lachin JM, Skyler JS; Type 1 Diabetes TrialNet Anti-CD20 Study Group. Rituximab, B-lymphocyte depletion, and preservation of beta-cell function. *N Engl J Med*, 2009, 361(22), 2143-52.

Qiao YC, Chen YL, Pan YH, Tian F, Xu Y, Zhang XX, Zhao HL. The change of serum tumor necrosis factor alpha in patients with type 1 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 2017,12(4), e0176157.

Quattrin T, Haller MJ, Steck AK, Felner EI, Li Y, Xia Y, Leu JH, Zoka R, Hedrick JA, Rigby MR, Vercruyse F; T1GER Study Investigators. Golumumab and Beta-Cell Function in Youth with New-Onset Type 1 Diabetes. *N Engl J Med*, 2020, 383(21), 2007-2017.

Raz I, Elias D, Avron A, Tamir M, Metzger M, Cohen IR. Beta-cell function in new-onset type 1 diabetes and immunomodulation with a heat-shock protein peptide (DiaPep277): a randomised, double-blind, phase II trial. *Lancet*, 2001, 358(9295), 1749-1753.

Raz I, Ziegler AG, Linn T, Scherthaner G, Bonnici F, Distiller LA, Giordano C, Giorgino F, de Vries L, Mauricio D, Procházka V, Wainstein J, Elias D, Avron A, Tamir M, Eren R, Peled D, Dagan S, Cohen IR, Pozzilli P; DIA-AID 1 Writing Group. Treatment of recent-onset type 1 diabetic patients with DiaPep277: results of a double-blind, placebo-controlled, randomized phase 3 trial. *Diabetes Care*, 2014, 37(5), 1392-400.

Recent-Onset Type 1 Diabetes Trial Evaluating Efficacy and Safety of Teplizumab (PROTECT), 2019, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03875729> pristupljeno 21.05.2022.

Richardson N, Wraith DC. Advancement of antigen-specific immunotherapy: knowledge transfer between allergy and autoimmunity. *Immunotherapy Advances*, 2021, 1(1), 1-16.

Rigby MR, Harris KM, Pinckney A, DiMeglio LA, Rendell MS, Felner EI, Dostou JM, Gitelman SE, Griffin KJ, Tsalikian E, Gottlieb PA, Greenbaum CJ, Sherry NA, Moore WV, Monzavi R, Willi SM, Raskin P, Keyes-Elstein L, Long SA, Kanaparthi S, Lim N, Phippard D, Soppe CL, Fitzgibbon ML, McNamara J, Nepom GT, Ehlers MR. Alefacept provides sustained clinical and immunological effects in new-onset type 1 diabetes patients. *J Clin Invest*, 2015, 125(8), 3285-96.

Rowshanravan B, Halliday N, Sansom DM. CTLA-4: a moving target in immunotherapy. *Blood*, 2018, 131(1), 58-67.

Selewski DT, Shah GV, Mody RJ, Rajdev PA, Mukherji SK. Rituximab (Rituxan). *AJNR*, 2010, 31(7), 1178-80.

Sharman JP. Targeting CD20: teaching an old dog new tricks. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2019, 2019(1), 273-278.

Senti G, Kündig TM. Intralymphatic immunotherapy. *World Allergy Organ J*, 2015, 8(1),9.

Štraus B, Petlevski R. Ugljikohidrati. U: Štrausova medicinska biokemija. Čvorišćec D, Čepelak I, urednice, Zagreb, Medicinska naklada, 2009, str. 113-117.

Thymoglobulin May Suppress the Immune Response Through Multiple Pathways, 2020, <https://www.thymoglobulin.com/about>, pristupljeno 21.05.2022.

Type 1 Diabetes: Diagnosis and Management of Type 1 Diabetes in Children and Young People, 2004., <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK57180/?report=reader>, pristupljeno 21.05.2022.

Van Belle TL, Coppieters KT, von Herrath MG. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiol Rev*, 2011, 91(1), 79-118.

Visperas A, Vignali DA. Are Regulatory T Cells Defective in Type 1 Diabetes and Can We Fix Them? *J Immunol*, 2016, 197(10), 3762-3770.

Von Herrath M, Bain SC, Bode B, Clausen JO, Coppieters K i sur. Anti-interleukin-21 antibody and liraglutide for the preservation of β -cell function in adults with recent-onset type 1 diabetes: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Diabetes Endocrinol.*, 2021, 9(4), 212-224.

Vučić Lovrenčić M. Laboratorijska dijagnostika šećerne bolesti: znamo li sve o glukozi? U: Uloga laboratorija u dijagnostici i praćenju šećerne bolesti. Vučić Lovrenčić M, urednica, Zagreb, Medicinska naklada, 2011, str. 21 i 22.

Warshauer JT, Bluestone JA, Anderson MS. New Frontiers in the Treatment of Type 1 Diabetes. *Cell Metab*, 2020, 31(1), 46-61.

Wherrett DK, Bundy B, Becker DJ, DiMeglio LA, Gitelman SE, Goland R. Antigen-based therapy with glutamic acid decarboxylase (GAD) vaccine in patients with recent-onset type 1 diabetes: a randomised double-blind trial. *Lancet (London, England)*, 2011, 378(9788), 319–327.

Yehualashet AS. Toll-like Receptors as a Potential Drug Target for Diabetes Mellitus and Diabetes-associated Complications. *Diabetes Metab Syndr Obes.*, 2020, 13, 4763-4777.

Zahran AM, Elsayh KI, Metwalley KA. Regulatory T cells in children with recently diagnosed type 1 diabetes. *Indian J Endocrinol Metab*, 2012, 16(6), 952-957.

Zhang L, Nakayama M, Eisenbarth GS. Insulin as an autoantigen in NOD/human diabetes. *Curr. Opin. Immunol*, 2008, 20(1), 111-118.

Zhong J, Xu JF, Yang P, Liang Y, Wang CY. Innate Immunity in the Recognition of β -Cell Antigens in Type 1 Diabetes. U: Type 1 Diabetes - Pathogenesis, Genetics and Immunotherapy. Wagner D, urednik, London, IntechOpen, 2011.

8. SAŽETAK/ SUMMARY

Sažetak

Dijabetes tipa 1 (DT1) je autoimuna endokrinološka bolest koja nastaje kao posljedica uništenja β stanica gušterače koje proizvode hormon inzulin. Uzrokom razvoja DT1 smatra se kombinacija okolišnih i genetskih čimbenika koji dovode do autoimunosti posredovane u najvećoj mjeri autoreaktivnim T limfocitima. Trenutna terapija DT1 nadomjescima inzulina liječi posljedicu bolesti bez ostvarivanja učinka na očuvanje β stanica. Imunoterapija bi usmjeravanjem prema različitim sastavnicama imunosnog sustava mogla djelovati direktno na uzrok DT1. Najveći potencijal u održavanju remisije DT1 pokazuju teplizumab, alefacept i antitimocitni globulini, a djelovanje sva tri imunoterapijska pristupa usmjereno je prema sprječavanju aktivacije T limfocita. Unatoč pozitivnim rezultatima trenutno ni jedan oblik imunoterapije nije odobren za liječenje DT1.

Summary

Diabetes type 1 (DT1) is an autoimmune endocrine disease that results from the destruction of insulin producing pancreatic β cells. The cause of DT1 development is considered to be a combination of environmental and genetic factors that lead to autoimmunity mediated mostly by autoreactive T lymphocytes. Current DT1 insulin replacement therapy treats the consequences of the disease without having an effect on β cell preservation. Immunotherapy, by targeting different components of the immune system, could act directly on the cause of DT1. Teplizumab, alefacept and antithymocyte globulins show the greatest potential in maintaining DT1 remission, and the action of all three immunotherapeutic approaches is aimed at preventing T lymphocyte activation. Despite the positive results, currently no form of immunotherapy is approved for the treatment of DT1.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Medicinska biokemija
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju
Samostalni kolegij: Opća klinička biokemija
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

IMUNOTERAPIJA DIJABETESA TIPA 1

Katarina Lalić

SAŽETAK

Dijabetes tipa 1 (DT1) je autoimuna endokrinološka bolest koja nastaje kao posljedica uništenja β stanica gušterače koje proizvode hormon inzulin. Uzrokom razvoja DT1 smatra se kombinacija okolišnih i genetskih čimbenika koji dovode do autoimunosti posredovane u najvećoj mjeri autoreaktivnim T limfocitima. Trenutna terapija DT1 nadomjescima inzulina liječi posljedicu bolesti bez ostvarivanja učinka na očuvanje β stanica. Imunoterapija bi usmjeravanjem prema različitim sastavnicama imunosnog sustava mogla djelovati direktno na uzrok DT1. Najveći potencijal u održavanju remisije DT1 pokazuju teplizumab, alefacept i antitimocitni globulini, a djelovanje sva tri imunoterapijska pristupa usmjereno je prema sprječavanju aktivacije T limfocita. Unatoč pozitivnim rezultatima trenutno ni jedan oblik imunoterapije nije odobren za liječenje DT1.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 46 stranica, 2 grafička prikaza, 16 tablica i 81 literaturni navod. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: dijabetes tipa 1, imunoterapija

Mentor: **Dr. sc. Roberta Petlevski**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Roberta Petlevski**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Donatella Verbanac, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Lidija Bach-Rojecky, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: Lipanj 2022.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Medical Biochemistry
Department of Medical Biochemistry and Hematology
Independent course: General Clinical Biochemistry
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

IMMUNOTHERAPY OF DIABETES TYPE 1

Katarina Lalić

SUMMARY

Diabetes type 1 (DT1) is an autoimmune endocrine disease that results from the destruction of insulin producing pancreatic β cells. The cause of DT1 development is considered to be a combination of environmental and genetic factors that lead to autoimmunity mediated mostly by autoreactive T lymphocytes. Current DT1 insulin replacement therapy treats the consequences of the disease without having an effect on β cell preservation. Immunotherapy, by targeting different components of the immune system, could act directly on the cause of DT1. Teplizumab, alefacept and antithymocyte globulins show the greatest potential in maintaining DT1 remission, and the action of all three immunotherapeutic approaches is aimed at preventing T lymphocyte activation. Despite the positive results, currently no form of immunotherapy is approved for the treatment of DT1.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 46 pages, 2 figures, 16 tables and 81 references. Original is in Croatian language.

Keywords: diabetes type 1, immunotherapy

Mentor: **Roberta Petlevski, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Roberta Petlevski, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Donatella Verbanac, Ph.D. *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Lidija Bach-Rojecky, Ph.D. *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June 2022.