



Orális inzulin vakcina fejlesztése az I-es típusú diabétesz kialakulásának megelőzésére gyermekekben

1. számú részfeladat

Debreceni Egyetem

GINOP-2.3.4-15-2016-00002

Készítette:

Auxiliis Pharma Kft.

1037 Budapest, Bokor u. 15-21.



Orális inzulin vakcina fejlesztése az I-es típusú diabétesz kialakulásának megelőzésére gyermekekben

Preklinikai fejlesztési terv

Debreceni Egyetem

GINOP-2.3.4-15-2016-00002

Orális inzulin készítménnyel rendelkezésre álló preklinikai és klinikai adatok áttekintése, összefoglalása szakirodalmi adatok, illetve korábban hasonló készítménnyel végzett vizsgálatokról hozzáférhető klinikai vizsgálati jelentések alapján

1. Egyes típusú diabétesz

1.1. Egyes típusú diabétesz gyakorisága

Az egyes típusú diabetes mellitus (továbbiakban T1DM) az egyik leggyakoribb, gyermekkorban előforduló hormonális és anyagcsere megbetegedés. A betegség fő jellemzőjét, emelkedett vércukor szintet a hasnyálmirigy Langerhans szigeteiben lévő, inzulin termelő β sejtek a pusztulása okozza [1]. Az esetek túlnyomó többségében a β sejtek pusztulását és funkciócsökkenését a β sejtek elleni autoimmun folyamat eredményezi. A betegek kis részében a β sejtek pusztulásának oka nem ismert [2]. A T1DM gyakorisága világszerte évi 2-3 %-kal növekszik, az 5 év alatti kórcsoportban a növekedés még gyorsabb [3]. A T1DM betegek száma a világban elérheti az 30 milliót [4]. Az 1. Ábra a gyermekkori T1DM incidenciáját és prevalenciáját szemlélteti világszerte.

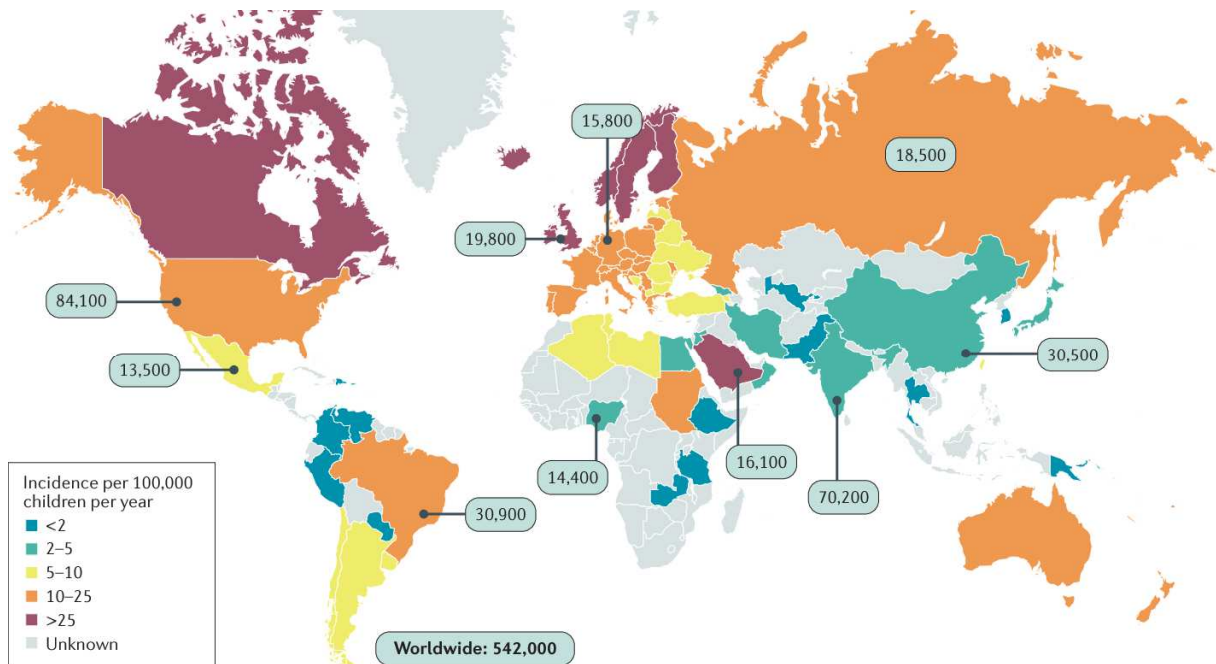
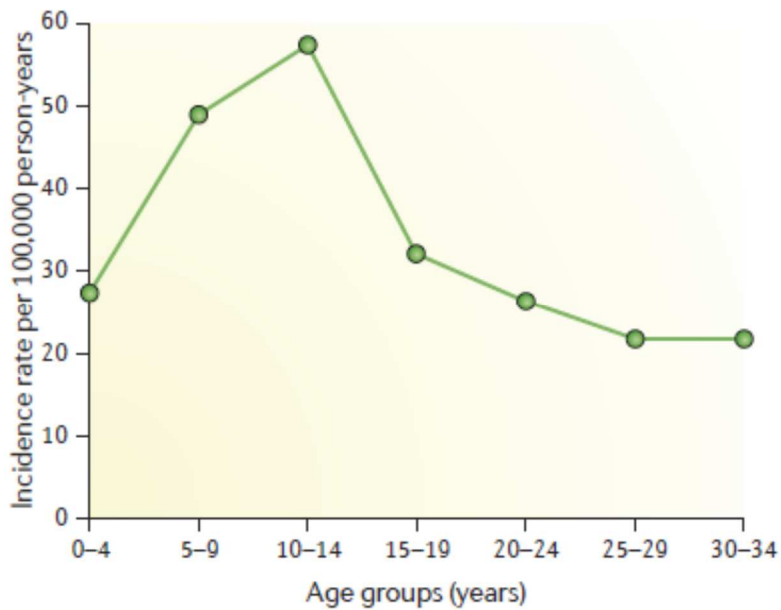


Figure 2 | The incidence and prevalence of T1DM in children. The estimated number of new cases of type 1

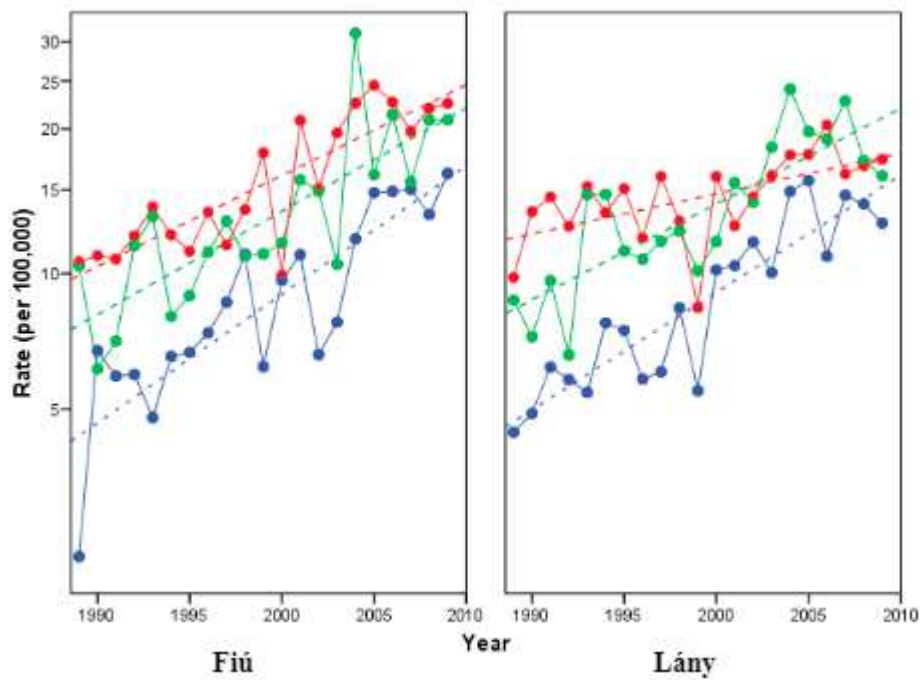
1. Ábra. A gyermekkori (15 éves korig) diabétesz incidenciája (/100.000) és prevalenciája (<http://www.diabetesatlas.org>).

A T1DM tünetei leggyakrabban 12-14 éves korban jelentkeznek (2. Ábra), de az 5 évnél fiatalabb betegek aránya az átlagnál gyorsabban növekszik [5].



2. Ábra. T1DM kor szerinti incidenciája Svédországban.

Magyarország a közepes rizikójú országok közé sorolható, de az elmúlt 20 évben az incidencia megháromszorozódott (3. Ábra). Ugyancsak emelkedő incidencia adatokat regisztráltak nyugat- és észak-európai országokban, valamint Észak-Amerikában is.



2. Ábra. Korcsoport specifikus incidencia változása fiúkban és lányokban Magyarországon, az 1989-2009 közti években. (0-4 év kék; 5-9 év zöld; 10-14 év piros) (dr. Gyűrűs Éva

A T1DM előfordulási gyakorisága a pubertás előtt lányokban és fiúkban hasonló, a pubertás után lányokban a betegség előfordulás jelentősen csökken. Húsz éves kor felett a T1DM megjelenése már kétszer gyakoribb fiúkban [5]. Eredetileg a T1DM mint gyermekkori megbetegedést ismerték fel, de a megbetegedés előfordulhat bármely korban, a T1DM esetek mintegy 50%-a felnőtt korban jelenik meg [6]. Legutóbbi időkben az immune checkpoint gátló szer kezelésekhez (anti-cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4 és anti-programmed cell death-1) kapcsolódóan figyelték meg indukált T1DM kialakulását [7].

2. T1DM patomechanizmusa

2.1. A T1DM kialakulásához több tényező járul hozzá.

2.1.1. Genetikai hajlam

Az T1DM iránti genetikai hajlamot számos gén befolyásolja. Az úgynevezett GWAS (Genome-Wide Association Studies) vizsgálatok több mint 50, nem-HLA genetikai faktort azonosítottak, ami hozzájárul a T1DM rizikójához [8], de összességében kisebb jelentőségűek, mint a HLA-DR-DQ haplotípus. Egypetéjű ikrekben T1DM konkordanciája 60%, ami arra utal, hogy környezeti faktorok is fontos szerepet játszanak a betegség kialakulásában [9].

A genetikai hajlam 50%-ban a HLA régióhoz kapcsolódik [10]. A HLA II haplotípus mind csökkentheti, mind fokozhatja a T1DM gyakoriságát, így például a HLA-DRB1*04:03 protektív, míg a , HLA-DRB1*04:01 és HLA-DRB1*04:05 haplotípusok fokozzák a betegség iránti érzékenységet [11]. Ismeretes, hogy a HLA-DR4-DQ8 és HLA-DR3-DQ2 haplotípusok a fokozott T1DM rizikó mellett fokozzák a β sejteket támadó autoantitestek megjelenésének valószínűségét is [12]. Feltételezik, hogy a HLA polimorfizmus befolyásolja a tolerancia folyamatát a timuszban és hozzájárul, hogy β -sejt antigénekre reagáló T sejtek eliminációja, vagy a β -sejt specifikus Treg sejtek képzése hibásan történik meg [13].

Az autoimmunitás gyakori megbetegedés az USA-ban minden 15. embert érint szisztémás vagy szerv specifikus autoimmun károsodás [14].

2.1.2. Korai környezeti provokáló hatások

A korai környezeti hatások közé azok az ágensek tartoznak, amelyek az élet korai szakaszában - akár már a magzati korban vagy közvetlenül a megszületés után - érik a szervezetet. Ezek valószínűleg az autoimmun folyamat elindításában játszanak szerepet.

Ide tartoznak:

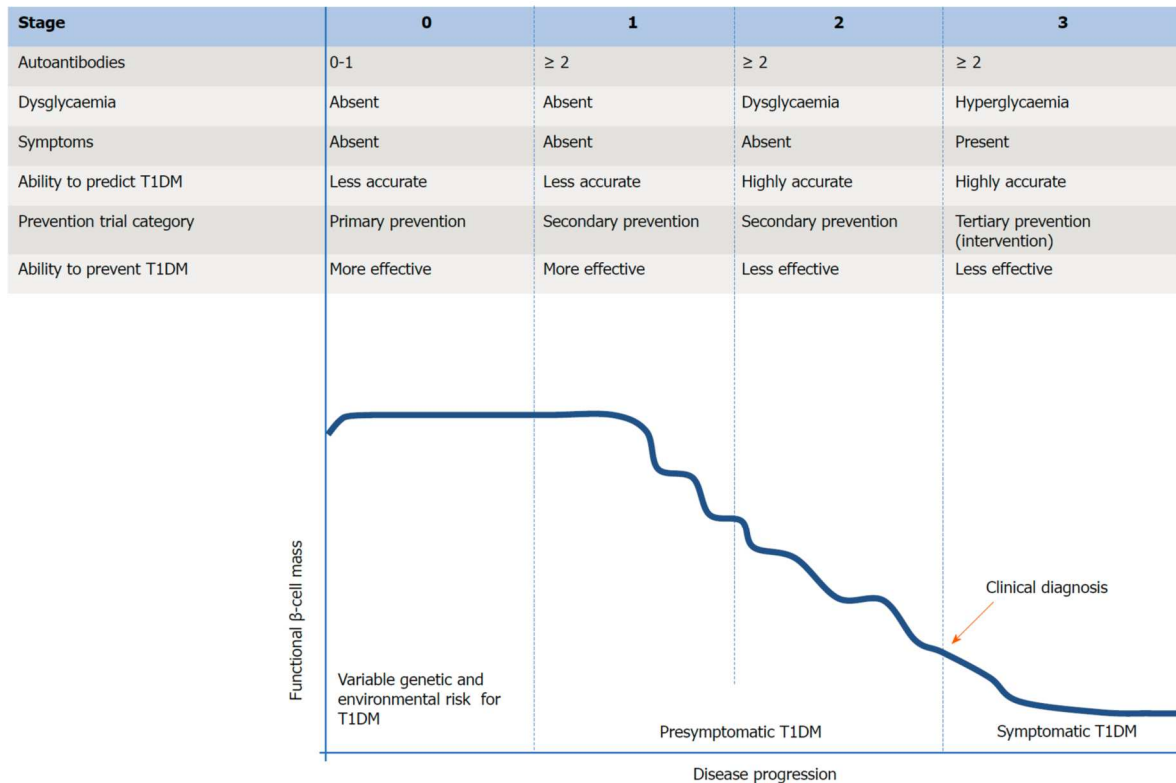
- az anya terhesség alatti vírusfertőzései (rózsahimlő, echo vírusok, Coxsackie B5 vírus)[15]
- az anya étkezési szokásai a terhesség alatt, a csecsemő táplálása [16]
- terhesség alatti, születés körüli tényezők, úgy, mint légzészavar, sárgaság, újszülöttkori fertőzések, magasabb anyai életkor [17]
- anyatejes táplálás hiánya, D-vitamin adagolás elmaradása, védőoltások

2.1.3. Autoimmun folyamat

Ez akár egy több éven keresztül zajló szakasz, melynek során a működő inzulintermelő béta-sejt állomány fokozatosan elpusztul a szervezeten belül zajló autoimmun folyamat hatására. Néhány esetben, amikor a cukorbetegség a korai gyermekkorban vagy csecsemőkorban kezdődik, ez a folyamat felgyorsul és időtartalma néhány hónapra korlátozódik. A beteg kora a betegség kialakulásakor általában is kihat a betegség lefolyására (6. Ábra).

2.2. A T1DM kialakulásának az alábbi fázisait különböztetjük meg:

Korai pre-diabétesz: Az autoimmun folyamat megindulásakor megjelenik a beteg vérében az első autoantitest. A prediabétesz állapotában az egyének még tünet- és panaszmentesek, csak laboratóriumi eltéréseik vannak. Korai autoimmun folyamat nem mindig vezet diabéteszhez. Ebben a szakaszban stagnálhat a beteg állapota és akár teljesen le is állhat a folyamat. Egészséges, később diabéteszessé nem váló egyének vérében is megjelenhet átmeneti autoantitest pozitívitás. Az először megjelenő β -sejt reaktív antitest az inzulin és a glutamic acid decarboxylase 65 (GAD65) elleni antitest [12]. Az antitestek megjelenése a 1-2 éves korban csúcsosodik. Később jelennek meg a protein tirozin foszfatáz-like fehérjék, IA-2 és a IA-2 β valamint a Hsp60, ZNT8 és tetraspanin-7 elleni antitestek [18]. Több autoantitest megjelenése jelentősen fokozza a klinikai tünetek megjelenésének valószínűségét (4. Ábra) [19]. Az autoantitestek biomarker jelentőséggel bírnak, de rendelkezhetnek oki szereppel is a T1DM patomechanizmusában.



3. Ábra. A β -sejtek elleni antitestek száma összefügg a diabétesz megjelenési idővel és a β -sejt funkcióval [20, 21].

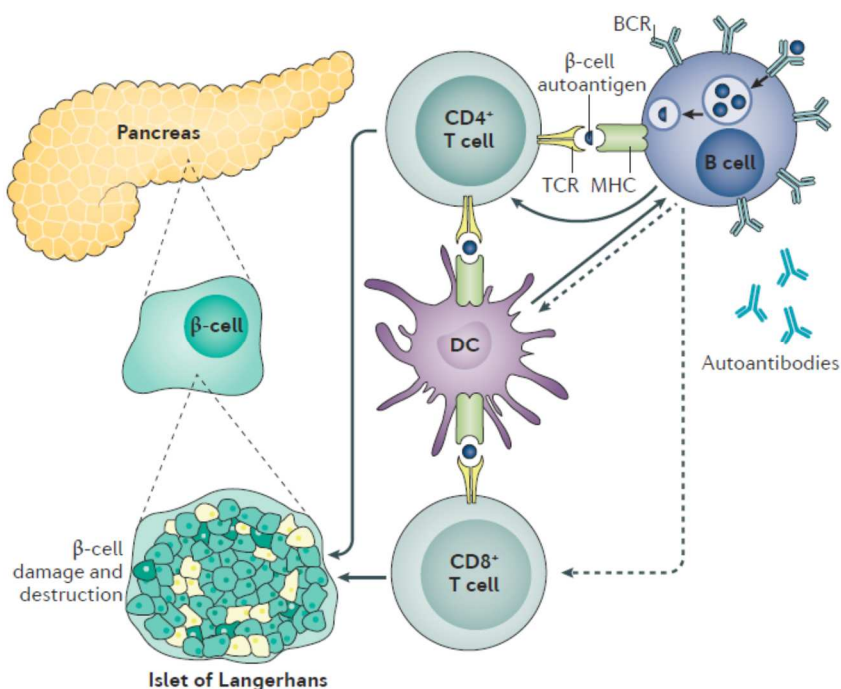
Előrehaladott pre-diabétesz: Jelezve az autoimmun folyamat előrehaladását - és visszafordíthatatlanná válását- ebben a szakaszban már több autoantitest is megjelenik. Ezek lehetnek:

- IAA: inzulin-autoantitest
- ICA: szigetsejt ellenes autoantitest
- GADA: glutaminsav-dekarboxiláz ellenes antitest
- IA-2 és a IA-2 β valamint Hsp60, ZNT8, tetraspanin-7 elleni antitestek

Az autoantitest termelés közvetlen kiváltó oka nem pontosan ismert, nélkülözhetetlen előfeltétele a dendritikus sejtek általi antigén prezentáció és B sejtek kölcsönhatása az antigén specifikus CD4+ és CD8+ T sejtekkel (5. Ábra) [22].

β -sejt autoantigénre specifikus CD4+ és CD8+ T sejtek megtalálhatóak már a betegség korai fázisában [23]. Újabb megfigyelések azt mutatják, hogy ezek a T sejtek főként posztranszlációsán módosított fehérjékre irányulnak, ami arra utal, hogy β -sejt ER stressz is szerepet játszhat a tolerancia megszűnésében [24]. Az antigén prezentáló sejtek a hasnyálmirigy nyirokcsomókba vándorolnak, ahol

kölcsönhatnak az autoreaktív CD4+ T limfocitákkal, amelyek kiváltják a CD8+ T sejtek aktiválódását. Az aktivált CD8+ T sejtek a Langerhans szigetekben elindítják az autoantigént kifejező β sejtek pusztulását. A β -sejt károsodás által kiváltott gyulladás ugyancsak hozzájárul a β -sejt pusztuláshoz. Az autoimmun folyamat nem teljesezhet ki a Treg sejtek működésének károsodása nélkül [25]. Az aktivált, autoraktív CD8+ T sejtek közvetlen citotoxikus hatással rendelkeznek, a CD4+ sejtek β -sejt károsító hatásukat citokin termelésen át, valamint a CD8+ T és B sejteken keresztül fejtik ki [26].



4. Ábra. Aktivált B sejtek együttműködnek CD4+ and CD8+T sejtekkel, valamint dendritikus sejtekkel.

A Langerhans sziget reaktív CD4+ és CD8+ T sejtjei megtalálhatók a T1DM betegek (de nem a kontroll) hasnyálmirigyében, a hasnyálmirigy nyirokcsomókban, valamint a betegek perifériás vérében is [25]. A T sejtek oki szerepét támasztja alá, hogy T1DM betegből transzplantált csontvelő fogékony egészséges egyénben T1DM-t válthat ki [27].

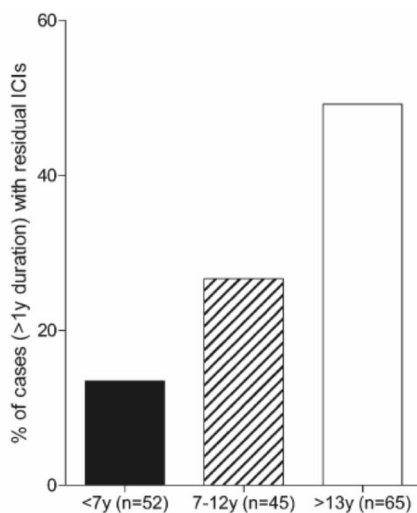
Késői prediabétesz: Bár még ez az állapot is teljesen tünetmentes, és a vércukorértékek is nagyrészt a normál tartományon belül vannak, de cukorterhelés során már csökkenő inzulin elválasztás mutatható ki.

2.3. Késői környezeti hatások

Környezeti hatások szerepet játszanak az autoimmun folyamat fenntartásában és a diabéteszes tünetek megjelenésének felgyorsításában. Hatásukat valószínűleg az inzulinigény fokozásán keresztül (pl. lázas fertőzés, növekedés) fejtik ki, amellyel a már károsodott inzulin elválasztás nem tud megbirkózni, így megjelennek a diabéteszes tünetek.

Késői környezeti hatás lehet:

- vírusfertőzések, pl. coxsackie B5, mumpsz, mononukleózis
- pubertáskori felgyorsult növekedés (az inzulinszükséglet fokozásával)
- meteorológiai tényezők (ősz-tavaszi szezonális)



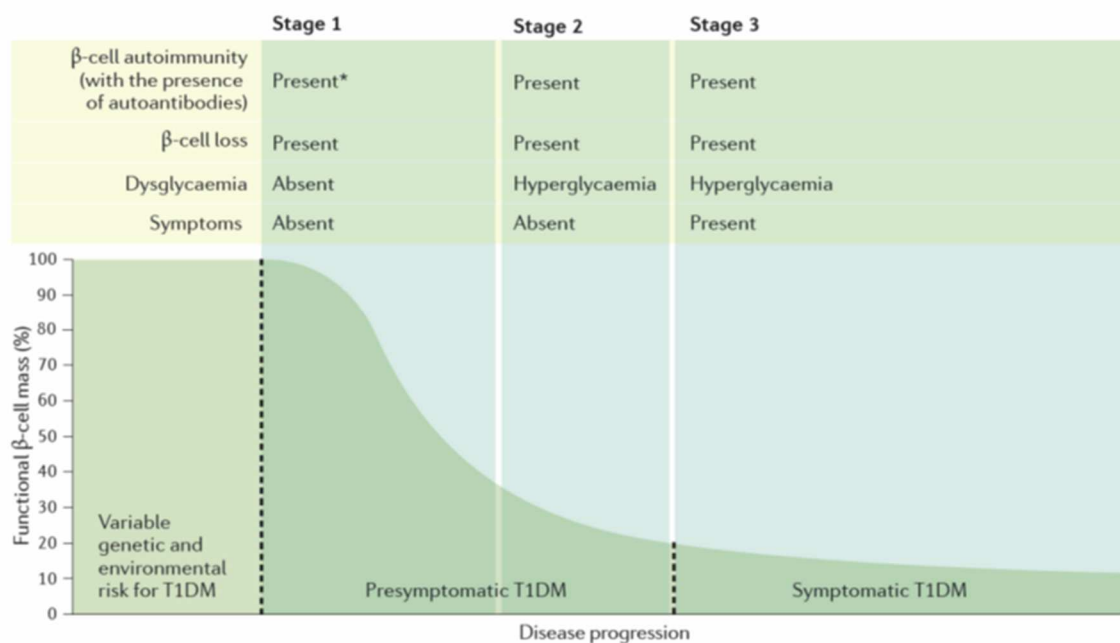
5. Ábra. A beteg kora a betegség megjelenésekor kihat a betegség lefolyására, később jelentkező diabétesz esetén magasabb a reziduális inzulint tartalmazó szigetek aránya (ICIS)[28]

2.4. T1DM klinikai megjelenése

Az inzulintermelő béta-sejtek nagy részének (80-90 %) károsodásakor alakulnak ki az 1-es típusú cukorbetegség klasszikus tünetei (szomjúság, nagyfokú vizeletürítés, jó étvágy melletti fogyás, gyengeség stb.). Az újonnan diagnosztizált 1-es típusú diabéteszes gyermekek jelentős hányada még ma is későn, súlyos, életveszélyes állapotban, diabéteszes ketoacidózissal (DKA) kerül felismerésre. A DKA továbbra is a halálozás, valamint a hospitalizáció leggyakoribb oka az 1-es típusú diabéteszes gyermekekben, továbbá kedvezőtlenül befolyásolja a hosszútávú anyagcsere helyzetet is. Jóllehet, néhány közlemény arról számolt be, hogy az elmúlt években javult az 1-es típusú diabétesz

prezentációs tüneteinek felismerése, továbbra sincs elegendő bizonyíték arra, hogy az évek folyamán a DKA prevalenciája csökkent, sőt az incidencia folyamatos emelkedése és a betegség fiatalabb életkor felé tolódása a ketoacidózissal szövődött esetek számának növekedését feltételezi.

A T1DM kialakulásának szakaszait és azok jellemzőit a 7. Ábra szemlélteti.



6. Ábra A T1DM progressiójának szakaszai és jellemzői [22]

A betegség késői szakaszában, sajnos még a legnagyobb odafigyelés és a leginkább kiegyensúlyozott vércukorszintet tartó gondozás mellett is kialakulhatnak:

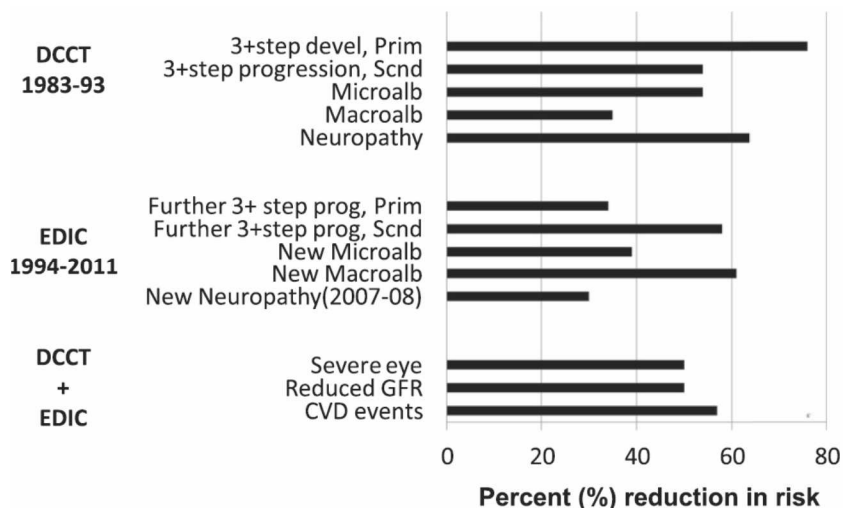
- Szív- és érrendszeri betegségek: coronaria sclerosis, szívinfarktus, stroke, perifériás atherosclerosis, magas vérnyomás. A cukorbeteg kb. háromnegyede valamilyen szív- és érrendszeri betegséggel kapcsolatos ok miatt hal meg.
- Idegkárosodás (neuropathia)
- Vesekárosodás (nephropathia)
- Szemkárosodás(diabéteszes retinopathia)

A betegpopuláció még Magyarországon is nagyszámú. A diabétesz és szövődményeinek kezelése hatalmas összegeket emészt fel évente. A betegség kialakulásának megelőzése és a betegek számának csökkentése óriási jelentőségű lehet.

2.5. 1TDM terápiája

A T1DM kezelése interdiszciplináris megközelítést igényel, az orvos, dietetikus, pszichológus, a beteg, szülők, és környezet együttműködése nélkülözhetetlen a sikerhez. A kezelés célja egészséges életmód mellett a hosszútávú glikémiás egyensúly megteremtése, a súlyos hipoglikémiás és hiperglikémiás ketoacidózis elkerülése [29]. Az új esetek mintegy 30%-ban még ma is diabéteszes ketoacidózis az első észlelt tünet, amely még ma is jelenthet halálos kockázatot (0.15–0.3%) [30]. Diabéteszes ketoacidózis azonnali, lehetőség szerint intenzív terápiás ellátást igényel, melynek célja a folyadék és elektrolit egyensúly rendezése egyidejű inzulin infúzió adásával.

A betegség harmadik stádiumától elengedhetetlen a folyamatos inzulin kezelés az endogén inzulin termelés súlyos elégtelensége miatt. A DCCT irányadó klinikai vizsgálata óta (The diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications study at 30 years: overview, [31]) a T1DM kezelés célja a glukóz érték normál értékhez lehető legközelebbi tartása a hipoglikémia elkerülése mellett. A DCCT vizsgálat kimutatta, hogy az intenzív glikémiás kontroll (HbA1c 7.2%) 35-76%-kal csökkentette a mikrovaszkuláris és 58%-al a makrovaszkuláris (passzív utánkötetés) szövődményeket (8. Ábra). Mindezek alapján az ADA gyermekeknél és 18 éves korig fiatal felnőtteknél 7.5% HbA1c célértéket javasol, míg egyes szervezetek ennél alacsonyabb 6,5-7% HbA1c célt támogatnak.



7. Ábra A DCCT vizsgálat fő megállapításai az intenzív glikémiás kontroll hatékonyságáról [31].

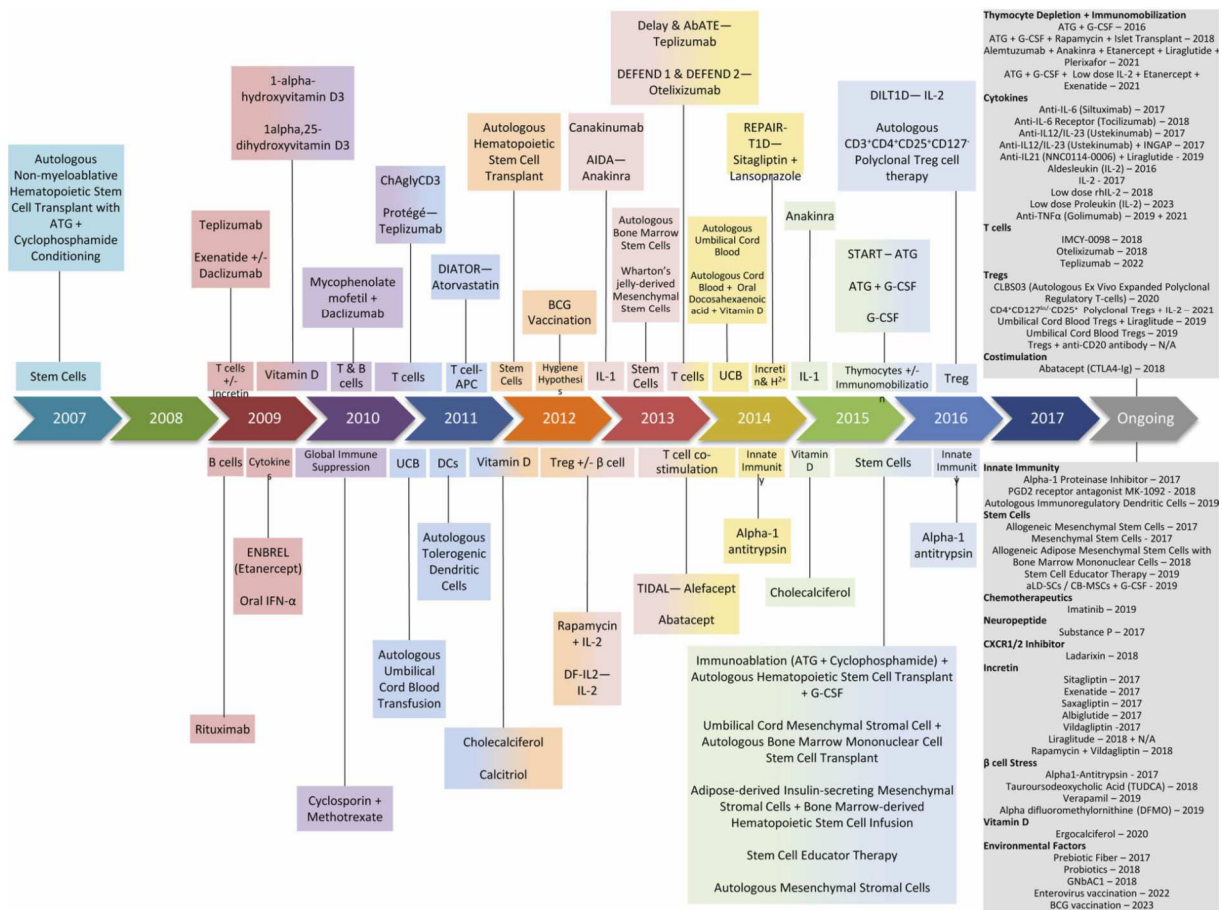
Az intenzív glikémiás kontroll fenntartása jelentős teher és kényelmetlenség a beteg számára a gyakori vércukorszint mérés inzulin injekciók miatt.

2.6. Immunológiai intervenció T1DM-ben

Az 1970-es évek közepe óta számos open, kontroll csoport nélküli vizsgálat célozta az autoimmun folyamat gátlásán keresztül a reziduális inzulin termelő β sejtek mennyiségének és inzulin termelő kapacitásának a megtartását, vagy növelését [32]. Az immunszuppresszióra épülő klinikai vizsgálatok (cyclosporin, azathioprine, monoclonal anti CD3 antitest, mycophenolate mofetil és daclizumab kombináció) ugyan mutattak eredményt, de a mellékhatások miatt felhagyták a legtöbb eredeti vegyület vizsgálatát [33-35], de újabb származékok vizsgálata folytatódik (9. Ábra).

2.6.1.1TDM Prevenció

Genetikai jegyek, elsősorban HLA tipizálása alapján a T1DM-re fokozott hajlamot mutatók egy része azonosítható, valamint az autoantitestek szűrése alapján a betegség korai fázisban levő, tüneteket még nem mutató betegek felismerhetők. A magas betegség hajlamot hordozó, vagy a betegség korai fázisában levő betegek azonosítása lehetőséget teremt a betegség megelőzésére. A 9. Ábra, a jelentősebb klinikai vizsgálatokat szemlélteti, amelyek az elmúlt évtizedben a β sejt elleni autoimmunitás modulálásán keresztül immun intervenciót és prevenciót céloztak T1DM-ben [36].



8. Ábra Terápiás szerek és célpontok immunológiai intervenció és prevenció céljára T1DM-ben [36].

2.6.2. Másodlagos prevenció

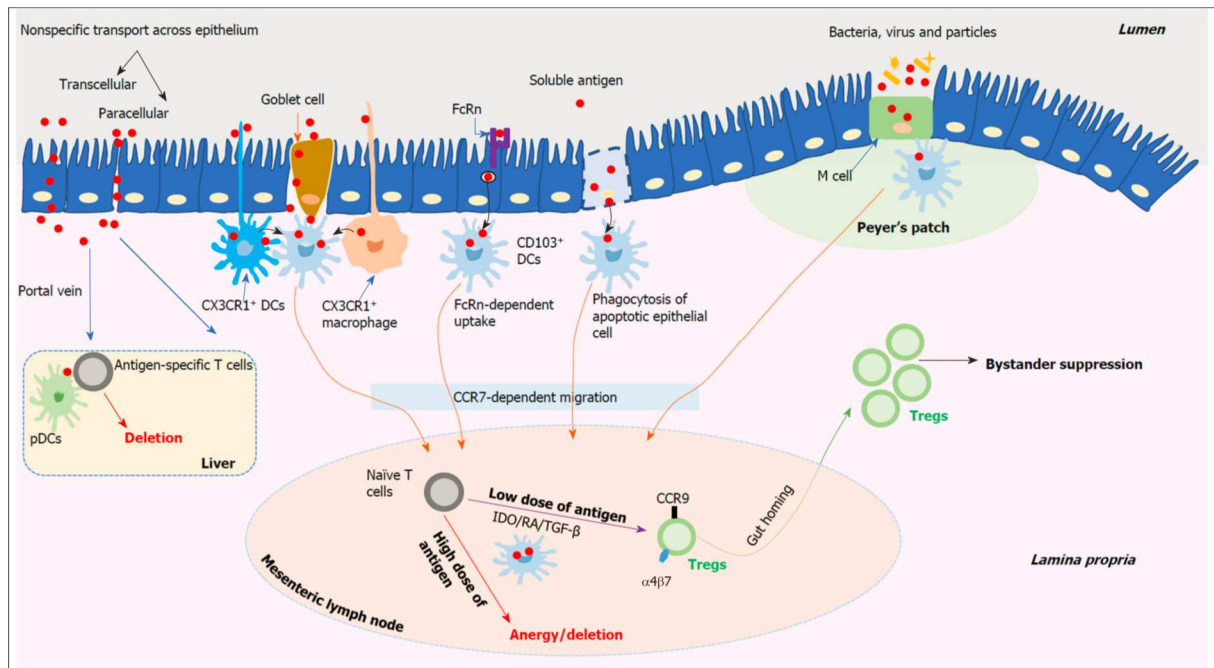
Egy vagy több β sejt elleni autoantitest megjelenése után, de még a klinikai tünetek megjelenése előtt indított, az autoimmun folyamat gátlását célzó kezelés. Több másodlagos prevenciót célzó, az utóbbi időben befejezett, vagy folyamatban levő klinikai vizsgálatok közül sorol fel jelentősebbeket az 1. táblázat. Újabb vizsgálatok kimutatták, hogy a T1DM-ben a β -sejt tömeg és a β -sejt funkció változása gyakran nem párhuzamos. Még egészen alacsony C-peptid szint mellett is jelentős mennyiségű β sejt található a betegek nagy hányadában [37]. Ez arra utal, hogy T1DM klinikai megjelenése nem jelent szükségszerűen megfordíthatatlan végállapotot az inzulin termelés tekintetében. A megmaradt β -sejtek nem működnek, lehet, hogy éppen abból a célból, hogy ne jelentsenek célpontot az autoimmun folyamatban [38].

Trial	Drug	Phase	n	Outcome	ClinicalTrials.gov identifier
<i>Completed studies</i>					
DPT-1 (REF. 227)	Subcutaneous insulin	III	339	No protective effect	NCT00004984
DPT-1	Oral insulin	III	400	No protective effect	NCT00419562
DIPP (REF. 228)	Intranasal insulin	III	264	No protective effect	NCT00223613
ENDIT (REF. 229)	Oral modified-release nicotinamide	III	552	No protective effect	Not applicable
<i>Ongoing studies</i>					
TN07	Oral insulin	III	400	Ongoing	NCT00419562
INIT II	Nasal insulin	II	110	Ongoing	NCT00336674
TN18	Intravenous abatacept	III	206	Ongoing	NCT01773707
TN10	Intravenous teplizumab	II	170	Ongoing	NCT01030861
DiAPREV-IT	Subcutaneous alum-GAD65	II	50	Ongoing	NCT01122446
DiAPREV-IT2	Subcutaneous alum-GAD65 and oral vitamin D	II	80	Ongoing	NCT02387164
Fr1da	Oral insulin	II	220	Ongoing	NCT02620072
TEFA	Gluten-free diet	II	60	Ongoing	NCT02605148

1. Táblázat . Nemrég befejezett és folyamatban levő prevenciós vizsgálatok T1DM-ben.

2.7. Inzulin használata tolerancia kiváltására T1DM-ben

A betegség kialakulásának megelőzésére az elmúlt néhány évben egy új eljárást kezdtek vizsgálni. Tekintettel a betegség autoimmun eredetére, az eljárás során arra tesznek kísérletet, hogy az allergiás megbetegedések analógiájára, mely szintén egy kóros immunválasz, mintegy deszenzitizálják a beteg szervezetét. Ennek során a veszélyeztetett gyermekek szervezetébe szájon át juttattak be inzulint (orális inzulin terápia) különböző mennyiségben. Az elsődleges klinikai vizsgálatok eredménye szerint a nagy dózisú orális inzulin bevitel inzulin-responzív és proinzulin-responzív szabályozó T sejtek indukcióját váltja ki, mely a betegség kialakulásának megelőzését eredményezheti [39]. A bélcsatornában kialakuló tolerancia alapvetően egy perifériás tolerancia, amelynek fontos adaptációs funkciója van, az exogén, bakteriális és táplálék antigénekre kialakuló immunreakció, gyulladás, és a bélhám védelme közti egyensúly kialakításában [40]. Az orális antigén emésztése, a fragmensek átjutása a bélhámon (10. Ábra) nagyban befolyásolja a kialakuló immunválaszt és toleranciát [41]. Mind a CX3CR1+ makrofágok, mind a dendritikus sejtek képesek mintát venni a lumen antigénjeiből a nyúlványaikkal a hám károsodása nélkül [42]. A goblet sejtek csatornái a vízdékony antigének, míg microfold sejtek a baktérium és vírus antigének felvételében játszanak szerepet. A bélből származó antigénekre adott válaszban alapvető szerepet játszik a bélhez kapcsolódó limfoid szövet (GALT, gut-associated lymphoid tissue). A tolerancia kialakulása antigén dózis függő, kis és nagy dózis is kiválthat toleranciát [43]. A tolerancia kialakulásáért felelős Treg sejtek többsége CD4+CD8+Foxp3+ T sejt. A nagy antigén dózis által kiváltott toleranciában szerepet játszik az antigén specifikus T sejt eliminációja [40] (10.Ábra).



9. Ábra. Az orális tolerancia kialakulásában résztvevő sejtek, mediátorok [21]. DCs: Dendritic cells; M cell: Microfold cell; CCR: CCchemokine receptor; pDCs: Plasmacytoid DCs; IDO: Indoleamine 2,3-dioxygenase; RA: Retinoic acid; TGF- β : Transforming growth factor-beta.

Az inzulinnal kiváltható T1DM megelőzés alapja, hogy az inzulin elleni autoantitest egyike a legkorábban megjelenő antitesteknek, még a T1DM tünetmentes szakaszában. Gyerekekben általában az IAA (insulin autoantibodies) az autoimmunitás első jele, míg fiatal felnőttekben, különösen, ha a DR3-DQ2 HLA haplotípust hordozzák, a GADA lehet az első autoantitest [44]. Az inzulin elleni autoimmunitás szorosan kapcsolódik a HLADR4-DQ8 haplotípushoz, ami egyúttal a T1DM legfőbb rizikófaktora is. Inzulin orális adása csökkentette a diabétesz megjelenését a T1DM állatmodelljében [45]. Az orális inzulin által eredményezett védelem antigén specifikus és nagy részben az inzulin-specifikus regulációs T sejtek indukálásán alapul [46]. A populáció nagy volumenű szűrése már lehetséges legalább négy gyakori T1DM-ben megjelenő autoantitestre [47] növekvő hatékonysággal, így a fokozott T1DM rizikónak kitett gyerekeket már a betegség megjelenése előtt azonosítani lehet.

2.8. Humán vizsgálatok inzulinnal kiváltott prevencióra T1DM-ban

Az első klinikai tanulmányt, melynek célja tolerancia kiváltása volt orális inzulinnal 2000-ben végezték [48]. A vizsgálatba 82 nemrég (<4 hét) azonosított diabéteszes beteget vontak be, a résztvevők átlagos életkora 14.8 év volt. A betegek az intenzív sc. inzulin terápia mellé napi 5 mg (144 U) orális inzulin

kezelést is kaptak egy éven keresztül. C peptid és HbA_{1c} szinteket három havonta monitorozták, valamint a betegek egy részében meghatározták az inzulin ellenes antitest szintet a vizsgálat elején, 3., 6. és 12. hónapokban.

A vizsgálatot 80 beteg fejezte be. Az orális inzulinnal és placeboval kezelt betegek közt egy év kezelés után nem volt különbség az inzulin igényben, HbA_{1c} értékben, valamint inzulin elleni antitest szintben.

Metabolic outcomes during follow-up

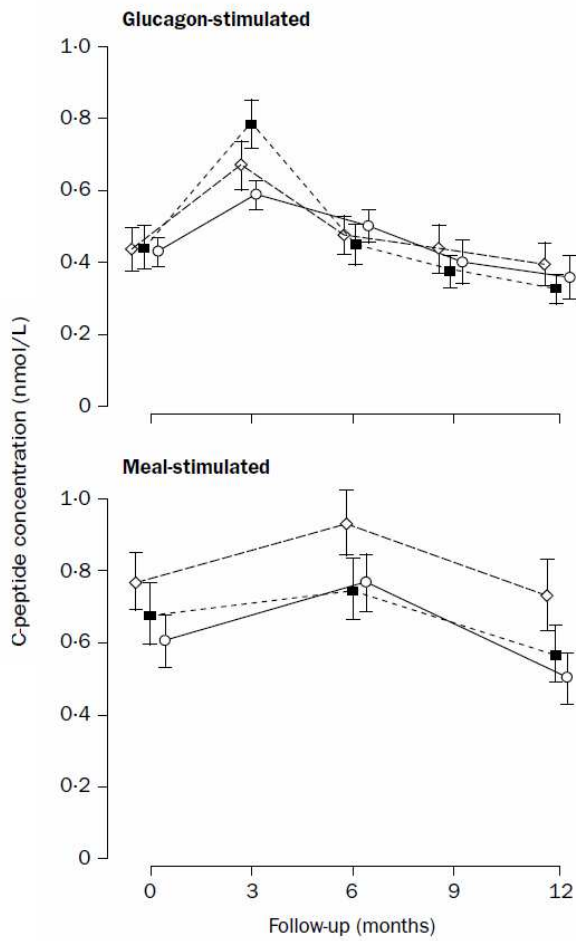
	Oral insulin	Placebo
Number of patients	44	36
Insulin dose (U/kg) ± SD		
3 months	0.44 ± 0.3	0.37 ± 0.2
6 months	0.48 ± 0.3	0.43 ± 0.2
9 months	0.54 ± 0.3	0.52 ± 0.3
12 months	0.61 ± 0.2	0.58 ± 0.3
Glycated haemoglobin (%) ± SD		
3 months	6.2 ± 1.8	5.8 ± 1.5
6 months	6.5 ± 1.5	6.3 ± 1.5
9 months	7.1 ± 1.6	7.1 ± 1.5
12 months	7.6 ± 1.3	7.1 ± 1.5
Basal C peptide (nmol/l) ± SD		
3 months	0.30 ± 0.2	0.30 ± 0.2
6 months	0.30 ± 0.2	0.30 ± 0.2
9 months	0.20 ± 0.2	0.25 ± 0.2
12 months	0.17 ± 0.2	0.22 ± 0.2

Values between the two groups are not statistically different for insulin dose, HbA_{1c}, C peptide concentration

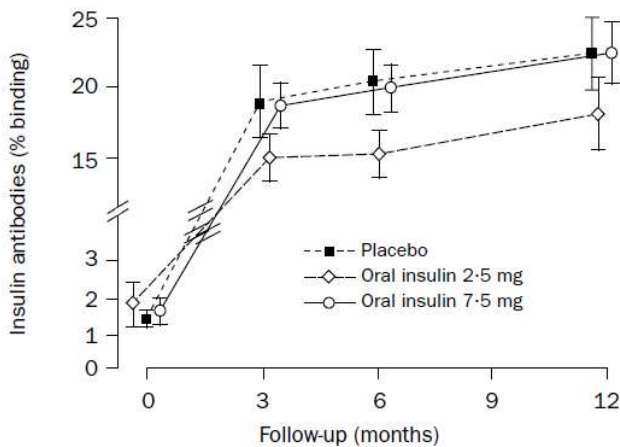
2. Táblázat. Metabolikus változások az orális inzulinnal és placeboval kezelt csoportokban

A napi 5 mg orálisan adott inzulin nem módosította a betegség lefolyását és nem befolyásolta humorális autoimmunitást a betegség első évében.

Egy másik, hasonló klinikai vizsgálatban 2,5 és 7,5 mg orális inzulin hatását vizsgálták ugyancsak egy éves kezelés során és megállapították, hogy az alkalmazott kezelés nem gátolta meg a β-sejt működés romlását [49].



10. Ábra. Glukagon és étkezés által stimulált C-peptid koncentráció (\pm SE.)([49])

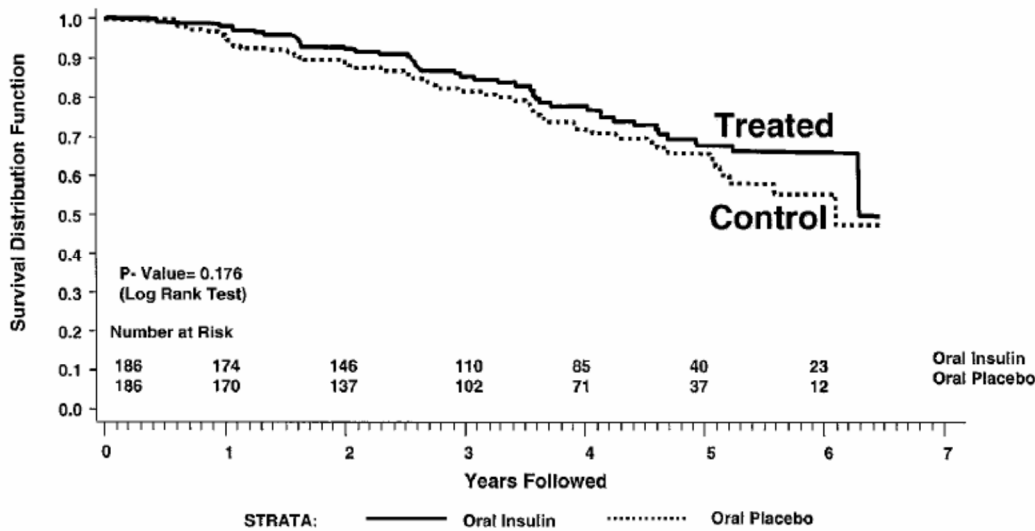


11. Ábra Inzulin elleni antitest szint változása a kezelés alatt (\pm SE) [49]

Egy további vizsgálat, amely 1 és 10 mg orális inzulin kezelés hatását vizsgálta ugyancsak negatív eredményt hozott [50].

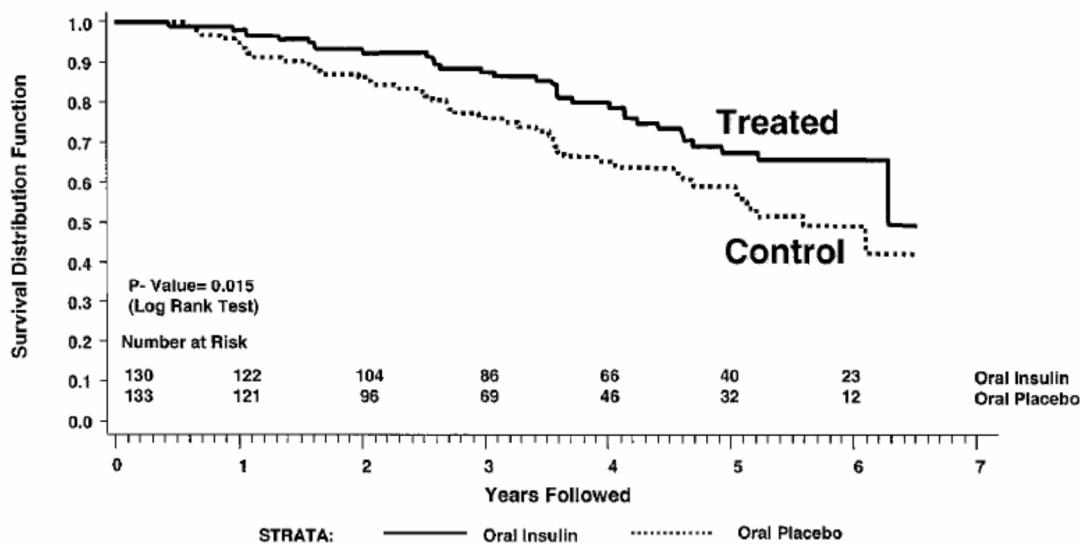
Az első valódi diabétesz prevenció vizsgálat autoantitest státusz, genetikai rizikó, immunológiai és metabolikus állapot alapján kiválasztott, a T1DM tüneteit még nem mutató önkénteseken folyt [51]. Az résztvevők napi 7.5 mg orális inzulin, illetve placebo kezelésben részesültek, a 6 év követési idő alatt.

Az orális inzulin kezelés mérsékelten csökkentette a diabétesz megjelenést



12. Ábra. Kaplan-Meier diagram a nem diabéteszes résztvevők arányát ábrázolja az idő függvényében. A csoportok statisztikai összehasonlítására log-rank tesztet használtak

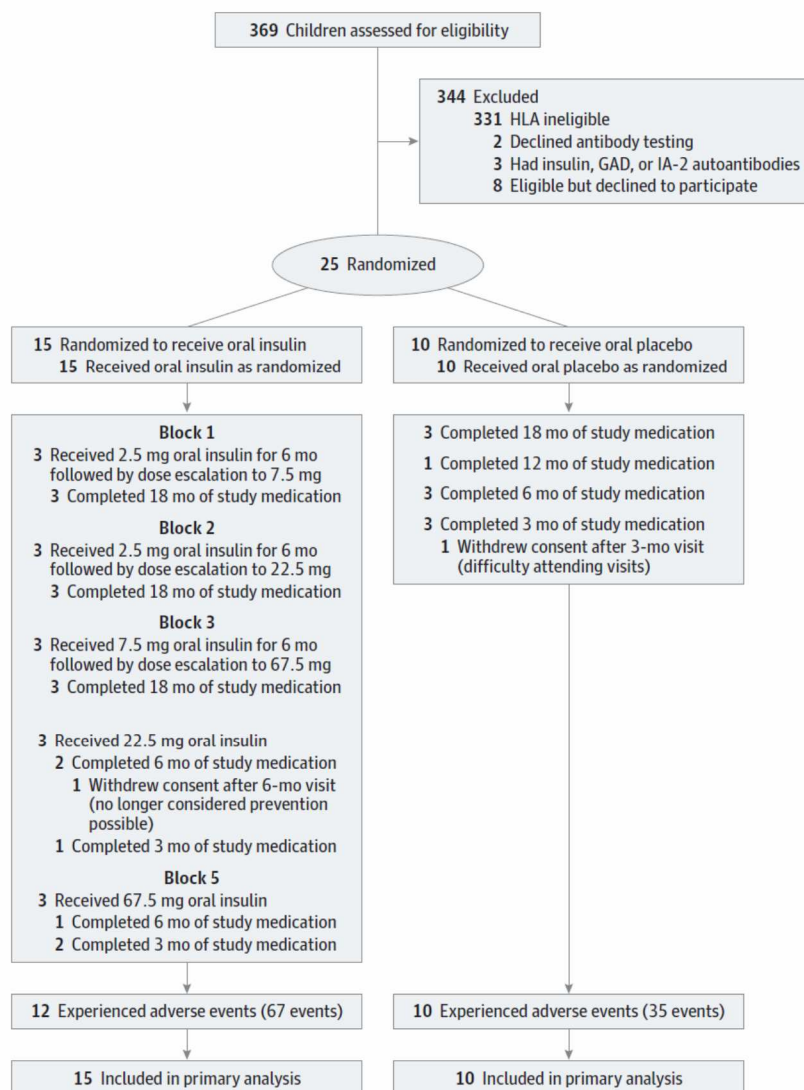
Azoknál a résztvevőknél, akiknél a kezdeti IAA érték > 80nU/ml az orális inzulin kezelés hatékonyabb volt (17. Ábra).



13. Ábra. Ábra Kaplan-Meier diagram a nem diabéteszes résztvevők arányát ábrázolja az idő függvényében. Kezdeti IAA érték >80nU/ml. A csoportok statisztikai összehasonlítására log-rank tesztet alkalmaztak.

Ez a klinikai vizsgálat szolgáltatotta az első humán adatot arra, hogy az orális inzulin kezelés hatékony lehet a T1DM megelőzésében.

A Pre-Point, kettős vak, 2009-2013 közt lefolytatott vizsgálat, magas T1DM rizikójú, de autoantitest képzést még nem mutató gyerekeket (életkor 2,2-7,7 év) válogatott be [39]. A résztvevők napi orális inzulint (2,5-67,5 mg) vagy placebo kezelést kaptak.



14. Ábra. A Pre-Point kettős vak vizsgálat folyamatábrája.

Table 3. Immune Responses to Insulin According to the Study Drug and Dose Received at the Time of the Response

Immune Response to Insulin	No./Total (%) [95% CI]			P Value ^b
	Placebo	Insulin, mg ^a		
Serum IgG ^c	1/10 (10)[0.1-29]	1/6 (17)[0.1-46]	3/6 (50) [10-90]	.05
Salivary IgA ^d	0/10 (0)[0.0-31]	1/6 (17)[0.1-46]	0/6 (0)[0.1-31]	.40
CD4 ⁺ T cells ^e	1/7 (14)[0.1-40]	1/5 (20)[0.1-55]	2/4 (50) [1-99]	.24
Antibody or CD4 ⁺ T-cell response	2/10 (20)[0.1-45]	2/6 (33)[0.1-71]	5/6 (83)[53-99.9]	.02

3. Táblázat. Immun válasz inzulinra. ^b From χ^2 test, ^e pozitív válasz: >3x stimuláció inzulinra

Inzulinhoz kötött Se-IgG és nyálban lévő IgA szintjének emelkedése, valamint a CD4+ T-set proliferatív válasz a placeboval kezelt gyerekek 20%-ban (2/10) jelentkezett. Ez az inzulint kapók között a 2,5 mg-os és a 7,5 mg-os csoportban 16,7%-ban (1/6, 1/6), a 22,5 mg-os csoportban 33,3%-ban (2/6), míg a 67,5 mg-os csoportban 83,3 %-ban (5/6) volt detektálható.

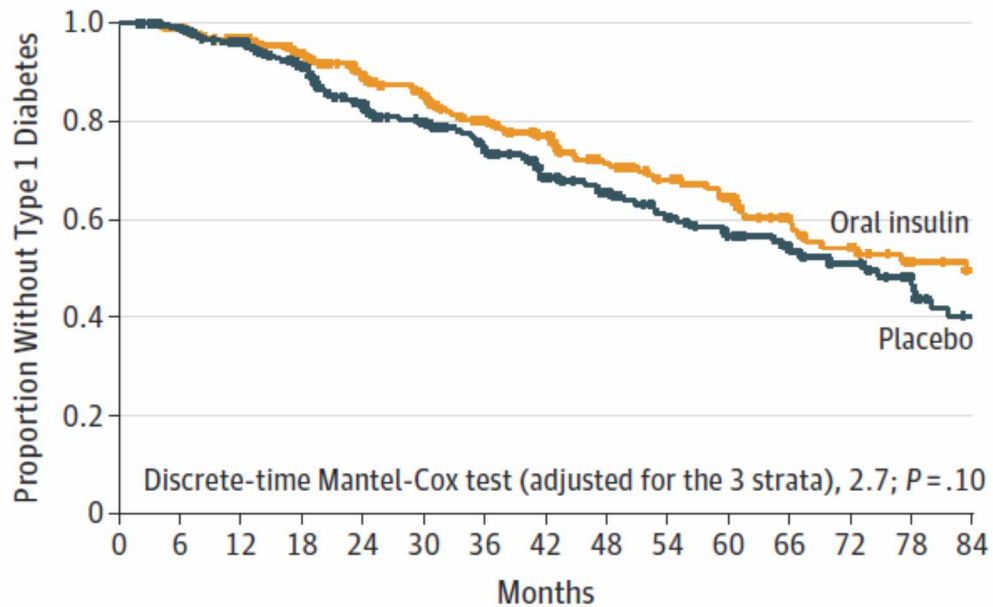
A nagy dózisu orális inzulin bevitel inzulin-reszponzív és proinzulin-reszponzív szabályozó T sejtek indukcióját eredményezte. Hipoglikémiás esemény nem volt egyik csoportban sem.

A kutatás eredménye biztató, de nyilván megvannak limitációi. Az esetszám kicsi volt, az utánkövetés rövid ideig tartott. Az antigént (inzulint) olyan gyerekek kapták, akiknek genetikailag a legnagyobb esélye van az 1-es típusú diabetes kialakulására. Ezek a gyerekek az ilyen betegek mindösszesen 1%-át jelentik, kérdés, hogy az alacsonyabb genetikai rizikóval bíró gyerekek esetén az immunválasz hasonló-e vagy rosszabb? A pancreas-szigetek elleni auto-antitestek 9 hónap és 2 éves kor között termelődnek a legnagyobb arányban, általában 1 éves kor körül érik el a legmagasabb szintet, míg a vizsgált gyerekek 2-7 évesek voltak.

Összességében ugyanakkor egyértelműen látható volt, hogy napi 67,5 mg-os szájon át szedett inzulin a placeboval összehasonlítva, hipoglikémia nélküli immunválaszt eredményezett.

Ennek alapján további fázis III vizsgálat mindenképpen szükséges a koncepció megerősítésére és eldöntésére, hogy az orális inzulin bevitel alkalmas-e az autoimmun reakció kialakulásának megelőzésére ezekben a gyerekekben.

Type 1 Diabetes TrialNet Oral Insulin Study Group T1DM-es betegek rokonait vonta vizsgálatba, akik legalább 2 autoantitesttel rendelkeztek normális glukóz tolerancia mellett. A vizsgálat napi 7.5 mg orális inzulin kezelésben részesültek és az átlagos követési idő 2.7 év volt [52].



No. of participants

Oral insulin	276	270	248	211	182	160	134	115	96	78	68	50	42	32
Placebo	274	267	239	204	168	145	124	97	82	69	59	47	39	32

15. Ábra. A T1DM megjelenése a 7,5 mg orális inzulinnal és placeboval kezelt csoportokban [52]

A napi 7.5 mg orális inzulin kezelés csak minimálisan késleltette a T1DM megjelenését T1DM-es betegek tünetmentes rokonaiban.

A T1D prevenció fontosságát és egyben a feladat nehézségét jelzi, hogy a Clinicaltrials.gov 181 db T1D immunológiai toleranciával kapcsolatos klinikai vizsgálatot sorol fel (Recruiting, Not yet recruiting, Active not recruiting Completed, Enrolling by invitation). A vizsgálatok közül az első százat az alábbi felsorolás tartalmazza.

	Title	Status	Interventions
1	CTLA4-Ig (Abatacept) for Prevention of Abnormal Glucose Tolerance and Diabetes in Relatives At-Risk for Type 1	Active, not recruiting	<ul style="list-style-type: none"> • Drug: CTLA4-Ig (Abatacept) • Drug: Placebo
2	Autoimmunity-blocking Antibody for Tolerance in Recently Diagnosed Type 1 Diabetes	Completed	<ul style="list-style-type: none"> • Biological: Anti-CD3 mAb • Other: Diabetes Standard of Care Treatment • Dietary Supplement: Iron supplementation
3	Hydroxychloroquine in Individuals At-risk for Type 1 Diabetes Mellitus	Recruiting	<ul style="list-style-type: none"> • Drug: Hydroxychloroquine • Drug: Placebo
4	AbATE Follow-Up Study	Completed	
5	Development of Predictive Biomarkers	Active, not recruiting	<ul style="list-style-type: none"> • Other: Mixed Meal Tolerance Test
6	Study of the Acute Metabolic Effect of Exenatide in Type 1 Diabetes	Completed	<ul style="list-style-type: none"> • Drug: Exenatide

7	A Meal Test Study of LY900014 in Participants With Type 1 Diabetes Mellitus	Completed	<ul style="list-style-type: none"> • Drug: LY900014 • Drug: Insulin Lispro • Drug: Insulin Aspart
8	Type 1 Diabetes Extension Study	Recruiting	
9	Diabetes Prevention - Immune Tolerance	Completed	<ul style="list-style-type: none"> • Other: Placebo comparator • Drug: Diamyd
10	Effects of Dapagliflozin on Hormonal Glucose Homeostasis in Type 1 Diabetes	Recruiting	<ul style="list-style-type: none"> • Drug: Forxiga 10mg • Drug: Placebo
11	Investigating the Effect of Liraglutide on the Endogenous Glucose Production During in Tye 1 Diabetes Subjects	Completed	<ul style="list-style-type: none"> • Drug: Liraglutide • Drug: Placebo • Drug: Mixed Meal Tolerance Test with paracetamol
12	Safety and Efficacy of CLBS03 in Adolescents With Recent Onset Type 1 Diabetes (The Sanford Project T-Rex Study)	Completed	<ul style="list-style-type: none"> • Biological: CLBS03 Low Dose • Biological: CLBS03 High Dose • Biological: Placebo
13	Intravenous CTLA4-Ig Treatment in Recent Onset Type 1 Diabetes Mellitus	Completed	<ul style="list-style-type: none"> • Drug: CTLA-4 Ig • Other: Placebo
14	Improving Metabolic Assessments in Type 1 Diabetes Mellitus Clinical Trials	Completed	<ul style="list-style-type: none"> • Procedure: Mixed Meal Tolerance Test • Procedure: Glucagon Stimulation Test
15	Rituximab in New Onset Type 1 Diabetes	Completed	<ul style="list-style-type: none"> • Drug: Anti-CD20 (rituximab) • Drug: Placebo Comparator
16	Effects of Ketosis on Brain Function in Patients With T1DM	Recruiting	<ul style="list-style-type: none"> • Other: Very low carbohydrate diet • Other: Standard carbohydrate diet
17	Imatinib Treatment in Recent Onset Type 1 Diabetes Mellitus	Completed	<ul style="list-style-type: none"> • Drug: Imatinib Mesylate • Drug: Placebo (For imatinib mesylate)
18	A Study of SIMPONI® to Arrest Beta-cell Loss in Type 1 Diabetes	Completed	<ul style="list-style-type: none"> • Biological: Golimumab • Biological: Placebo
19	Closed Loop From Onset in Type 1 Diabetes	Active, not recruiting	<ul style="list-style-type: none"> • Device: Closed-loop system (Florence M or CamAPS FX) • Other: Multiple Daily Injections
20	Pathogenesis of the Cardiometabolic Risk in Youth With Type 1 Diabetes	Recruiting	<ul style="list-style-type: none"> • Diagnostic Test: Oral Glucose Tolerance Test
21	Canakinumab Study in Individuals With Newly Diagnosed Type 1 Diabetes	Completed	<ul style="list-style-type: none"> • Drug: canakinumab (anti IL-1beta) • Drug: Placebo
22	Effects of Sitagliptin (Januvia®) on Blood Glucose Control in Patients With Type 1 Diabetes	Completed	<ul style="list-style-type: none"> • Drug: Sitagliptin • Drug: Sugar Pill
23	A Clinical Proof-of-principle Trial in Adult Subjects With Newly Diagnosed Type 1 Diabetes Mellitus Investigating the Effect of NNC0114-0006 and Liraglutide on Preservation of Beta-cell Function	Completed	<ul style="list-style-type: none"> • Drug: NNC0114-0006 • Drug: liraglutide • Drug: placebo
24	Tocilizumab (TCZ) in New-onset Type 1 Diabetes	Completed	<ul style="list-style-type: none"> • Drug: Tocilizumab (TCZ) • Drug: Placebo • Other: Standard of Care
25			<ul style="list-style-type: none"> • Drug: rhIL-2

	Low-dose rhIL-2 in Patients With Recently-diagnosed Type 1 Diabetes	Active, not recruiting	• Drug: Placebo
26	A Study of LY900014 Formulation in Participants With Type 1 Diabetes Mellitus Using Insulin Pumps	Completed	• Drug: LY900014 • Drug: Insulin Lispro
27	Wharton’s Jelly Derived Mesenchymal Stromal Cell Repeated Treatment of Adult Patients Diagnosed With Type I Diabetes	Recruiting	• Drug: ProTrans
28	Wharton’s Jelly Derived Mesenchymal Stromal Cell Treatment of Adult Patients Diagnosed With Type I Diabetes	Recruiting	• Drug: ProTrans: Allogeneic transplantation with WJMSCs • Drug: Placebos
29	Single Dose and 34-Day Tolerance Study of INGAP Peptide in Insulin Deficient Patients	Completed	Drug: INGAP Peptide
30	Neulasta in Type 1 Diabetes	Completed	Drug: Neulasta (Pegylated) Drug: Placebo Dietary Supplement: Mixed Meal Tolerance Test (MMTT) Other: Blood test Other: DNA Test
31	Lactobacillus Johnsonii Supplementation in Adults With T1D	Recruiting	Drug: L. johnsonii Probiotic Drug: Placebo Capsule
32	A Phase 2, Multicentre, Randomized, Double-blind, Placebo- controlled Study in Patients With New-onset Type 1 Diabetes	Completed	Drug: Ladarixin Drug: Placebo
33	Effects of Recombinant Human Glutamic Acid Decarboxylase on the Progression of Type 1 Diabetes in New Onset Subjects	Completed	Drug: GAD-Alum Drug: GAD-Alum and Aluminum hydroxide Drug: Aluminum hydroxide
34	GPPAD-POInT (Global Platform of Autoimmune Diabetes - Primary Oral Insulin Trial)	Recruiting	Drug: Oral Insulin Other: Placebo
35	Islet Cell Transplantation Alone and CD34+ Enriched Bone Marrow Cell Infusion in Patients With Diabetes Mellitus: Steroid- Free Regimen	Completed	Procedure: Islet Cell Transplantation
36	Anti-CD3 mAb Treatment of Recent Onset Type 1 Diabetes	Completed	Drug: mAb hOKT3gamma1(Ala-Ala), Teplizumab Drug: Placebo Arm
37	A Study of LY900014 Administered in Participants With Type 1 Diabetes Using an Insulin Pump	Completed	Drug: LY900014 Drug: Insulin Lispro (Humalog)
38	Adaptive Study of IL-2 Dose Frequency on Regulatory T Cells in Type 1 Diabetes	Completed	Drug: Aldesleukin
39	Fr1da Insulin Intervention	Recruiting	Drug: Oral Insulin Other: Placebo
40	Recent-Onset Type 1 Diabetes Trial Evaluating Efficacy and Safety of Teplizumab	Recruiting	Biological: teplizumab Biological: Placebo
41	Pre-POINT-Early Study	Completed	• Drug: Oral Insulin • Drug: Placebo
42	Defining the Decline in Endogenous Insulin Secretion in Type 1 Diabetes Diagnosed After 30 Years of Age.	Recruiting	

43	Efficacy and Safety Study of Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation to Treat New Onset Type 1 Diabetes	Completed	<ul style="list-style-type: none"> • Procedure: immunosuppression and stem cell transplantation
44	Effects of Gluten Free Diet on Type 1 Diabetes Mellitus in Children	Enrolling by invitation	<ul style="list-style-type: none"> • Other: Gluten Free Diet • Other: Placebo
45	Treatment of Patients With Newly Onset of Type 1 Diabetes With Mesenchymal Stem Cells	Completed	<ul style="list-style-type: none"> • Biological: Mesenchymal stem cells
46	Cord Blood Plus Vitamin D and Omega 3s in T1D	Completed	<ul style="list-style-type: none"> • Biological: Autologous UCB • Dietary Supplement: Omega 3 FA • Dietary Supplement: Vitamin D
47	Albiglutide Versus Placebo in Insulin-treated Subjects With New-onset Type 1 Diabetes Mellitus	Completed	<ul style="list-style-type: none"> • Biological: Albiglutide weekly injection • Biological: Placebo weekly injection • Biological: Insulin
48	Lactobacillus Johnsonii in Children and Adolescents With T1D	Recruiting	<ul style="list-style-type: none"> • Drug: L. johnsonii Probiotic • Drug: Placebo Capsule
49	Study of the Effects of XOMA 052 on Insulin Production in Subjects With Well Controlled Type 1 Diabetes	Completed	<ul style="list-style-type: none"> • Drug: Xoma 052 • Drug: Placebo
50	Safety and Efficacy Study of Islets Xenotransplantation	Completed	<ul style="list-style-type: none"> • Other: Porcine islets • Other: Autologous Treg
51	DIABGAD - Trial to Preserve Insulin Secretion in Type 1 Diabetes Using GAD-Alum (Diamyd) in Combination With Vitamin D and Ibuprofen	Completed	<ul style="list-style-type: none"> • Biological: GAD-Alum (Diamyd) 20 µg • Biological: GAD-Alum (Diamyd) 20 µg X 2 • Drug: Vitamin D • Drug: Ibuprofen
52	Long-Term Treatment Effect of DiaPep277 in Type 1 Diabetes	Completed	<ul style="list-style-type: none"> • Drug: DiaPep277
53	Efficacy Study on the Control of Blood Glucose Concentration in Type 1 Diabetic Patients	Completed	<ul style="list-style-type: none"> • Drug: insulin glulisine / insulin glargine • Drug: insulin glulisin / insulin detemir
54	Ixekizumab Diabetes Intervention Trial (I-DIT)	Not yet recruiting	<ul style="list-style-type: none"> • Drug: Ixekizumab • Drug: Placebo
55	Regulatory T Cells in Type 1 Diabetes Patients Treated With IL-2	Completed	<ul style="list-style-type: none"> • Drug: Aldesleukin (Proleukin)
56	A Study of LY900014 in Participants With Type 1 Diabetes on Insulin Injection Therapy	Completed	<ul style="list-style-type: none"> • Drug: LY900014 • Drug: Insulin Lispro
57	PINIT Study: Primary Intranasal Insulin Trial	Active, not recruiting	<ul style="list-style-type: none"> • Drug: intranasal insulin • Other: Placebo
58	A Study of Oral Ladarixin in New-onset Type 1 Diabetes and a Low Residual β-cell Function	Recruiting	<ul style="list-style-type: none"> • Drug: Ladarixin • Drug: Placebo
59	Umbilical Cord Blood Infusion to Treat Type 1 Diabetes	Completed	<ul style="list-style-type: none"> • Procedure: Autologous Umbilical Cord Blood Transfusion • Biological: Cord blood
60	Study of Insulin Therapy Augmented by Real Time Sensor IN Type 1 Children and Adolescents (START-IN!)	Completed	<ul style="list-style-type: none"> • Device: monitor Paradigm 754 VEO, MINILINK Real Time, Medtronic, CE

61	An Innovative Approach Towards Understanding and Arresting Type 1 Diabetes (INNODIA)	Recruiting	
62	Study of Safety and Efficacy of CFZ533 in Type 1 Diabetes Pediatric and Young Adult Subjects	Recruiting	<ul style="list-style-type: none"> • Drug: CFZ533 • Other: Placebo
63	Diabetes Islet Preservation Immune Treatment	Not yet recruiting	<ul style="list-style-type: none"> • Drug: Anti-Thymocyte Globulin (ATG) • Drug: Placebo • Drug: Pegylated GCSF • Drug: Interleukin 2 • Drug: Etanercept • Drug: Exenatide
64	Study to Assess Efficacy & Safety of Reparixin in Pancreatic Islet Transplantation	Completed	<ul style="list-style-type: none"> • Drug: Reparixin • Drug: Placebo
65	Incretin Effect and Use After Clinical Islet Transplantation	Completed	<ul style="list-style-type: none"> • Drug: Pantoprazole • Drug: Sitagliptin
66	A Study of LY900027 Given by Insulin Pump to Participants With Type 1 Diabetes Mellitus	Completed	<ul style="list-style-type: none"> • Drug: LY900027 • Drug: Insulin Lispro
67	Verapamil SR in Adults With Type 1 Diabetes	Not yet recruiting	<ul style="list-style-type: none"> • Drug: Verapamil SR • Drug: Placebo
68	Multiple Islet Peptide Administration in Type 1 Diabetes (MultiPepT1De)	Completed	<ul style="list-style-type: none"> • Drug: MultiPepT1De injection • Other: Placebo
69	Atorvastatin in New Onset Type 1 Diabetes Mellitus (T1DM)	Completed	<ul style="list-style-type: none"> • Drug: Atorvastatin • Other: Placebo
70	Beta Cell Imaging in T1D Patients With a Different Glycemic Control	Recruiting	<ul style="list-style-type: none"> • Radiation: gallium-68-exendin PET/CT
71	Covid-19 Infection and New Onset Type 1 Diabetes	Recruiting	
72	Immunointervention With Calcitriol in New-Onset Type 1 Diabetes	Completed	<ul style="list-style-type: none"> • Drug: 1,25-dihydroxy-vitamin D3 (calcitriol) • Drug: placebo
73	Clinical Phase II/III Trial of Ustekinumab to Treat Type 1 Diabetes (UST1D2)	Recruiting	<ul style="list-style-type: none"> • Drug: Ustekinumab • Drug: Placebo
74	Priming Exercise in Type 1 Diabetes	Completed	<ul style="list-style-type: none"> • Behavioral: Priming exercise • Behavioral: Control Exercise
75	New Onset of Type 1 Diabetes Mycophenolate Mofetil-Daclizumab Clinical Trial	Completed	<ul style="list-style-type: none"> • Drug: Mycophenolate mofeteil (MMF) • Drug: Daclizumab (DZB) • Drug: Placebo control for Mycophenolate mofeteil (MMF) • Drug: Placebo control for Daclizumab (DZB)
76	To Investigate the Efficacy and Safety of Individualized Doses of BioChaperone Insulin Lispro in Comparison to Humalog® U-100 in Patients With Type 1 Diabetes Mellitus	Completed	<ul style="list-style-type: none"> • Drug: BioChaperone insulin lispro • Drug: Humalog®
77	Muscle Oxygenation, Type 1 Diabetes, and Glycated Hemoglobin	Completed	<ul style="list-style-type: none"> • Behavioral: Incremental maximal exercise • Dietary Supplement: Oral Glucose Tolerance Test

			<ul style="list-style-type: none"> • Procedure: Muscle biopsy • Procedure: Combined DLCO-DLNO • Procedure: Dual energy X-ray absorptiometry • Procedure: Accelerometry over one week • Other: Questionnaires
78	Effects of Acute Intake of Caffeinated Beverages in Type 1 Diabetes	Completed	<ul style="list-style-type: none"> • Other: Caffeine enhanced energy drink • Other: Glucose drink
79	Proleukin and Rapamune in Type 1 Diabetes	Completed	<ul style="list-style-type: none"> • Drug: IL-2 • Drug: Rapamycin
80	Integrating Insulin Delivery and Glucose Sensing in Subcutaneous Tissue for the Treatment of Type-1 Diabetic Patients	Completed	<ul style="list-style-type: none"> • Procedure: OGTT and CLAMP
81	Stem Cell Mobilization (Plerixafor) and Immunologic Reset in Type 1 Diabetes (T1DM)	Recruiting	<ul style="list-style-type: none"> • Drug: Plerixafor • Drug: Alemtuzumab • Drug: Anakinra • Drug: Etanercept • Drug: Liraglutide
82	Trial of Otelixizumab for Adolescents and Adults With Newly Diagnosed Type 1 Diabetes Mellitus (Autoimmune): DEFEND-2	Completed	<ul style="list-style-type: none"> • Biological: Otelixizumab • Biological: Placebo
83	Efficacy Study of DiaPep277 in Newly Diagnosed Type 1 Diabetes Patients	Completed	<ul style="list-style-type: none"> • Drug: DiaPep277 • Drug: Placebo
84	Insulin Pump Therapy in Adolescents With Newly Diagnosed Type 1 Diabetes (T1D)	Completed	<ul style="list-style-type: none"> • Device: Pump therapy (CSII) • Drug: Multiple daily injections (MDI) using insulin glargine + rapid acting analog
85	Pilot Study of OMEGA-3 and Vitamin D in High-Dose in Type 1 Diabetic Patients	Recruiting	<ul style="list-style-type: none"> • Drug: Cholecalciferol • Drug: Omega 3 fatty acid
86	TEFA Family Prevention: Glutenfree Diet to Preserve Beta-cell Function	Enrolling by invitation	<ul style="list-style-type: none"> • Dietary Supplement: Gluten free diet • Dietary Supplement: Omega 3 fatty acid • Dietary Supplement: Vitamin D • Dietary Supplement: Probiotics
87	Cardiovascular Effects of Exercise-related Hypoglycaemia in Patients With Type 1 Diabetes (Hypo Heart Exercise)	Recruiting	<ul style="list-style-type: none"> • Other: Exercise-related hypoglycaemia • Other: Hypoglycaemia under resting conditions
88	Islet Allograft Transplantation in Type 1 Diabetes	Enrolling by invitation	<ul style="list-style-type: none"> • Drug: Human Pancreatic Islets
89	Anti-inflammatory Therapy With Anakinra in Newly Diagnosed Type 1 Diabetes	Completed	<ul style="list-style-type: none"> • Drug: Anakinra
90	Liraglutide Effect on Beta-cell Function in C-peptide Positive Type 1 Diabetes	Completed	<ul style="list-style-type: none"> • Drug: Liraglutide • Drug: Placebo for liraglutide
91	Early Markers of Disease and Response to Therapy	Not yet recruiting	<ul style="list-style-type: none"> • Drug: Abatacept

92	Bone Marrow vs Liver as Site for Islet Transplantation	Completed	• Biological: Human pancreatic islet transplantation
93	Evaluation of a Novel Method for Integrating Insulin Delivery and Glucose Sensing in Adipose Tissue of Diabetic Patients	Completed	• Procedure: Glucose measurement at the sc. insulin delivery site
94	Teplizumab for Prevention of Type 1 Diabetes In Relatives "At- Risk"	Completed	• Drug: Teplizumab • Drug: Placebo infusion
95	Screening of Subjects With Type I Diabetes to Determine Eligibility for Islet Transplantation	Completed	
96	To Examine the Lung When People With Diabetes Take an Inhaled Form of Insulin, Compared to Subcutaneous Insulin.	Completed	• Drug: Inhaled insulin
97	Evaluation of a Diabetes Vaccine in Newly Diagnosed Diabetics	Completed	• Biological: IBC-VS01 • Biological: IBC-VS01 placebo
98	Islet Transplantation for Type 1 Diabetes	Completed	• Procedure: Islet Transplantation
99	Identification of # Cell Dysfunction in Relatives of Individuals With Type 1 Diabetes Mellitus	Recruiting	• Other: There is no intervention
100	Dapagliflozin Plus Pioglitazone in T1DM	Recruiting	• Drug: Pioglitazone 45 mg

A T1DM orális inzulin diabétesz prevenció vizsgálatok tanulsága a következő:

- a terápiás esély jobb a nagyon korán, akár néhány hónapos korban elkezdett kezelésnél
- a nagy dózisú inzulin kezelés látszik eredményesnek

Az immunológiai tolerancia kialakulásának mechanizmusa még mindig nem eléggé ismert, ami megnehezíti a racionális intervenciót. A toleranciát elősegítő módszerek kombinálásától, valamint a tolerancia markerek által vezérelt kezeléstől további haladás várható.

References

1. Eisenbarth, G.S., *Type 1 diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease*. N Engl J Med, 1986. **314**(21): p. 1360-8.
2. American Diabetes, A., *(2) Classification and diagnosis of diabetes*. Diabetes Care, 2015. **38** Suppl: p. S8-S16.
3. Chobot, A., et al., *Updated 24-year trend of Type 1 diabetes incidence in children in Poland reveals a sinusoidal pattern and sustained increase*. Diabet Med, 2017. **34**(9): p. 1252-1258.
4. Diaz-Valencia, P.A., P. Bougneres, and A.J. Valleron, *Global epidemiology of type 1 diabetes in young adults and adults: a systematic review*. BMC Public Health, 2015. **15**: p. 255.
5. Rawshani, A., et al., *The incidence of diabetes among 0-34 year olds in Sweden: new data and better methods*. Diabetologia, 2014. **57**(7): p. 1375-81.
6. Thomas, N.J., et al., *Frequency and phenotype of type 1 diabetes in the first six decades of life: a cross-sectional, genetically stratified survival analysis from UK Biobank*. Lancet Diabetes Endocrinol, 2018. **6**(2): p. 122-129.
7. Zhang, R., et al., *Type 1 diabetes induced by immune checkpoint inhibitors*. Chin Med J (Engl), 2020. **133**(21): p. 2595-2598.
8. Cooper, J.D., et al., *Confirmation of novel type 1 diabetes risk loci in families*. Diabetologia, 2012. **55**(4): p. 996-1000.
9. Redondo, M.J., et al., *Concordance for islet autoimmunity among monozygotic twins*. N Engl J Med, 2008. **359**(26): p. 2849-50.
10. Redondo, M.J., et al., *A Type 1 Diabetes Genetic Risk Score Predicts Progression of Islet Autoimmunity and Development of Type 1 Diabetes in Individuals at Risk*. Diabetes Care, 2018. **41**(9): p. 1887-1894.
11. Erlich, H.A., et al., *Next generation sequencing reveals the association of DRB3*02:02 with type 1 diabetes*. Diabetes, 2013. **62**(7): p. 2618-22.
12. Krischer, J.P., et al., *The 6 year incidence of diabetes-associated autoantibodies in genetically at-risk children: the TEDDY study*. Diabetologia, 2015. **58**(5): p. 980-7.

13. Polychronakos, C. and Q. Li, *Understanding type 1 diabetes through genetics: advances and prospects*. Nat Rev Genet, 2011. **12**(11): p. 781-92.
14. Hayter, S.M. and M.C. Cook, *Updated assessment of the prevalence, spectrum and case definition of autoimmune disease*. Autoimmun Rev, 2012. **11**(10): p. 754-65.
15. Hyoty, H., *Viruses in type 1 diabetes*. Pediatr Diabetes, 2016. **17 Suppl 22**: p. 56-64.
16. Knip, M., S.M. Virtanen, and H.K. Akerblom, *Infant feeding and the risk of type 1 diabetes*. Am J Clin Nutr, 2010. **91**(5): p. 1506s-1513s.
17. Rešić Lindehammer, S., et al., *Seroconversion to islet autoantibodies after enterovirus infection in early pregnancy*. Viral Immunol, 2012. **25**(4): p. 254-61.
18. Taplin, C.E. and J.M. Barker, *Autoantibodies in type 1 diabetes*. Autoimmunity, 2008. **41**(1): p. 11-8.
19. Savola, K., et al., *IA-2 antibodies--a sensitive marker of IDDM with clinical onset in childhood and adolescence. Childhood Diabetes in Finland Study Group*. Diabetologia, 1998. **41**(4): p. 424-9.
20. Ziegler, A.G., et al., *Seroconversion to multiple islet autoantibodies and risk of progression to diabetes in children*. Jama, 2013. **309**(23): p. 2473-9.
21. Mao, R.F., et al., *Type 1 diabetes mellitus and its oral tolerance therapy*. World J Diabetes, 2020. **11**(10): p. 400-415.
22. Katsarou, A., et al., *Type 1 diabetes mellitus*. Nat Rev Dis Primers, 2017. **3**: p. 17016.
23. Oling, V., et al., *Autoantigen-specific memory CD4+ T cells are prevalent early in progression to Type 1 diabetes*. Cell Immunol, 2012. **273**(2): p. 133-9.
24. McLaughlin, R.J., et al., *Where, How, and When: Positioning Posttranslational Modification Within Type 1 Diabetes Pathogenesis*. Curr Diab Rep, 2016. **16**(7): p. 63.
25. Babon, J.A., et al., *Analysis of self-antigen specificity of islet-infiltrating T cells from human donors with type 1 diabetes*. Nat Med, 2016. **22**(12): p. 1482-1487.
26. Burrack, A.L., T. Martinov, and B.T. Fife, *T Cell-Mediated Beta Cell Destruction: Autoimmunity and Alloimmunity in the Context of Type 1 Diabetes*. Front Endocrinol (Lausanne), 2017. **8**: p. 343.

27. Lampeter, E.F., S.R. McCann, and H. Kolb, *Transfer of diabetes type 1 by bone-marrow transplantation*. Lancet, 1998. **351**(9102): p. 568-9.
28. Rodriguez-Calvo, T., S.J. Richardson, and A. Pugliese, *Pancreas Pathology During the Natural History of Type 1 Diabetes*. Curr Diab Rep, 2018. **18**(11): p. 124.
29. *5. Glycemic Targets*. Diabetes Care, 2016. **39 Suppl 1**: p. S39-46.
30. Rewers, A., et al., *Presence of diabetic ketoacidosis at diagnosis of diabetes mellitus in youth: the Search for Diabetes in Youth Study*. Pediatrics, 2008. **121**(5): p. e1258-66.
31. Nathan, D.M., *The diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications study at 30 years: overview*. Diabetes Care, 2014. **37**(1): p. 9-16.
32. Skyler, J.S., *Immune intervention for type 1 diabetes mellitus*. Int J Clin Pract Suppl, 2011(170): p. 61-70.
33. *Cyclosporin-induced remission of IDDM after early intervention. Association of 1 yr of cyclosporin treatment with enhanced insulin secretion. The Canadian-European Randomized Control Trial Group*. Diabetes, 1988. **37**(11): p. 1574-82.
34. Herold, K.C., et al., *Anti-CD3 monoclonal antibody in new-onset type 1 diabetes mellitus*. N Engl J Med, 2002. **346**(22): p. 1692-8.
35. Pescovitz, M.D., et al., *Rituximab, B-lymphocyte depletion, and preservation of beta-cell function*. N Engl J Med, 2009. **361**(22): p. 2143-52.
36. Atkinson, M.A., et al., *The challenge of modulating β -cell autoimmunity in type 1 diabetes*. Lancet Diabetes Endocrinol, 2019. **7**(1): p. 52-64.
37. Campbell-Thompson, M., et al., *Insulinitis and β -Cell Mass in the Natural History of Type 1 Diabetes*. Diabetes, 2016. **65**(3): p. 719-31.
38. Wasserfall, C., et al., *Persistence of Pancreatic Insulin mRNA Expression and Proinsulin Protein in Type 1 Diabetes Pancreata*. Cell Metab, 2017. **26**(3): p. 568-575.e3.
39. Bonifacio, E., et al., *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): p. 1541-9.

40. Rezende, R.M. and H.L. Weiner, *History and mechanisms of oral tolerance*. Semin Immunol, 2017. **30**: p. 3-11.
41. Knoop, K.A., M.J. Miller, and R.D. Newberry, *Transepithelial antigen delivery in the small intestine: different paths, different outcomes*. Curr Opin Gastroenterol, 2013. **29**(2): p. 112-8.
42. Niess, J.H., et al., *CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance*. Science, 2005. **307**(5707): p. 254-8.
43. Tordesillas, L. and M.C. Berin, *Mechanisms of Oral Tolerance*. Clin Rev Allergy Immunol, 2018. **55**(2): p. 107-117.
44. Krischer, J.P., et al., *The 6 year incidence of diabetes-associated autoantibodies in genetically at-risk children: the TEDDY study*. Diabetologia, 2015. **58**(5): p. 980-7.
45. Carel, J.C., P. Bougnères, and P. Vardi, *Suppression of diabetes in nonobese diabetic mice by oral administration of porcine insulin*. J Endocrinol Invest, 1994. **17**(7): p. 573-80.
46. Bresson, D., et al., *Anti-CD3 and nasal proinsulin combination therapy enhances remission from recent-onset autoimmune diabetes by inducing Tregs*. J Clin Invest, 2006. **116**(5): p. 1371-81.
47. Raab, J., et al., *Capillary blood islet autoantibody screening for identifying pre-type 1 diabetes in the general population: design and initial results of the Fr1da study*. BMJ Open, 2016. **6**(5): p. e011144.
48. Pozzilli, P., et al., *No effect of oral insulin on residual beta-cell function in recent-onset type 1 diabetes (the IMDIAB VII)*. IMDIAB Group. Diabetologia, 2000. **43**(8): p. 1000-4.
49. Chaillous, L., et al., *Oral insulin administration and residual beta-cell function in recent-onset type 1 diabetes: a multicentre randomised controlled trial*. Diabète Insuline Orale group. Lancet, 2000. **356**(9229): p. 545-9.
50. Pozzilli, P. and M. Gisella Cavallo, *Oral insulin and the induction of tolerance in man: reality or fantasy?* Diabetes Metab Res Rev, 2000. **16**(5): p. 306-7.
51. Skyler, J.S., et al., *Effects of oral insulin in relatives of patients with type 1 diabetes: The Diabetes Prevention Trial--Type 1*. Diabetes Care, 2005. **28**(5): p. 1068-76.
52. Krischer, J.P., et al., *Effect of Oral Insulin on Prevention of Diabetes in Relatives of Patients With Type 1 Diabetes: A Randomized Clinical Trial*. Jama, 2017. **318**(19): p. 1891-1902.

A Debreceni Egyetemen kifejlesztett orális inzulin formula tulajdonságai

A CeraMed Kft. a Debreceni Egyetemmel együttműködve új orálisan hatékony inzulin készítményt fejlesztett ki (eredeti szabadalom US20120129769A1, ADMINISTERABLE PHARMACEUTICAL PREPARATION CONTAINING INSULIN)

Az inzulin orális bevitele, a bélcsatornából történő felszívódás számos előnnyel jár. Az orális gyógyszer elkerüli a gyakori injekciós inzulin alkalmazása során felmerülő fertőzési veszélyt. Az orális gyógyszer compliance, mivel nem kellemetlen, nem fájdalmas jobb, mint az injekciós kezelésé. Az enterális felszívódás során az inzulin közelebb kerül a fiziológias hatás útjához, a portális vénákon keresztül először a májba kerül, és nem a periférián lesz a legmagasabb inzulin szint, mint a sc. beadás során.

1. Kémiai tulajdonságok

Az inzulin és 6-aminokapronsav keverékből AquaPolish P felhasználásával film-granulátumot képeznek, majd granulátumot kemény kapszulákba töltik.

A kapszula összetétele a következő:

Insulin humanum ¹	20NE
A-aminokapronsav	100 mg
Crospovidonum Type A	160 mg
Beconat:	
AquaPolish P White 712-01E ²	80 mg
Trietilcitrát	8 mg

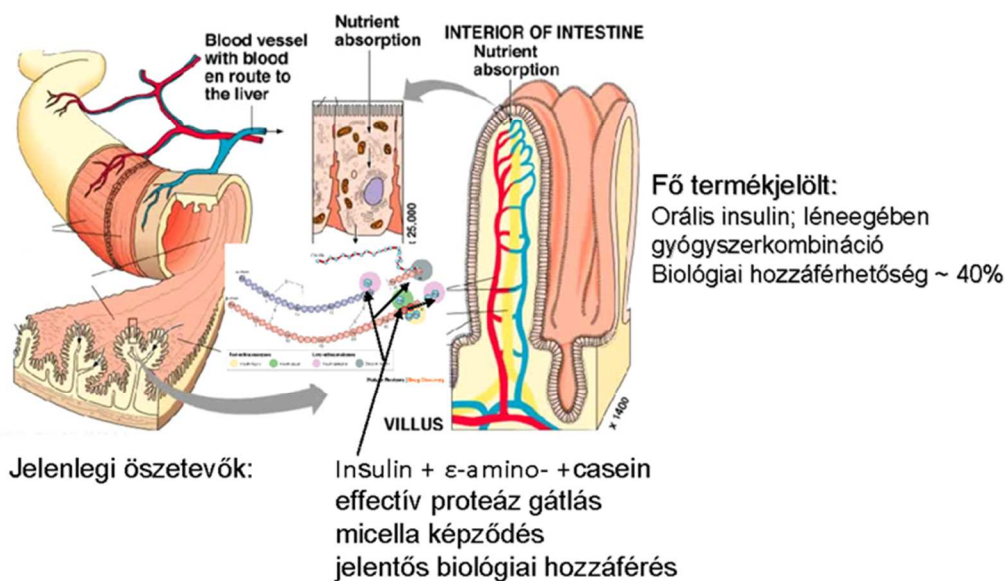
¹ 0.2 ml Humulin R 100 NE/ml

² metacrilsav-etilakrilát-kopolimer, karmellóz nátrium, talkum és titán dioxid

2. Biológiai hatások

Az inzulin a proteáz gátló hatású 6-aminokapronsavval és caseinnel olyan micelliumot képez, amelyben az inzulin jelenős mértékben védett a bél proteázok hatásától, valamint a micellium képes a beadott inzulin mintegy 30 %-t aktív formában bejuttatni a keringésbe (1. Ábra).

ORÁLIS INSULIN/PEPTID KÉSZÍTMÉNY



1. Ábra. Az insulin-6-aminokapronsav komplex felszívódása a vékonybélben

Az orális készítmény fejlesztése során megvizsgálták, hogy a 6-aminokapronsav és az insulin milyen aránya eredményezi az insulin optimális védelmét. Megvizsgálták az orálisan adagolt insulin / 6-aminokapronsav komplex hatását patkányban a vércukorszintre és meghatározták, hogy a kezelés miként változtatta meg a plazma insulin szintet. A méréseket a kezelés után 15 és 60 perccel végezték el. Az eredményeket a 1. Táblázat tartalmazza. Megállapítható, hogy a 6-aminokapronsav (Acepramin) önmagában nem befolyásolta sem a vércukor, sem a plazma insulin szintet, ellenben segítette az insulin bejutását a szervezetbe, amit jelentősen megnövekedett plazma insulin szint, és az ennek következtében csökkenő vércukorszint jelez.

15. perc	Vércukor (mmol/l)	Plazma insulin (μU/ml)
Oldószer	7.3 ± 0.34	15.9 ± 3.35
100 mg/kg Acepramin	6.9 ± 1.41	17.1 ± 3.62
0.1 IU/kg insulin	7.9 ± 0.92	14.4 ± 1.51
0.1 IU/kg insulin + 100 mg/kg Acepramin	5.55 ± 0.71*	19.8 ± 1.7*

1.0 IU/kg inzulin	7.7 ± 2.31	27.5 ± 3.95*
1.0 IU/kg inzulin + 100 mg/kg Acepramin	4.9 ± 0.86*	44.1 ± 4.52*
60. perc		
Oldószer	7.4 ± 0.52	14.8 ± 2.53
100 mg/kg Acepramin	7.3 ± 0.95	16.7 ± 3.00
0.1 IU/kg inzulin	7.9 ± 0.83	17.3 ± 2.94
0.1 IU/kg inzulin + 100 mg/kg Acepramin	6.1 ± 0.59*	21.4 ± 2.62*
1.0 IU/kg inzulin	6.9 ± 0.62	17.1 ± 2.06
1.0 IU/kg inzulin + 100 mg/kg Acepramin	4.9 ± 0.43*	31.2 ± 2.79*
*: szignifikáns változás, p < 0.05		
A csillaggal és kiemeléssel jelölt adatok mutatják, hogy az orális inzulin felszívódott és csökkentette a vércukorszintet.		

1. Táblázat. Orálisan adott inzulin / 6-aminokapronsav komplex hatása a vércukorszintre és a plazma inzulin koncentrációra patkányban. Adatok: átlag±S.D. n=8 mellett csoportonként. Statisztika: Bonferroni szerint módosított t-teszt, ANOVA-t követően

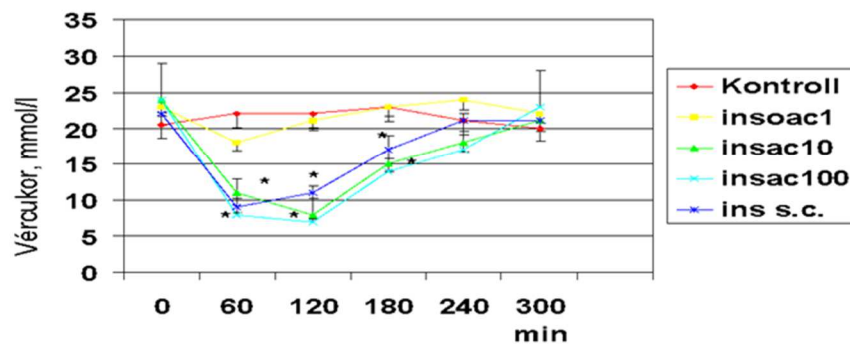
3. STZ diabétesz modellen végzett vizsgálatok

Sprague-Dawley hím patkányokban (ts:230-250 g) 50 mg/kg streptozotocin egyszeri intravénás adagolásával diabetest váltottunk ki. Tíz nap elteltével a 15 mmol/l- nél magasabb éhgyomri (12 óras koplalás után) vércukorértékkel rendelkező állatokat vontuk be a kísérletekbe. Az állatok orális, ill. parenterális (s.c.) inzulint (10 IU/kg) kaptak, ezt követően mértük a vércukorszintet és a plazma inzulin immun reaktivitást. A kísérletek eredményét a következő ábrák mutatják.

3.1. Vércukorszintre gyakorolt hatás vizsgálata:

Rövidítések:

insoac1 = orális inzulin 1 mg/kg acepramin mellett; insac10
 = orális inzulin 10 mg/kg acepramin mellett; insac100
 = orális inzulin 100 mg/kg acepramin mellett; inss.c.: subcutan inzulin

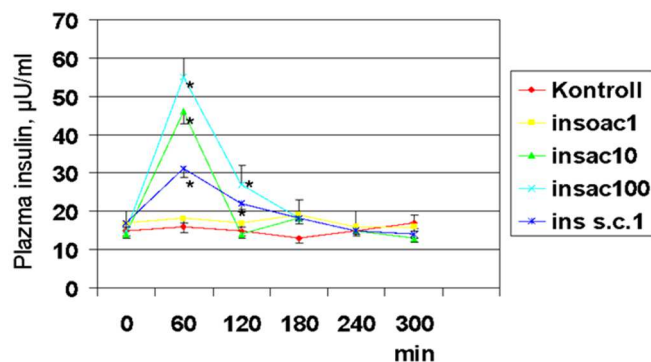


2. Ábra Az egyszeri sc. adott insulin és orális inzulin+acepremin hatása STZ diabéteszes patkányok vércukorszintjére. A kísérlet eredményeként szignifikáns különbség jelentkezett a kontrollhoz képest (* $p < 0.05$), $n = 8$ csoportonként.

3.2. A plazma inzulin immunoreaktivitás vizsgálata:

Rövidítések:

insoac1 = orális inzulin 1 mg/kg acepramin mellett; insac10
 = orális inzulin 10 mg/kg acepramin mellett; insac100
 = orális inzulin 100 mg/kg acepramin mellett; inss.c.:
 subcutan inzulin.



3. Ábra. Az egyszeri orális inzulin+acepramin (10 IU/kg) és inzulin (10 IU/kg) plazma inzulin szintre gyakorolt hatása streptozotocinnal (50 mg/kg i.v.) indukált diabeteszes patkányban

* Szignifikáns a különbség a kontrollhoz képest ($p < 0.05$, $n = 8$)

A vizsgálatok adataiból kitűnik, hogy a formulált orális inzulin inzulinhiányos diabetesben megemeli a plazma inzulin szintet és hatékonyan csökkenti a vércukrot. A kísérletek alapján azonos standard inzulin (10 IU/kg) mellett a 100 mg/kg acepramin tartalom a 10 mg/kg-hoz acepraminhoz viszonyítva nem jelent előnyt. Valószínű, hogy a subcutan inzulin „60 perces” értékei már lecsengő plazmakoncentrációs értéket mutatnak, tekintve a subcutan beadott inzulin gyors felszívódását (2.,3. Ábrák).

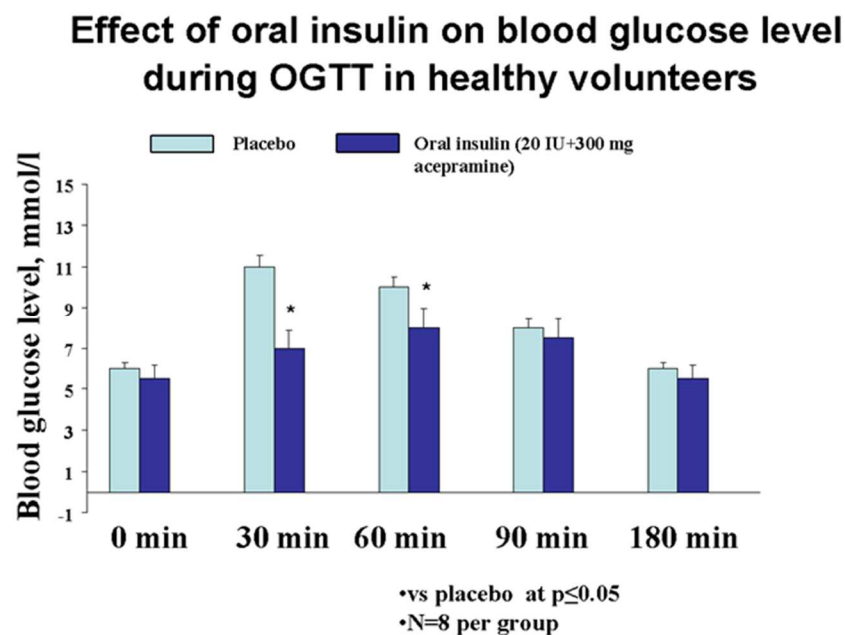
4. Összefoglalva megállapítható:

1. Az inzulin mellett alkalmazott proteáz gátló acepramin gyógyszerként forgalomban van és alacsony toxicitással rendelkezik. Az emberi alkalmazásának felső dózisa 50 g i.v., orálisan gastrointestinalis vérzéseknél ennél is magasabb dózisban alkalmazzák, sőt, gyomormosó folyadékokban is – toxikológiai ellátások alkalmával adják.
2. Az állatkísérletek eredményei alapján megállapítható, hogy az inzulin 1 mg-ja mellett 100 mg-os acepramin dózis elegendő az inzulin hatékony orális felszívódásához. Ennek a dózisnak sem a gastrointestinalis traktusban, sem a szisztémás keringésben nincs az emésztőenzimekre, ill. a plazma proteázokra számottevő gátló hatása, az inzulin micellákban azonban alkalmas arra, hogy az inzulint megvédje a biodegradációtól.

3. Az aminosav származéknak intesztinális transzportere van, ennek következtében ezt a transzportert képes használni az inzulin felszívódásához is.
4. Az inzulin-alacsony dózisú acepramin formailag generikus kombináció, melyhez generikus vivőanyag technológia alkalmazható.

5. Klinikai vizsgálatok

A klinikai vizsgálat 12 egészséges önkéntesen folyt, akik egyszer kapták meg a 20 NE humán rekombináns inzulint és 300 mg acepramint tartalmazó kísérleti készítményt, illetve a kontroll csoport a placebo kapszulát közvetlenül a WHO standardjai szerint elvégzett OGTT (orális glukóz terhelés) vizsgálat előtt.



4. Ábra. Az orális inzulin és a placebo hatása OGTT tesztben

Az eredmények azt mutatják, hogy az orális inzulinnal kezelt önkéntesekben a OGTT teszt 30. és 60. percében a vércukorszint szignifikánsan alacsonyabb, mint placeboval kezeltegyénekben, tehát szorálisan adott inzulin formula szisztémás hatást mutat (4. Ábra).

Tervezett preklinikai vizsgálatok

1. T1DM állatmodellek

A T1DM vizsgálatára a következők a gyakrabban alkalmazott állatmodellek:

Egér modellek

NOD egér: Makino és munkatársai tenyésztették ki 1980-ban [1]

Transzgenikusan módosított NOD egér

Human T1DM-re hajlamosító human HLA transzgenikus egér [2]

CRISPR/Cas9 által gén módosított NOD, több modell [3]

Patkány modellek

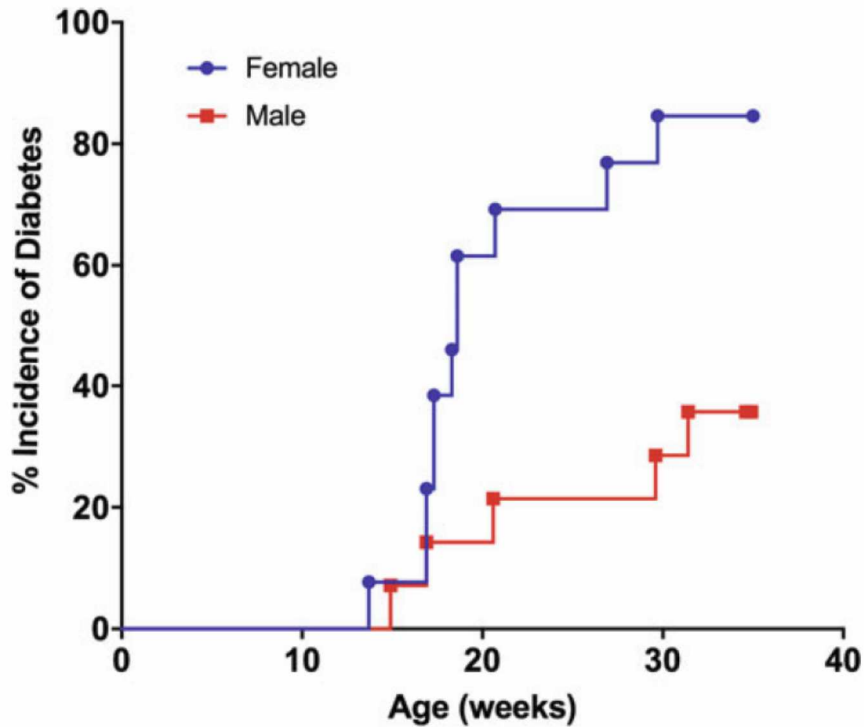
Diabetes-prone BB Rat, LETL, KDP, LEW.1AR1/Ztm-iddm [4]

STZ-vel indukált diabétesz korai szakasza [5]

Kutya: spontán T1DM [6]

A leggyakrabban használt experimentális T1DM modell a NOD egér, amely számos tulajdonságában megfelel a humán T1DM-nek. Az egér törzs eredetileg, mint kataraktára hajlamosító, nem obez diabéteszes (NOD) törzs vált ismertté. A NOD egérben a hasnyálmirigy Langerhans szigetek immunsejtes infiltrációja az 5-6. héten kezdődik el, ami kezdetben csak a szigetek körül jelenik meg, később az immunsejt invázió behatol a szigetekbe. Az szigetek autoimmun gyulladása minden állatban megnyilvánul. A diabétesz tipikusan a 12-14. hét közt jelenik meg a nőstény állatokban, míg a hímekben néhány héttel később és a hímekben a diabétesz incidencia végig alacsonyabb marad (5. Ábra) annak ellenére, hogy az inzulitisz a két nemben hasonló mértékű. A hasnyálmirigy szigetek gyulladós inváziójában CD4+ és CD8+ T sejtek, NK és B sejtek, valamint dendritikus sejtek és makrofágok vesznek részt. Az autoimmun folyamat fenntartásában a CD4+ és CD8+ T sejtek a vezető szerep, tisztított CD4+ és CD8+ T sejtekkel a betegség passzívan átvihető másik állatra [7], míg ez nem érhető el a diabéteszes állatban megjelenő autoantitestekkel [8]. A B sejtek ugyanakkor szükségesek az inzulitisz progressziójához. Az emberi diabéteszhez hasonlóan az autoantitestek NOD egérben is előre jelzik a diabétesz megjelenését [9]. Az autoantitestek szerepe vitatott a betegségben, de a B sejt funkció jelentős csökkenésével, a diabétesz megjelenése is visszaszorul [9]. A diabétesz incidenciája NOD tenyészetben akkor a legmagasabb, ha az állatokat germ-free környezetben tartják [10]. A NOD egér

hajlamos más autoimmun megbetegedésekre is, mint tireoiditisz, polineuropatia, SLE. Több lókus felelős a T1DM rizikóért NOD egérben, közülük a legfontosabb egy sajátos MHC komplex, a H-2g7 [11].

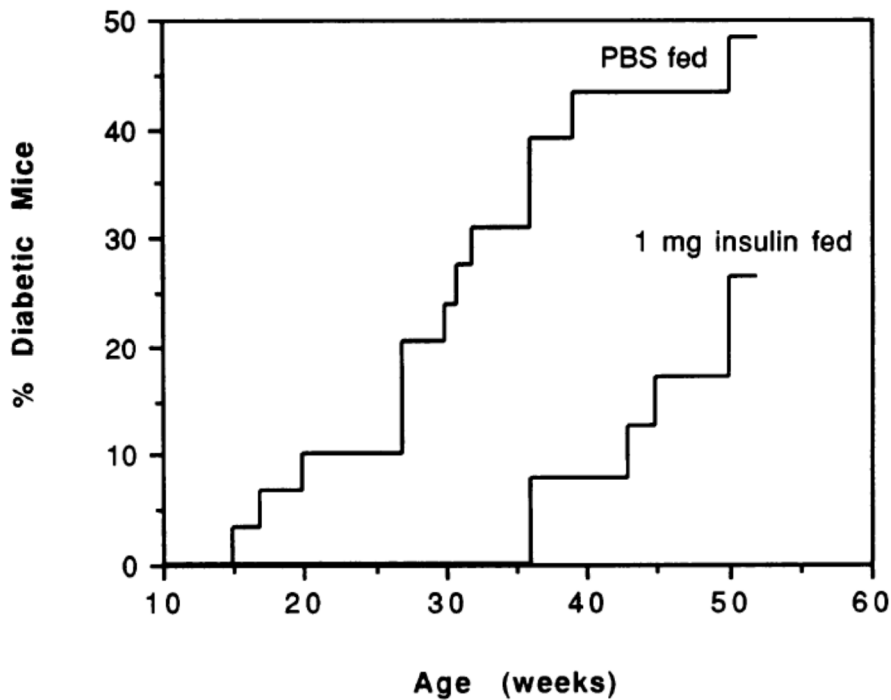


5. Ábra. A diabétesz megjelenése ideje nőstény és hím NOD egérben.

Az egér genom két inzulin gént tartalmaz különböző kromoszómákon. Ins1 elsősorban a β sejtekben fejeződik ki, míg az Ins2 a β sejtek mellett a timuszban is expresszálódik. Az Ins1 deléciója esetén a NOD egérben nem alakul ki diabétesz, míg az Ins2 knock-out egérben gyorsan kialakul a diabétesz. Ez arra utal, hogy az Ins1 az autoimmunitás célpontja, míg az Ins2 akár protektív hatású is lehet [12]. Az Ins1 cseréje humán inzulin génre CRISPR/Cas9 segítségével a human inzulin szekrécióját, human C-peptid megjelenését eredményezte [13]. Az így létrehozott transzgenikus egér glukóz toleranciája normális és a T1DM csak később, és csak az egerek 15-20%-ban alakul ki.

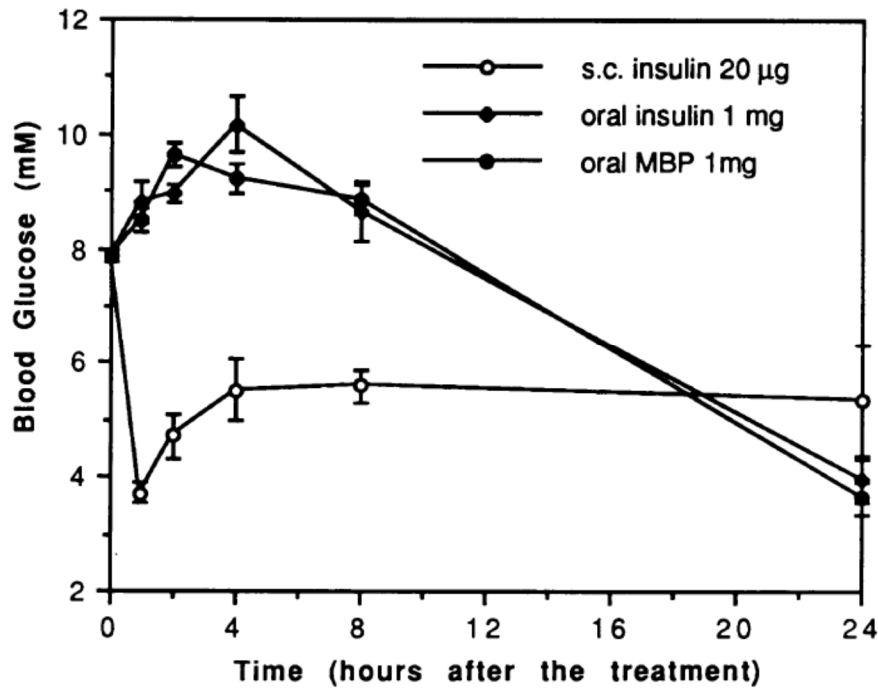
NOD egér modellben is az inzulin a legfőbb autoantigén. A diabétesz kialakulásával párhuzamosan inzulin fragmens specifikus T sejtek jelennek meg NOD egérben és ezekkel a sejtekkel a betegség átvihető egészséges állatra. Az inzulin specifikus, immunogén szakaszának mutációja megszünteti a betegséget kialakulását. Az inzulin epitópok közül B:9-23; B13-21 és B12-20 játszik kitüntetett szerepet az autoimmunitás és a tolerancia kialakulásában [14].

Az inzulintolerancia hatását a T1DM megjelenésén először NOD T1DM egér modellen vizsgálták [15]. Öt hetes nőtény NOD egereket 10, 100 és 1000 µg disznó inzulinnal hetente kétszer kezeltek egy éven keresztül. Az 1 mg dózis jelentősen csökkentette a diabétesz megjelenését az egerekben (6. Ábra).



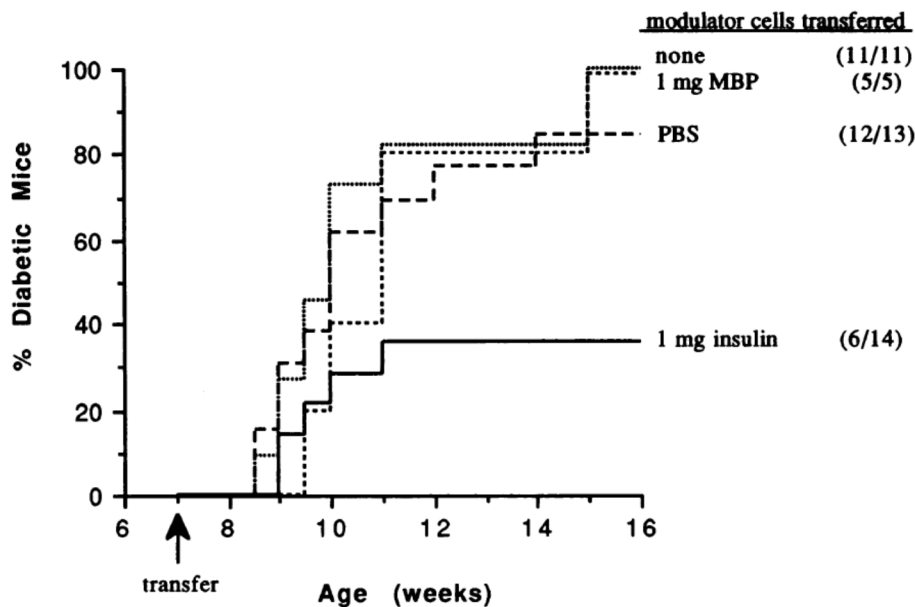
6. Ábra. Az orálisan adagolt inzulint hatása a diabétesz megjelenésére NOD nőtény egerekben (P=0,02 Kaplan-Meier analízis).

Az orálisan alkalmazott nagy dózisú inzulint nem rendelkezett metabolikus hatással, nem csökkentette az egerek vércukorszintjét (7. Ábra).



7. Ábra. Az orálisan és sc. adott inzulin hatása hét hetes nőstény NOD egerek vércukorszintjére.

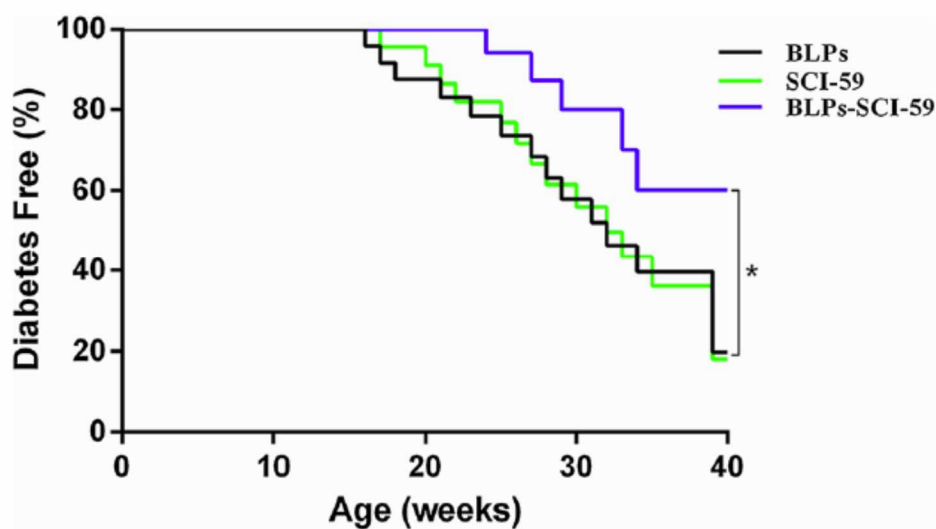
Az inzulin kezelés ugyancsak csökkentette a NOD egerekből származó lépsejt transzplantációjával kiváltott diabéteszt, ha a lépsejt donor egereket előtte nagy dózisu inzulinnal kezelték két héten át (8. Ábra).



8. Ábra. Az orális inzulin kezelés hatása a NOD egertől származó lépsejt transzferrel kiváltott diabétesz megjelenésére.

Pham és munkatársai vizsgálatai szerint, akik megismételték a NOD egereken az inzulinnal kiváltható immunológiai tolerancia vizsgálatot [16] és nem tapasztalták a nagy dózisú inzulin kezelés diabétesz protektív hatását, az egér kolónia eredete, mikrobiális flórája, az alkalmazott inzulin eredete és tisztasága alapvetően befolyásolhatja az orális inzulinnal kiváltható toleranciát és T1DM elleni védelmet.

Újabb vizsgálatok szerint az egérben az inzulin mellett single-chain inzulin (SCI-59; 8 tagú linker az A és B lánc közt) orális adásával is kiváltható immunológiai és terápiás hatás [17](9. Ábra).



9. Ábra A T1DM mentes állatok aránya napi po SCI-59 vagy placebo (BLP) kezelést követően. (n=15 / csoport), T1DM diagnózis glukóz vérszint >11.1 mmol/L. * p < 0.05 [17]

Annak ellenére, hogy a NOD egér a T1DM leginkább használt állatmodellje, az immunológiai intervenció hatása sok esetben különbözik a humán diabéteszben és a NOD modellben. Az 5. Táblázat a fontosabb eltérő reakciókat foglalja össze.

Kezelés	Preklinikai eredmény	Klinikai vizsgálat eredmény	Nehézségek az összehasonításban
Parenterális inzulin	Gátolja a T1DM kialakulását NOD egérben.	Nem véd T1DM ellen magas rizikójú egyéneknél.	Nem összehasonlítható dózisos.

Orális inzulin	<p>Sertés inzulin gátolja T1DM kialakulását NOD-ban</p> <p>Rekombináns human inzulin gátolja az sziget infiltráció kialakulását</p> <p>Egyetlen aminosav csere a B30-as pozícióban gátolja az inzulin toleranciát NOD egérben</p>	<p>Egészeben nem állítja meg a T1DM progresszióját, de hatást mutat magas anti-inzulin titerű T1DM betegekben.</p>	<p>A tolerancia kialakulásának inzulin típus specificitása csak a klinikai vizsgálatok alatt vált nyilvánvalóvá.</p> <p>Csak néhány inzulin forma eredményez citokin termelést.</p>
Teplizumab és oteelixumab (FcR non-binding anti-CD3 mAbs)	<p>Meggátolta az alacsony dózisu STZ-vel kiváltott diabéteszt egérben visszafordítja DM-t meggátolja NOD újszülöttekben T1DM kialakulását.</p>	<p>A kezelés magasabb C-peptid szintet tart meg és csökkenti az inzulin igényt nemrég kialakult T1DM-ben.</p> <p>Csökkenti a β-sejt pusztulást</p>	<p>A hatás nem volt tartós, mint egérben, de néhány egýen erőteljesen reagált.</p>
Rituximab (anti-hCD20)	<p>Megelőzte a T1DM kialakulását és visszafordította hiperglikémiát hCD expresszázó transzgenikus NOD egérben.</p> <p>Szabályozó B sejtek kialakulását váltotta ki.</p>	<p>C-peptid érték javult 1, de nem volt hatás 2 év után.</p>	<p>Átmeneti hatás.</p> <p>Az autoantigénekre kifejtett hatás bizonytalan.</p>
Abatacept (CTLA4-Ig)	<p>Megelőzte T1DM kialakulását NOD fiatal egérben, de nem volt hatásos 8 hetes kor után.</p> <p>CTLA4-Ig transzgen gyorsította T1DM kialakulását NOD egérben.</p>	<p>Késleltette a C-peptid csökkenést.</p>	<p>Különbségek a betegség kinetikájában?</p> <p>Különbségek CD28 expressziójában a T Sejteken.</p>
Rapamycin és IL-2	<p>A kombináció gátolta a T1DM kialakulását NOD egérben.</p> <p>A kezelt egerekben emelkedett FoxP3⁺ T_{REG} sejtek száma.</p>	<p>A kezdeti gyenge eredmények miatt a vizsgálatot felfüggesztették.</p>	<p>Rapamycin toxikus lehet a β sejtekre, amit a fokoz az IL-2.</p> <p>NK sejt emelkedés lehet felelős a β-sejt pusztulásért.</p> <p>Az IL-2 NK sejtekre kifejtett hatását elfedheti az NK-t érintő mutáció NOD-ban.</p>
Antithymocya globulin	<p>Megelőzte T1DM-t vagy késleltette a progressziót.</p> <p>Exendin-4 (glucagon-like peptide 1 receptor agonist) együtt visszafordította T1DM-t NOD egérben.</p>	<p>Nem védte a β-sejt funkciót.</p> <p>Nem emelte a T_{REG} sejtek arányát.</p>	<p>A komplement hiány NOD egérben magyarázhatja miért élhetnek túl az indukált T_{REG} sejtek egérben.</p>

Alefacept (soluble LFA3-Ig)	Elősegítette az inzulinoma graftok túlélését.	Nincs különbség a 2 h, de emelkedett 4 h C-peptid válasz	Az egérben nics CD2 kötő <i>CD58</i> gén, az egér <i>CD48</i> alacsonyabb aktivitással köti a VD2-t
		Csökkent effektor és memória T sejt.	
Sitagliptin és lansoprazole	Visszafordítja aT1 DM-t egérben	Nincs hatással C- peptid válasza új betegekben	Nem világos az autoimmunitásra kifejtett hatás. Különböző a β sejtek proliferációs kapacitása.

5. Táblázat. Immunológiai intervenciók hatása human T1DM-ben és a NOD egérmodellben.

Preklinikai vizsgálati terv

Az orális inzulinnal kiváltott experimentális T1DM prevenció és terápiás vizsgálatokat szinte minden esetben NOD egér modellen végezték, kizárólag ebben a modellben rendelkezünk megbízható bizonyítékkal, hogy az orálisan adott inzulin képes a T1DM kialakulását és lefolyását megváltoztatni. Ezért ezt a kísérletes modellt választjuk az orális inzulin formula T1DM-ben kifejtett hatásának a vizsgálatára.

A korábbi vizsgálatok tanulságai, amit figyelembe kell venni a kísérletek tervezésénél.

Az orális inzulinnal elérhető prevenció és terápiás hatás szélsőséges variabilitást mutat az egyes vizsgálóhelyeken. Az eltérő eredmények oka nem pontosan ismert, feltételezik, hogy a következő faktoroknak lehet elsődleges szerepe:

- a tenyészet eredete
- a mikrobiológiai környezet, a bélflóra összetétele
- az inzulin minősége
- a táp minősége,
hipoallergén táp erősen gátló hatású [18]
alacsony AGE (Advanced Glycation End product) tartalom gátol [19]

Ezekre a tényezőkre figyelmet kell fordítani, ismerten megbízható forrásokból származó állatot, tápot kell használni vizsgálatokban.

NOD (NOD/LtJ) egér több megbízható forrásból, így Jackson Laboratory, Taconic, Charles River (Jax strain), Shanghai Slaccas Experiment Animal Limited Company beszerezhető. Vizsgálatokban nőstény állatokat érdemes használni a magasabb a T1DM megjelenési arány miatt.

Inzulin: mind sertés inzulinnal (Sigma-Aldrich), mind rekombináns human inzulinnal (Humilin R, Eli Lilly hígítás savas, Ph:2.5 PBS-ben) közöltek pozitív eredményeket.

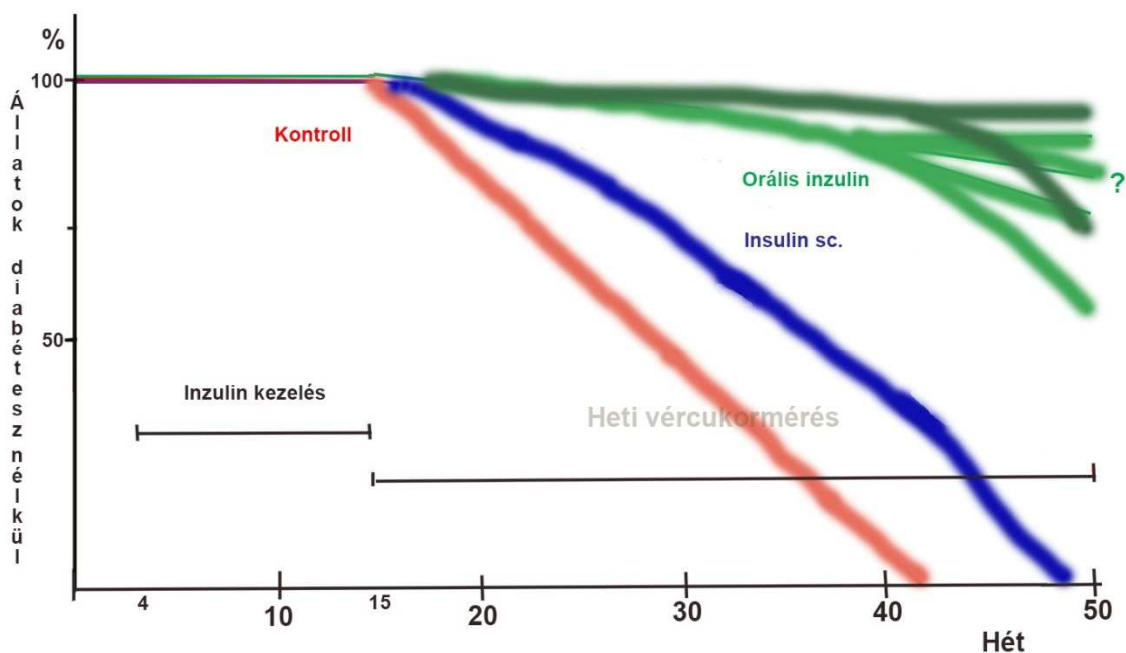
1. . Az orális inzulin formula preventív hatásának vizsgálata NOD T1DM modellben

1.1. A vizsgálat célja, rövid leírása

A prevenció vizsgálatban a nőstény NOD állatok kezelését a lehető legkorábbi, 4 hetes korban kezdjük el, mert a betegség korai stádiumában a könnyebben kiváltható immunológiai tolerancia [20]. Az orális formulából a beadott inzulin mintegy 30%-a felszívódik és szisztémás metabolikus hatást fejt ki (4. Táblázat). Ismeretes, hogy a sc. adott inzulin NOD egérben késlelteti, de nem szünteti meg a diabétesz megjelenését [21, 22]. A hatás valószínű oka, hogy az a β sejtek működése exogén inzulin hatására visszatorzul, így kevésbé működnek immunológiai targetként is. Ezért vizsgálatban szisztémás inzulin hatását is mérni kell (sc. inzulinnal kezelt kontroll), hogy lássuk a hatás milyen részéért felelős az inzulin szisztémás hatása, illetve az orális inzulin által kiváltott immunológiai tolerancia. Több T1DM modellben végzett vizsgálat igazolta, hogy a toleranciát kiváltó antigén dózis alapvetően befolyásolhatja az immunológiai tolerancia kialakulását, ezért az orális inzulin formulát minimum két dózisban kell vizsgálni. NOD egérben a diabétesz megjelenése után kialakuló súlyos hiperglikémia (akár 600 mg/dl) 5-10 hét alatt az állatok pusztulásához vezet, ezért a 400 mg/dl-es vércukorszint elérésekor a felesleges szenvedés elkerülése érdekében extermálnni fogjuk az állatokat.

Az állatokat négy csoportra osztjuk, az első, kontroll csoportot a vivőanyagokkal kezeljük, a második és harmadik csoportot a maximálisan tolerált orális inzulin formulával és annak egy tized részével kezeljük orálisan, a negyedik csoport az orális inzulin formula 30%-nak megfelelő mennyiségű inzulint kap sc. Az orális inzulin formula tervezett magas dózisa 0.5, az alacsony dózisa 0,05 U/állat, ennek megfelelően a sc. inzulin dózisa 0,15 U/állat. Az sc. adott alacsony inzulin dózissal (0,015U/ állat) ismertén nincs érdemleges hatása a NOD egérben a diabétesz megjelenésére, ezért az alacsony sc. inzulin dózist nem vizsgáljuk. A 0,15 U/állat sc. inzulin dózist korábbi kísérletben tolerálták az állatok [21]. Az állatok kezelését heti öt alkalommal végezzük az 4.-től a 15. hetes korig. A 10 hetes kortól, hogy a dózis lépést tartson az állatok növekedésével az inzulin dózist megduplázzuk. A kezelést nem folytatjuk a 15

hetes kor után, hogy az inzulin kezelés ne fedje a kialakuló diabéteszt. A 15. héttől az állatok vércukorszintjét hetente ellenőrizzük a farok, vagy szemzug vénából vett vérben. Az állatok megfigyelését 10 héttel tovább folytatjuk, mint amikor a kontroll csoportban a diabétesz előfordulása (vércukorszint > 250mg/dl) eléri a 90%-t (kb. a 40. hét). Amennyiben az orális inzulin formula hatására a diabétesz megjelenése legalább 30%-kal csökken, akkor csoportonként 25 nőstény egeret vizsgálva nagy biztonsággal ki tudjuk mutatni a hatást. A tervezett inzulin dózis jelentős, testsúlyra vonatkoztatva mintegy 50-100x nagyobb, mint a humán inzulin igény, így megfelel a nagy dózisú deszenzitizáció koncepciójának. Csoportonként további 5-5 állatot is vizsgálatba állítunk a hasnyálmirigy hisztológiai vizsgálat céljára, az inzulin autoantitest szint mérés, valamint a vérben és a hasnyálmirigy körüli nyirokcsomókban a Treg sejtek számának meghatározására. Ezeknek az vizsgálatoknak az időpontját a diabétesz progressziója alapján fogjuk meghatározni. A kezelések és vizsgálatok ütemezését, valamint a vizsgálat feltételezett kimenetét a 10. Ábra szemlélteti.



10. Ábra. A kezelés és a vércukormérés ütemezése, valamint a vizsgálat feltételezett kimenetele NOD egéren végzett T1DM preventív vizsgálatban.

1.2. A tervezett vizsgálatok részletes leírása

Anyag:

- NOD/ShiLtJ egér
- Tenyésztő: Jackson Laboratory
- Beszerzés: 125 db 3 hetes nőstény egér
- Ár: 42.36 \$/egér
- Teljes ár: 1.556.562 Ft (USD árf.:292,5 Ft)
- Hepa filteres Micro-Isolator rendszerben, vagy Hepa filteres BioContaiment rendszer az egerek tartására
- Zsilipelt, VAF (vírus ellenanyagtól mentes) állatház
- Táp: besugárzott PicoLab Rodent Diet 20, #5053 (LabDiet, vagy LabSupply) vagy autóklávozzható 5K52 (LabDiet) és sterilizált vizet kapnak ad libitum.
- Jelölés: Ear tag (egér jelölő rendszer), Jackson Laboratory



Insulin:

- Orális inzulin formula formula: 10U Humulin R (Ely Lilly) + 10 mg Acepremin
- Humulin R 100 U/ml (Eli Lilly) injekció oldat
- Vércukormérő: Dcont Nemere, iHealth Smart BG5, vagy Roche Accu-Chek Instant
- Vizelet glukóz vizsgáló teszt csík, CYBOW™ Urine Reagent Strip
- Egér/Patkány C-peptid ELISA Kit (Sigma, EZRMCP2-21K)
- Lympholyte®-M (Mouse) egér limfocita izoláló médium Tebu-Bio
- Treg flow cytometry kit (BioLegend, San Diego).
- Human Inzulin Elisa Kit, Mercodia, 10-1132-01; (elhanyagolható keresztreakció egér inzulinnal)
- Mouse Insulin Autoantibody (IAA) ELISA Kit; Abbexa, abx053161
- CD90.2 (Thy-1.2) Monoclonal Antibody (30-H12), Biotin konjugált, ThermoFisher
- Polyclonal Guinea Pig Anti-Insulin (DAKO)

1.3. A vizsgálat menete

A 3 hetes nőstény NOD/ShiLtJ egereket egy hetes karantén után vonjuk vizsgálatba. Az állatokat 12/12h világos, sötét ciklusú megvilágítású, 18-23°C-os, 40-60% páratartalmú állatszobában tartjuk. Az hepa filteres állattartó dobozok, vagy hepa filteres biocontainer, valamint a zsilipelt, VAF (vírus ellenanyagtól

mentes) állatház biztosítja majd az állatok mikrobiológiai flórájának állandóságát. Ugyancsak ezt szolgálja, hogy az állatokkal végzett minden manipuláció steril levegőjű fülkében történik, a gondozók és a kezelő személyzet védőfelszerelést (steril köpeny, maszk, kesztyű stb.) visel. Az egerek ad libitum jutnak hozzá a steril táphoz és ivóvízhez. A vizsgálati stressz csökkentésére az állatokat dúsított környezetben tartjuk. Az állatok egyedi jelölését fülbe erősíthető fém lappal (ear tag, Jackson Laboratory) fogja elvégezni a következő módon.

Csoport	Jelölés	Kezelés/ 5-15. hét
Kontroll	1-25	Hetente 5x orális és sc. inzulin oldószer
Orális inzulin formula, nagy dózis	26-50	Kezelés hetente 5x 5-9. hét 0,5U/egér orális inzulin formula, 10-15. hét 1U/egér orális inzulin formula, sc. kezelés inzulin oldószer
Orális inzulin formula, kis dózis	51-75	Kezelés hetente 5x 5-9. hét 0,05U/egér orális inzulin formula, 10-15. hét 0,1U/egér orális inzulin formula, sc. kezelés inzulin oldószer
Szubkután inzulin	76-100	Kezelés hetente 5x 5-9. hét 0,15U/egér sc. Humulin R inzulin, 10-14. hét 0,3 U/egér sc. Humulin R inzulin, po orális inzulin oldószer
Funkcionális vizsgálatok	101-125	Funkcionális vizsgálat, előkísérlet 101-107 0.5 U/egér orális inzulin formula; 109-114 sc 1015 U/ egér; 114-21 Kontroll, kezelés hetente 5x

Az egerek karantén ideje alatt ellenőrizzük, hogy a NOD/ShiLtJ egér tolerálja a tervezett kezelést. Két állatot az orális inzulin formula növekvő, 0,1U; 0,25U; 0,5U; 1U; 2U dózisaival orálisan, két egeret a Humulin R 0,05; 0,1; 0,2; 0,4, 0,8 U/egér sc. dózisaival kezelünk egymást követő napokon. Megfigyeljük az állatok viselkedését, és a felső két dózisban kezelést követő 1 és 3 óra múlva meghatározzuk az állatok vércukorszintjét, valamint vér inzulin szintjét human inzulin specifikus ELISA kittel.

A NOD egészen végzett próbakezeléssel megerősített, vagy esetleg módosított dózissal 4 hetes kor után elindítjuk az egerek kezelését. Amennyiben az inzulin kezelés következtében hipoglikémia lépne fel (nem várt esemény), akkor 1 ml 5% szőlőcukor tartalmú Ringer oldatot fecskendezünk be a tüneteket mutató állatoknak sc.

Az állatok testsúlyát hetente azonos napon megmérjük. A 14. héten az állatok kezelése befejeződik. A 15. héttől kezdődően minden héten megmérjük az egerek vércukorszintjét a fark vénából, nehézség esetén a periobitális vénából vett mintában. A glukóz meghatározás előtt nem éheztetjük az állatokat, a méréseket mindig a de. 10-12h időszámban végezzük. Azoknál az állatoknál, ahol a vércukorszint magasabbnak adódik, mint 250 mg/dl (13.9 mmol/l), a következő napon ismételt megmérjük a vércukorszintet, valamint a vizelet cukor szintjét. A mérésekhez Dcont Nemere, vagy ekvivalens glukóz mérőt, illetve Cybow vizelet glukóz teszt csíkot használunk. A két egymást követő napon 250 mg/ml-nél magasabb vércukorszinttel rendelkező állatokat diabéteszesnek tekintjük. A diabéteszessé vált állatokat, ha a vércukorszintjük eléri a 400 mg/dl értéket ip. adott pentobarbitállal túlaltajuk, majd a hasnyálmirigyet eltávolítjuk, a páratlan mintákat 4%-os formalinban fixáljuk, a páros mintákat folyékony nitrogénben lefagyasztjuk, majd -70 °C-on tároljuk.

A 16. és 20. héten csoportonként 10-10 egértől (az első, majd a második 10 egér) C-peptid meghatározásra 0,2 ml vérmintát veszünk. Az EDTA-val alvadást gátló vért 4 °C-on lecentrifugáljuk és a plazmát feldolgozásig -20 °C-on tároljuk. További C-peptid meghatározásról a diabétesz megjelenése szerint döntünk majd.

Ugyan ezekben a mintákban meghatározzuk az inzulin ellenes autoantitetek szintjét egy érzékeny ELISA módszerrel [23].

Treg sejtek meghatározása:

A funkcionális vizsgálatra kezelt állatokból a kísérlet lefolyása által meghatározott két időpontban 3-3- t állatot feláldozunk, narkózisban a szívpunkcióval vért nyerünk, (kb. 0,5 ml) majd az alvadást gátló vérből a magvas sejteket Lympholyte®-M (Mouse) egér limfocita izoláló médiumon (Tebu-Bio) izoláljuk. A Treg sejtek számát Treg flow cytometry kit (BioLegend, San Diego) segítségével meghatározzuk. Ugyancsak eltávolítjuk a hasnyálmirigy körüli nyirokcsomókat és a Treg flow cytometry kit-t használva meghatározzuk a nyirokcsomóban található Treg limfociták arányát.

Hisztológiai vizsgálat:

A formalin fixált, paraffinba ágyazott metszeteket hematoxin-eozinnal festjük. A metszeteken 100 hasnyálmirigy szigeten a következők szerint kategorizáljuk az immunreakció mértékét:

nincs gyulladásoos reakció (0)

csak sziget körüli, vagy kisebb, mint 25% infiltráció (1)

25–75% infiltráció (2)

nagyobb, mint 75% infiltráció (3).

A fagyasztott szövetek a vizsgálati eredmények alapján felmerülő további kérdések (pl. reziduális inzulin expresszó, az infiltráló sejtek tipizása) megválaszolására szolgálnak, felhasználásukról csak az eredmények függvényében fogunk dönteni.

Statisztikai analízis:

A diabétesz mentes túlélési idő vizsgálatára a Kaplan-Meier tesztet használjuk és a $p < 0.05$ értéket tekintjük szignifikánsnak. A több csoportos adatok értékelésére ANOVA és Bonferroni teszteket fogunk használni.

Értékelés:

A legfontosabb kérdés, hogy az diabétesz megjelenését késlelteti-e az orális inzulin formula kezelés. Erre a diabétesz megjelenési idő Kaplan-Meier analízise ad választ. Amennyiben a kezelés késlelteti a diabétesz megjelenését előtérbe kerül a hatás mechanizmusa. A Treg sejtek száma, a szigeteket infiltráló sejtek típusa bizonyíthatja, hogy a T1DM preventív hatás az inzulinnal kiváltott toleranciának a következménye.

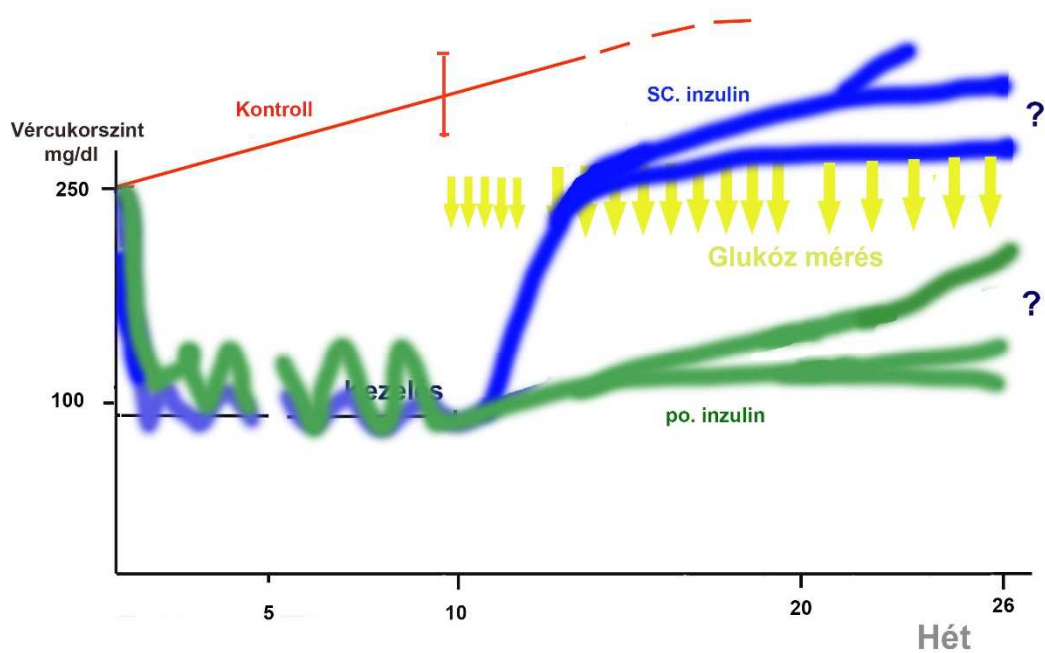
2. Az orális inzulin formula terápiás hatásának vizsgálata NOD T1DM modellben

2.1. A vizsgálat célja, rövid leírása

A vizsgálat célja annak eldöntése, hogy a már kialakult diabéteszben az orális inzulin formula kezelés képes-e hosszantartó remissziót kiváltani. Az orális inzulin formula szisztémás inzulin hatással is rendelkezik, ami befolyásolhatja a T1D lefolyását, a β -sejtek kimerülését, ezért az orális inzulin által kiváltott immunológiai tolerancia és a szisztémás inzulin hatás megkülönböztetésére megvizsgáljuk a parenterálisan adott inzulin hatását is. A parenterálisan adott inzulin mennyiségét úgy választjuk meg, hogy azonos hatású legyen, mint az orális inzulin formula szisztémás inzulin hatása.

A NOD egereket (összesen 50 egér) csak akkor vonjuk kezelésbe, amikor diabeteszessé válnak (vércukorszint $> 250\text{mg/dl}$). A nőstény diabeteszes egereket három csoportra osztjuk, egy csoport

kontrollként szolgál, egy csoport orális inzulin formula kezelést kap, a harmadik csoport sc inzulin kezelésben részesül. Öt hét kezelés után maximum öt napra az inzulin kezelést felfüggesztjük, hogy megbecsüljük az endogén inzulin termelés állapotát a vércukorszint változása alapján. Amennyiben az vércukorszint 250 mg/dl fölé emelkedik az inzulin kezelést újraindítjuk további 5 hétig (összesen 10 hét). A terápia hatását a diabétesz megjelenése (vércukorszint >250 mg/dl) alapján mérjük. A hosszú követés célja a hatás tartósságának (átmeneti vagy esetleg tartós hatás) meghatározása. A kezelések és vizsgálatok ütemezését, valamint a vizsgálat feltételezett kimenetét a 11. Ábra szemlélteti.



11. Ábra Ábra. A kezelés és a vércukormérés ütemezése, valamint a vizsgálat feltételezett kimenetele NOD egéren végzett T1DM terápiás vizsgálatban.

Anyag, módszer:

- NOD/ShiLtJ egér
- Tenyésztő: Jackson Laboratory
- Beszerzés: 70 db 10 hetes nőstény egér (Ár: 42.36 \$/egér)
- Teljes ár: 867000 Ft (Ár: 42.36 \$/egér, USD árf.:292,5 Ft)

- Hepa filteres Micro-Isolator rendszerben, vagy Hepa filteres BioContaiment rendszer az egerek tartására
- Zsilipelt VAF (vírus ellenanyagtól mentes) állatházban.
- Táp: PicoLab Rodent Diet 20, #5053 (LabDiet, vagy LabSupply), vagy vagy autóklávozzható 5K52 (LabDiet), sterilizált víz ad libitum.
- Jelölés: Ear tag (egér jelölő rendszer), Jackson Laboratory

Insulin:

- Oral insulin formula: 10U Humulin R (Ely Lilly) + 10 mg Acepremin
- Humulin R 100 U/ml (Eli Lilly) injekció oldat
- Vércukormérő: Dcont Nemere, iHealth Smart BG5, vagy Roche Accu-Chek Instant
- Vizelet glukóz vizsgáló teszt csík, CYBOW™ Urine Reagent Strip
- Egér/Patkány C-peptid ELISA Kit (Sigma, EZRMCP2-21K)
- Mouse Insulin Autoantibody (IAA) ELISA Kit; Abxexa, abx053161
- Alzet ozmotikus minipumpa, (Alzet model 1002)
- Lympholyte®-M (Mouse) egér limfocita izoláló médium Tebu-Bio
- Treg flow cytometry kit (BioLegend, San Diego).

2.2. A vizsgálat menete

Az egereket vércukorszintjét az állatok 11 hetes korától hetente kétszer (hétfő, csütörtök délelőtt) a farokvénából, vagy a periorbitális vénás plexusból vett vérben meghatározzuk. Amennyiben a vércukorszint 250 mg/dl-nél magasabb a mérést a következő napon megismételjük. Az egymást követő napokon 250 mg/dl értéknél magasabb vércukor értéket mutató állatokat diabéteszesnek tekintjük és kezelésüket a következő napon elkezdjük. Az állatok egyedi jelölését fülbe erősíthető fém lappal (ear tag, Jackson Laboratory) végezzük a következők szerint:

Csoport	Jelölés	Kezelés / 10 héten át
Kontroll	1-10	Hetente 7x orális inzulin formula oldószer
Orális inzulin formula	11-30	Hetente 7x, 2U / egér orális inzulin formula
Szubkután inzulin	31-50	0,3 U/nap Humulin R, Alzet ozmotikus minipumpa

A NOD1 nőstény egerekben a diabétesz legnagyobb gyakorisággal a 15 hét körül jelentkezik és 30. hétre az egerek mintegy 80%-ban kialakul. A vizsgálatot 70 nősrény egérrel indítjuk, hogy a csoportokhoz szükséges 50 állatot 2-3 hét alatt ki tudjuk választani.

A kontroll csoportot az orális inzulin hígítására használt oldószerrel kezeljük orálisan, 0,1 ml/10g testsúly térfogatban naponta egyszer 10 hétig. A kontroll állatokban heti két alkalommal ellenőrizzük a vércukorszintet, ha a vércukorszint a 400 mg/dl-es szintet ismételten eléri az állatokat ip. nembutal injekcióval elaltatjuk, szívpunkcióval vért veszünk, a plazmát izolálunk autoantitest és C-peptid meghatározás céljára. A mintákat a felhasználásig -20 °C-on tároljuk.

A vizsgálatban tervezett orális inzulin formula dóziséát és a kezelés ütemezését előkísérletben kell ellenőrizni. Az eddigi eredmények alapján feltehető, hogy sikerül olyan dózist találni, ami napi egyszeri kezeléssel is elfogadható tartományban (50-200mg/dl) tartja az egész nap az egerek vércukorszintjét. Az előkísérletben diabéteszes NOD egereket (2-2 egér, vércukorszint ismételten magasabb, mint 250mg/dl) az orális inzulin formula 2 és 4 U/egér dóziséával orálisan kezeljük, majd 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24 óra múlva végzett méréssel meghatározzuk az állatok napi vércukor profilját. Ha szükséges, a napi dózist és a kezelési ütemezést úgy módosítjuk (dózis emelés, csökkentés vagy napi kétszeri kezelés), hogy a napi minimális és maximális vércukorszint az 50-200 mg/dl tartományban maradjon.

Az előkísérletben kiválasztott orális inzulin formula dózis és ütemezés szerint indítjuk el az állatok kezelését.

A parenterális inzulin kezelést Alzet ozmotikus minipumpa használatával fogjuk végezni. Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy Alzet ozmotikus minipumpával adagolt inzulinnal több, mint két hétig a normális tartományban tartható a NOD1 diabéteszes egerek vércukorszintje (Comp Med. 2012; 62(5): 381–390). Az egerekbe 50 U/ml Humulin R-el feltöltött Alzet ozmotikus minipumpát fogunk beültetni, amely napi 0,3 U folyamatos inzulin kezelést biztosít és fenntartja a normális vércukorszintet NOD1 egerekben [24]. Az egerek leborotvált bőrét alkoholos jóddal fertőtlenítjük, majd izoflurán narkózisban kis vágáson keresztül intraperitoneálisan behelyezzük a gyártó használati utasítása szerint előkészített ozmotikus minipumpát, majd a sebet kapcsokkal zárjuk. Az Alzet minipumpákat 16-18 naponként cseréni fogjuk. Hetente egyszer meghatározzuk a csoportban két állat vércukorszintjét, továbbá soron kívül megvizsgáljuk a tüneteket vagy szokatlan viselkedést mutató állatok vércukorszintjét.

Az orális inzulin formulával végzett kezelés során (kezelési térfogat 0,1ml/10g testsúly) hetente egyszer meghatározzuk két állat glukóz profilját (a kezelés előtt és 3, 9, 18, 24 órával utána) valamint ugyancsak meghatározzuk a tüneteket, vagy eltérő viselkedést mutató állatok vércukorszintjét. Az eredmények függvényében az orális inzulin formula dóziséát, vagy a kezelés ütemezését módosíthatjuk, hogy az egerek napi vércukorszintje az meghatározott tartományban maradjon.

Öt hét kezelés után 5 napra felfüggesztjük az orális inzulin adását, hogy megbecsüljük az egerek inzulin termelését. A kezelés felfüggesztését követően naponta mérjük (délelőtt) az egerek vércukorszintjét és plazma mintát nyerünk C-peptid meghatározásra, valamint figyeljük az állatok viselkedését. Amennyiben a vércukorszint öt napnál hamarabb 250 mg/dl fölé emelkedik az orális inzulin kezelést újraindítjuk és a 10. hét végéig folytatjuk. Az inzulin dózis módosítására, az állatok vércukor profilja alapján ebben az időszakban is sor kerülhet.

A tíz hét inzulin kezelési időt követően öt napon keresztül naponta, majd hetente kétszer meghatározzuk az állatok vércukorszintjét. A 13. és 15. és héten vért veszünk a Treg sejtszám, valamint plazma mintát (50 µl) nyerünk C-peptid és autoantitest szint meghatározásra, amit -20 °C-on tárolunk felhasználásig. A Treg limfociták meghatározáshoz poolozzuk az 50 µl-es vérmintákat.

Amennyiben egy állat vércukorszintje ismételtelen 400 mg/dl fölé emelkedik az állatot extermináljuk, a hasnyálmirigyet eltávolítjuk a páratlan mintákat 4 %-os formalinban fixáljuk, páros mintákat gyors fagyasztás után -70 °C-on tároljuk.

C-peptid meghatározás:

C-peptid szint meghatározását Egér/Patkány C-peptid ELISA Kit-el (Sigma, EZRMCP2-21K) végezzük

Inulin ellenes autoantitest meghatározás

Az inzulin ellenes autoantitest szint meghatározására egy érzékeny ELISA módszert, Abbexa, abx053161 [24] használunk.

Treg limfocita meghatározás:

A csoportonként poolozott 50 µl-es mintákból Lympholyte limfocita izoláló médiumban szeparáljuk a limfocitákat, majd Treg flow cytometry kit segítségével meghatározzuk a Treg limfociták arányát.

Hisztológiai vizsgálat:

A formalin fixált, paraffinba ágyazott metszeteket hematoxin-eozinnal festjük. A metszeteken 100 hasnyálmirigy szigeten a következő értékelés szerint kategorizáljuk az immunreakció mértékét:

nincs gyulladós reakció (0)

csak sziget körüli, vagy kisebb, mint 25% infiltráció (1)

25–75% infiltráció (2)

nagyobb, mint 75% infiltráció (3).

A fagyasztott szövetek a vizsgálati eredmények alapján felmerülő további kérdések (pl. reziduális inzulin expresszó, az infiltráló sejtek tipizásála) megválaszolására szolgálnak, felhasználásukról csak az eredmények függvényében fogunk dönteni.

Statisztikai analízis:

A diabétesz mentes túlélési idő vizsgálatára a Kaplan-Meier tesztet használjuk és a $p < 0.05$ értéket tekintjük szignifikánsnak. A több csoportos adatok értékelésére ANOVA és Bonferroni többszörös összehasonlítási tesztet fogunk használni.

3. Értékelés

A legfontosabb kérdés, hogy a már kialakult diabéteszben képes-e az orális inzulin formula remissziót kiváltani. Ennek legegyszerűbb hatékony mérője a diabétesz megjelenésének idő függése. Várhatóan a parenterális inzulinnal kezelt állatok vércukorszintje rövid időn belül (néhány nap-egy hét) újra eléri a diabétesz küszöbértékül szabott 250 mg/dl értéket. Amennyiben az orális inzulin formulával kezelt állatokban csak jelentősen később alakul ki újra diabétesz, akkor felmerül annak lehetősége, hogy az orális inzulin csökkenti a Langerhans szigetek elleni autoimmunitást.

Az inzulinnal által kiváltott tolerancián alapuló autoimmunitás mechanizmusát támasztja alá, a Treg limfociták számának emelkedése a vérben és a hasnyálmirigyet infiltráló limfociták közt, vagy a hasnyálmirigy körüli nyirokcsomókban.

References

1. Makino, S., et al., *Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice*. Jikken Dobutsu, 1980. **29**(1): p. 1-13.
2. Racine, J.J., et al., *Improved Murine MHC-Deficient HLA Transgenic NOD Mouse Models for Type 1 Diabetes Therapy Development*. Diabetes, 2018. **67**(5): p. 923-935.
3. Xu, H., et al., *Targeted Disruption of HLA Genes via CRISPR-Cas9 Generates iPSCs with Enhanced Immune Compatibility*. Cell Stem Cell, 2019. **24**(4): p. 566-578.e7.
4. Mordes, J.P., et al., *Rat models of type 1 diabetes: genetics, environment, and autoimmunity*. IJAR, 2004. **45**(3): p. 278-91.
5. Furman, B.L., *Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats*. Curr Protoc Pharmacol, 2015. **70**: p. 5.47.1-5.47.20.

6. Nelson, R.W. and C.E. Reusch, *Animal models of disease: classification and etiology of diabetes in dogs and cats*. J Endocrinol, 2014. **222**(3): p. T1-9.
7. Wong, F.S., et al., *CD8 T cell clones from young nonobese diabetic (NOD) islets can transfer rapid onset of diabetes in NOD mice in the absence of CD4 cells*. J Exp Med, 1996. **183**(1): p. 67-76.
8. Serreze, D.V., et al., *B lymphocytes are critical antigen-presenting cells for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice*. J Immunol, 1998. **161**(8): p. 3912-8.
9. Abiru, N., et al., *Transient insulin autoantibody expression independent of development of diabetes: comparison of NOD and NOR strains*. J Autoimmun, 2001. **17**(1): p. 1-6.
10. Bowman, M.A., E.H. Leiter, and M.A. Atkinson, *Prevention of diabetes in the NOD mouse: implications for therapeutic intervention in human disease*. Immunol Today, 1994. **15**(3): p. 115-20.
11. Tisch, R. and H. McDevitt, *Insulin-dependent diabetes mellitus*. Cell, 1996. **85**(3): p. 291-7.
12. Thébault-Baumont, K., et al., *Acceleration of type 1 diabetes mellitus in proinsulin 2-deficient NOD mice*. J Clin Invest, 2003. **111**(6): p. 851-7.
13. Elso, C.M., et al., *Replacing murine insulin 1 with human insulin protects NOD mice from diabetes*. PLoS One, 2019. **14**(12): p. e0225021.
14. Wan, X. and E.R. Unanue, *Unique features in the presentation of insulin epitopes in autoimmune diabetes: an update*. Curr Opin Immunol, 2017. **46**: p. 30-37.
15. Zhang, Z.J., et al., *Suppression of diabetes in nonobese diabetic mice by oral administration of porcine insulin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(22): p. 10252-6.
16. Pham, M.N., et al., *Oral insulin (human, murine, or porcine) does not prevent diabetes in the non-obese diabetic mouse*. Clin Immunol, 2016. **164**: p. 28-33.
17. Mao, R., et al., *Oral delivery of single-chain insulin (SCI-59) analog by bacterium-like particles (BLPs) induces oral tolerance and prevents autoimmune diabetes in NOD mice*. Immunol Lett, 2019. **214**: p. 37-44.
18. Shehadeh, N., et al., *The influence of oral insulin on the development of autoimmune diabetes in NOD mice fed a hypoallergenic diet*. Diabetes Nutr Metab, 2004. **17**(1): p. 1-5.

19. Peppia, M., et al., *Fetal or neonatal low-glycotoxin environment prevents autoimmune diabetes in NOD mice*. *Diabetes*, 2003. **52**(6): p. 1441-8.
20. Mao, R.F., et al., *Type 1 diabetes mellitus and its oral tolerance therapy*. *World J Diabetes*, 2020. **11**(10): p. 400-415.
21. Brezar, V., et al., *Short-term subcutaneous insulin treatment delays but does not prevent diabetes in NOD mice*. *Eur J Immunol*, 2012. **42**(6): p. 1553-61.
22. Atkinson, M.A., N.K. Maclaren, and R. Luchetta, *Insulinitis and diabetes in NOD mice reduced by prophylactic insulin therapy*. *Diabetes*, 1990. **39**(8): p. 933-7.
23. Babaya, N., et al., *Murine high specificity/sensitivity competitive europium insulin autoantibody assay*. *Diabetes Technol Ther*, 2009. **11**(4): p. 227-33.
24. Grant, C.W., et al., *Development of standardized insulin treatment protocols for spontaneous rodent models of type 1 diabetes*. *Comp Med*, 2012. **62**(5): p. 381-90.



Orális inzulin vakcina fejlesztése az I-es típusú diabétesz kialakulásának megelőzésére gyermekekben

Állatkísérlet végzésére szóló engedély kérelem draft

Debreceni Egyetem

GINOP-2.3.4-15-2016-00002

Állatkísérlet végzésére szóló engedély iránti kérelem
a 40/2013. (II. 14.) Korm. Rendelet 2. számú mellékletének megfelelően

I. A kérelem tartalmi elemei:

1. A kérelmező (a projekt általános megvalósításáért, valamint a projektengedélyben foglalt feltételeknek való megfeleléséért felelős személy)

neve: Később kerül megnevezésre

munkaköre:

postai és elektronikus levelezési címe:

2. A felhasználó intézmény

megnevezése: Debreceni Egyetem, Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

címe: 4032 Debrecen, Nagyerdei krt. 98.

3. Az intézményben az állatvédelmi jogszabályok teljesülésének biztosításáért felelős személy

neve:

munkaköre:

postai és elektronikus levelezési címe:

4. A felhasználó intézmény működési engedélyét kiadó hatóság

megnevezése: Debreceni Egyetem

az engedély száma:

5. A kérelmező nyilatkozata arról, hogy a kérelem célja

a) új engedély megszerzése,

b) hatályos engedély megújítása, (engedély száma:)

c) hatályos engedély módosítása, (engedély száma:)

d) hatályos engedély meghosszabbítása. (engedély száma:)

A b)–d) esetekben az engedély számát és lejártát is meg kell adni.

II. A kérelem további tartalmi elemei új engedély megszerzése esetén:

1. A projekt megnevezése: Orális inzulin terápia az I-es típusú diabétesz kialakulásának megelőzésére
2. Annak megjelölése, hogy az alábbiak közül mely célkitűzésnek, illetve célkitűzéseknek felel meg a kísérleti tevékenység, azzal, hogy több célkitűzés megjelölése esetén meg kell jelölni a kísérlet elsődleges célját:

- a) alapkutatás,
- b) transzlációs vagy alkalmazott kutatás az alábbi célok bármelyikével:
 - ba) emberek, állatok vagy növények betegségeinek, egészségi rendellenességeinek vagy más kóros elváltozásainak, azok hatásainak elkerülése, megelőzése, felismerése vagy kezelése,
 - bb) emberek, állatok vagy növények élettani állapotának feltárása, értékelése, szabályozása vagy módosítása, vagy
 - bc) az állatok jóléte és a mezőgazdasági célból tartott állatok termelési feltételeinek javítása,
- c) a b) pontban foglalt bármely célból gyógyszerek, élelmiszerek és takarmányok, valamint egyéb anyagok vagy termékek kifejlesztése vagy gyártása, azok minőségének, hatékonyságának és biztonságosságának ellenőrzése,
- d) a természetes környezet védelme az emberek vagy állatok egészsége vagy jóléte érdekében,
- e) a fajok megőrzésére irányuló kutatás,
- f) felsőoktatás vagy a szakmai készségek megszerzése, fenntartása vagy fejlesztése céljából folyó képzés,
- g) igazságügyi orvostani vizsgálat.

Több célkitűzés esetén a kísérlet elsődleges célja:

3. A kérelmező nyilatkozata arról, hogy hatósági szabályozási követelmények teljesítése céljából végzendő, vagy bevált módszereket alkalmazó, termelési vagy diagnosztikai célból végzendő több azonos típusú projekt együttes engedélyezését kéri-e [44. § (4) bekezdés].

Nem kérjük

4. A projekt ismertetése, tudományos indokolása, amelynek keretében a kérelmezőnek

- a) be kell mutatnia a projekt célját, indokoltságát, tudományos megalapozottságát (lehetőleg szakirodalmi hivatkozásokkal) és a várható eredményeket;

Az egyes típusú diabetes mellitus (továbbiakban T1DM) az egyik leggyakoribb, gyermekkorban előforduló hormonális és anyagcsere megbetegedés. A betegség fő jellemzőjét, az emelkedett vércukorszintet a hasnyálmirigy Langerhans szigeteiben lévő, inzulin termelő β sejtek pusztulása eredményezi [1]. Az esetek túlnyomó többségében a β sejtek pusztulását és funkció csökkenését a β sejtek elleni autoimmun folyamat okozza. A T1DM gyakorisága világszerte évi 2-3 %-kal növekszik, az 5 év alatti kórcsoportban a növekedés még gyorsabb [2]. A T1DM betegek száma a világban elérheti az 30 milliót [3]. Magyarország a közepes rizikójú országok közé sorolható, de az elmúlt 20 évben az incidencia megháromszorozódott. A T1DM előfordulási gyakorisága a pubertás előtt lányokban és fiúkban hasonló, a pubertás után lányokban a betegség előfordulás jelentősen csökken [4]. Eredetileg a T1DM mint gyermekkori megbetegedést ismerték fel, de a megbetegedés előfordulhat bármely korban, a T1DM esetek mintegy 50%-a felnőtt korban jelenik meg [5]. Legutóbbi időkben az immune checkpoint gátló szer kezelésekhöz (anti-cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4 és anti-programmed cell death-1) kapcsolódóan figyelték meg indukált T1DM kialakulását [6]. A T1DM diabétesz kialakulásában mind genetikai, mind környezeti hatások szerepet játszanak. Az inzulin termelő β -sejtek pusztulása miatt a betegek jelenleg egész életükön át tartó inzulin kezelésre szorulnak.

Az 1970-es évek közepe óta számos vizsgálat célozta az autoimmun folyamat gátlásán keresztül a reziduális inzulin termelő β sejtek mennyiségének és inzulin termelő kapacitásának a megtartását, vagy növelését [7]. Az immunszuppresszióra épülő klinikai vizsgálatok (cyclosporin, azathioprine, monoclonal anti CD3 antitest, mycophenolate mofetil és daclizumab kombináció) ugyan mutattak eredményt, de a mellékhatások miatt felhagyták a legtöbb eredeti vegyület vizsgálatát [8], de újabb származékok (pl. Teplizumab, ant-CD20, anti-TNF α) vizsgálata folytatódik.

Tekintettel a betegség autoimmun eredetére, aminek alapja a hibás immunológiai tolerancia, felmerült, hogy orálisan adott nagy dózisú specifikus antigénnel a tolerancia helyreállítható. T1D-ben az egyik legkorábban megjelenő autoantigén az inzulin. Az orálisan adott inzulinnal tolerancia kiváltását célzó klinikai vizsgálatok közül kiemelkedik a Pre-Point, kettős vak, 2009-2013 közt lefolytatott vizsgálata. Magas T1DM rizikójú, de autoantitest képzést még nem mutató gyerekeket (életkor 2,2-7,7 év) válogattak be a vizsgálatba [9]. A résztvevők napi orális inzulint (2,5-67,5 mg) vagy placebo kezelést kaptak. A nagy dózisú orális inzulin kezelés inzulin-reszponzív és proinzulin-reszponzív szabályozó T sejtek indukcióját eredményezte. Hipoglikémiás esemény nem volt egyik csoportban sem. A TrialNet Oral Insulin Study Group T1DM-es betegek rokonait vonta vizsgálatba, akik legalább 2 autoantitesttel rendelkeztek normális glukóz tolerancia mellett. A vizsgálat napi 7.5 mg orális inzulin kezelésben részesültek és az átlagos követési idő 2.7 év volt [10]. A napi 7.5 mg orális inzulin kezelés kismértékben késleltette a T1DM megjelenését. A vizsgálatok azt is kimutatták, hogy orálisan adott

inzulinnak csak elenyésző része szívódik fel olyan polipeptid formában amely immunválszt képes kiváltani.

A Debreceni Egyetem új orális inzulin formulát fejlesztett ki, aminek jelentős része felszívódik és szisztémás hatást fejt ki. Várható, hogy az orálisan felszívódó inzulin formula immunológiai hatása akár nagyságrendekkel is jelentősebb lehet, mint a bélcsatornában a degradációtól nem védett inzuliné. A vizsgálat célja annak eldöntése, hogy az új orális inzulin formula alkalmas lehet-e a T1D megelőzésére, vagy kezelésére.

A vizsgálatokat a legelfogadottabb T1DM modellen a NOD egér modellen tervezzük elvégezni. Korábbi vizsgálatok már igazolták, hogy ebben a modellben inzulinnal immunológiai tolerancia, a T1DM prevenciója éhető el. A NOD egéren végzett hatástani vizsgálatok alapját képezhetik az orális inzulin formula további, a humán T1DM prevencióját célzó klinikai vizsgálatának.

aa) ha rutinvizsgálatról van szó, hivatkozni kell a szükségességet igazoló dokumentumra (előírásra),

ab) ha oktatási célból történik a beavatkozás, legfeljebb egy oldalban körvonalazni kell annak hasznát a képzésben résztvevők számára,

b) le kell írnia az alkalmazott módszertan indokoltságát és tudományos megalapozottságát,

A leggyakrabban használt experimentális T1DM modell a NOD egér, amely számos tulajdonságában megfelel a humán T1DM-nek. A NOD egérben a hasnyálmirigy Langerhans szigetecskéi immunsejtes infiltrációja az 5-6. héten kezdődik el, ami kezdetben csak a szigetecskék körül jelenik meg, később az immunsejt invázió behatol a szigetecskébe. Az szigetecskéi autoimmun gyulladása minden állatban megnyilvánul. A diabétesz tipikusan a 12-14. hét közt jelenik meg a nőstény állatokban, míg a hímekben néhány héttel később és hímekben a diabétesz incidenciája végig alacsonyabb marad annak ellenére, hogy az inzulinitisz a két nemben hasonló mértékű. A hasnyálmirigy szigetecskéi gyulladással inváziójában CD4+ és CD8+ T sejtek, NK és B sejtek, valamint dendritikus sejtek és makrofágok vesznek részt. Az autoimmun folyamat fenntartásában a CD4+ és CD8+ T sejtek a vezető szerepet, tisztított CD4+ és CD8+ T sejtekkel a betegség passzívan átvihető másik állatra [11], míg ez nem érhető el a diabéteszes állatban megjelenő autoantitestekkel [12]. A B sejtek ugyanakkor szükségesek az inzulinitisz progressziójához. Az emberi diabéteszhez hasonlóan az autoantitestek NOD egérben is előre jelzik a diabétesz megjelenését [13]. Az autoantitestek szerepe vitatott a betegségben, de a B sejt funkció jelentős csökkenésével, a diabétesz megjelenése is visszaszorul [14]. A diabétesz incidenciája NOD tenyésztésben akkor a legmagasabb, ha az állatokat germ-free környezetben tartják [15]. Több lókuszt felelős a T1DM rizikóért NOD egérben, közülük a legfontosabb egy sajátos MHC komplex, a H-2g7 [16]. NOD egér modellben is az inzulin a legfőbb autoantigén. A diabétesz kialakulásával párhuzamosan inzulin fragmensek specifikus T sejtek

jelennek meg NOD egérben és ezekkel a sejtekkel a betegség átvihető egészséges állatra. Az inzulin specifikus, immunogén szakaszának mutációja megszünteti a betegséget kialakulását. Az inzulin epitópok közül B:9-23; B13-21 és B12-20 játszik kitüntetett szerepet az autoimmunitás és a tolerancia kialakulásában [17].

Az inzulin tolerancia hatását a T1DM megjelenésén először NOD T1DM egér modellen vizsgálták [18]. A disznó és rekombináns human inzulin (Humulin R) egyaránt hatékonyan bizonyult tolerancia kiváltására NOD egérben.

Hivatkozások:

1. Eisenbarth, G.S., Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. *N Engl J Med*, 1986. 314(21): p. 1360-8.
2. Chobot, A., et al., Updated 24-year trend of Type 1 diabetes incidence in children in Poland reveals a sinusoidal pattern and sustained increase. *Diabet Med*, 2017. 34(9): p. 1252-1258.
3. Diaz-Valencia, P.A., P. Bougneres, and A.J. Valleron, Global epidemiology of type 1 diabetes in young adults and adults: a systematic review. *BMC Public Health*, 2015. 15: p. 255.
4. Rawshani, A., et al., The incidence of diabetes among 0-34 year olds in Sweden: new data and better methods. *Diabetologia*, 2014. 57(7): p. 1375-81.
5. Thomas, N.J., et al., Frequency and phenotype of type 1 diabetes in the first six decades of life: a cross-sectional, genetically stratified survival analysis from UK Biobank. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2018. 6(2): p. 122-129.
6. Zhang, R., et al., Type 1 diabetes induced by immune checkpoint inhibitors. *Chin Med J (Engl)*, 2020. 133(21): p. 2595-2598.
7. Skyler, J.S., Immune intervention for type 1 diabetes mellitus. *Int J Clin Pract Suppl*, 2011(170): p. 61-70.
8. Pescovitz, M.D., et al., Rituximab, B-lymphocyte depletion, and preservation of beta-cell function. *N Engl J Med*, 2009. 361(22): p. 2143-52
9. Bonifacio, E., et al., 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): p. 1541-9.
10. Krischer, J.P., et al., Effect of Oral Insulin on Prevention of Diabetes in Relatives of Patients With Type 1 Diabetes: A Randomized Clinical Trial. *Jama*, 2017. 318(19): p. 1891-1902.
11. Wong, F.S., et al., CD8 T cell clones from young nonobese diabetic (NOD) islets can transfer rapid onset of diabetes in NOD mice in the absence of CD4 cells. *J Exp Med*, 1996. 183(1): p. 67-76.

12. Serreze, D.V., et al., B lymphocytes are critical antigen-presenting cells for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol*, 1998. 161(8): p. 3912-8
13. Abiru, N., et al., Transient insulin autoantibody expression independent of development of diabetes: comparison of NOD and NOR strains. *J Autoimmun*, 2001. 17(1): p. 1-6.
14. Abiru, N., et al., Transient insulin autoantibody expression independent of development of diabetes: comparison of NOD and NOR strains. *J Autoimmun*, 2001. 17(1): p. 1-6.
15. Bowman, M.A., E.H. Leiter, and M.A. Atkinson, Prevention of diabetes in the NOD mouse: implications for therapeutic intervention in human disease. *Immunol Today*, 1994. 15(3): p. 115-20.
16. Tisch, R. and H. McDevitt, Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell*, 1996. 85(3): p. 291-7.
17. Wan, X. and E.R. Unanue, Unique features in the presentation of insulin epitopes in autoimmune diabetes: an update. *Curr Opin Immunol*, 2017. 46: p. 30-37.
18. Zhang, Z.J., et al., Suppression of diabetes in nonobese diabetic mice by oral administration of porcine insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. 88(22): p. 10252-6.

- c) ki kell térnie az állatok kísérletekben való felhasználásának helyettesítésére és csökkentésére irányuló módszerek alkalmazására,

Nincs olyan in vitro modell, amelyben az orálisan adott inzulin specifikus toleranciát kiváltó hatása modellezhető lenne. Továbbá az immunológiai tolerancia vizsgálatára használt in vitro modellek nem elégségesek egy lehetséges humán klinikai vizsgálat megalapozására.

- d) amennyiben a projektben természetvédelmi oltalom alatt álló vagy nemzetközi természetvédelmi egyezmény hatálya alá tartozó faj egyedét nem természetvédelmi céllal tervezik felhasználni, meg kell adnia azokat a tudományos indokokat, melyek alapján kifejezetten a fenti fajok felhasználása szükséges,
- e) amennyiben a projektben főemlős faj egyedét tervezik felhasználni, meg kell adnia azokat a tudományos indokokat, melyek alapján kifejezetten a fenti egyedek felhasználása szükséges.

5. A projektben alkalmazott összes kísérlet számozott felsorolása és ismertetése, melynek keretében a kérelmezőnek
 - a) ismertetnie kell a kísérletben alkalmazott módszereket, kitérve az állaton végzett beavatkozásokra; amennyiben végeznek műtétet a kísérletben,

ismertetni kell az alkalmazott érzéstelenítési, gyógyszeres és fájdalomcsillapítási eljárásokat,

1. Kísérletek előtti előkészítő lépések:

Az állatok jelölését fülre erősíthető fém jelölő rendszerrel végezzük végezzük (Ear tag, Jackson Laboratory), a jelölő lapok felhelyezése nem igényel fájdalomcsillapítást.

A T1D két stádiumában vizsgáljuk az orális inzulin formula hatását:

1. A diabétesz kialakulása előtt

2. A diabétesz kialakulása után

1. A prevenció vizsgálatban a nőstény NOD állatok kezelését a lehető legkorábbi, 4 hetes korban kezdjük el, mert a betegség korai stádiumában a könnyebben kiváltható immunológiai tolerancia [1]. Az orális formulából a beadott inzulin mintegy 30%-a felszívódik és szisztémás metabolikus hatást fejt ki. Ismeretes, hogy a sc. adott inzulin NOD egerben késlelteti, de nem szünteti meg a diabétesz megjelenését [2]. A hatás valószínű oka, hogy az a β sejtek működése exogén inzulin hatására visszaszorul, így kevésbé működnek immunológiai targetként is. Ezért vizsgálatban szisztémás inzulin hatását is mérni kell (sc. inzulinnal kezelt kontroll), hogy lássuk a hatás milyen részéért felelős az inzulin szisztémás hatása, illetve az orális inzulin által kiváltott immunológiai tolerancia. Több T1D modellben végzett vizsgálat igazolta, hogy a toleranciát kiváltó antigén dózis alapvetően befolyásolhatja az immunológiai tolerancia kialakulását, ezért az orális inzulin formulát minimum két dózisban kell vizsgálni. NOD egerben a diabétesz megjelenése után kialakuló súlyos hiperglikémia (akár 600 mg/dl) 5-10 hét alatt az állatok pusztulásához vezet, ezért a 400 mg/dl-es vércukorszint elérésekor a felesleges szenvedés elkerülése érdekében extermálni fogjuk az állatokat. Az állatokat négy csoportra osztjuk, az első, kontroll csoportot a vivőanyagokkal kezeljük, a második és harmadik csoportot a maximálisan tolerált orális inzulin formulával és annak egy tized részével kezeljük orálisan, a negyedik csoport az orális inzulin formula 30%-nak megfelelő mennyiségű inzulint kap sc. Az orális inzulin formula magas dózisa 0.5, az alacsony dózisa 0,05 U/állat lesz, ennek megfelelően a sc inzulin dózisa 0,15 U/állat. Az sc. adott alacsony inzulin dózist (0,015U/ állat) ismerten nincs érdemleges hatása a NOD egerben a diabétesz megjelenésére, ezért az alacsony sc. inzulin dózist nem vizsgáljuk. A 0,15 U/állat sc. inzulin dózist korábbi kísérletben tolerálták az állatok [2]. Az állatok kezelését heti öt alkalommal végezzük az 4.-től a 15. hetes korig. A 10 hetes kórtól, hogy a dózis lépést tartson az állatok növekedésével az inzulin dózist megduplázzuk. A kezelést nem folytatjuk a 15 hetes kor után, hogy az inzulin kezelés ne fedje a kialakuló diabéteszt. A 15. héttől az állatok vércukorszintjét hetente ellenőrizzük a farok, vagy szemzug vénából vett vérben. Az állatok megfigyelését 10 héttel tovább folytatjuk, mint amikor a kontroll csoportban a diabétesz előfordulása (vércukorszint > 250mg/dl) eléri a 90%-t (kb. a 40. hét). Amennyiben az orális inzulin formula hatására a diabétesz megjelenése legalább 30%-kal csökken, akkor csoportonként 25 nőstény egeret vizsgálva nagy biztonsággal ki tudjuk mutatni a hatást. A tervezett inzulin dózis jelentős, testsúlyra vonatkoztatva mintegy 50-100x nagyobb, mint a humán inzulin igény, így megfelel a nagy dózisú deszenzitizáció koncepciójának. Csoportonként további 5-5 állatot is vizsgálatba állítunk a hasnyálmirigy hisztológiai vizsgálat céljára, az inzulin autoantitest szint mérésére, valamint a vérben és a hasnyálmirigy

körüli nyirokcsomókban Treg sejtek számának meghatározására. Ezeknek az vizsgálatoknak az időpontját a diabétesz progressziója alapján fogjuk meghatározni.

A legfontosabb kérdés, hogy az diabétesz megjelenését késlelteti-e az orális inzulin formula kezelés. Erre a diabétesz megjelenési idő Kaplan-Meier analízise ad választ. Amennyiben a kezelés késlelteti a diabétesz megjelenését előtérbe kerül a hatás mechanizmusa. A Treg sejtek száma, a szigeteket infiltráló sejtek típusa bizonyíthatja, hogy a T1DM preventív hatás az inzulinnal kiváltott toleranciának a következménye.

2. A vizsgálat célja annak eldöntése, hogy a már kialakult diabéteszben az orális inzulin formula kezelés képes-e hosszantartó remissziót kiváltani. Az orális inzulin formula szisztémás inzulin hatással is rendelkezik, ami befolyásolhatja a T1D lefolyását, a β -sejtek kimerülését, ezért az orális inzulin által kiváltott immunológiai tolerancia és a szisztémás inzulin hatás megkülönböztetésére megvizsgáljuk a parenterálisan adott inzulin hatását is. A parenterálisan adott inzulin mennyiségét úgy választjuk meg, hogy azonos hatású legyen, mint az orális inzulin formula szisztémás inzulin hatása. A NOD egereket (összesen 50 egér) csak akkor vonjuk vizsgálatba, amikor diabéteszessé válnak (vércukorszint $> 250\text{mg/dl}$). A nőstény diabéteszes egereket három csoportra osztjuk, egy csoport kontrollként szolgál, egy csoport orális inzulin formula kezelést kap, a harmadik csoport se inzulin kezelésben részesül. Öt hét kezelés után maximum öt napra az inzulin kezelést felfüggesztjük, hogy megbecsüljük az endogén inzulin termelés állapotát a vércukorszint változása alapján. Amennyiben az vércukorszint 250 mg/dl fölé emelkedik az inzulin kezelést újraindítjuk további 6 hétig (összesen 12 hét). A terápia hatását a diabétesz megjelenése (vércukorszint $>250\text{ mg/dl}$) alapján mérjük. A hosszú követés célja a hatás tartóságának (átmeneti vagy esetleg tartós hatás) meghatározása. Az egereket vércukorszintjét az állatok 12 hetes korától hetente kétszer (hétfő, csütörtök délelőtt) a farokvénából, vagy a periorbitális vénás plexusból vett vérben meghatározzuk. Amennyiben a vércukorszint 250 mg/dl -nél magasabb a mérést a következő napon megismételjük. Az egymást követő napokon 250 mg/dl értéknél magasabb vércukor értéket mutató állatokat diabéteszesnek tekintjük és kezelésüket a következő napon elkezdjük. Az állatok egyedi jelölését fülbe erősíthető fém lappal (ear tag, Jackson Laboratory) végezzük a következők szerint:

Csoport	Jelölés	Kezelés / 10 héten át
Kontroll	1-10	Hetente 7x orális inzulin formula oldószer
Orális inzulin formula	11-30	Hetente 7x, 2U / egér orális inzulin formula
Szubkután inzulin	31-50	0,3 U/nap Humulin R, Alzet ozmotikus minipumpa

A NOD1 nőstény egerekben a diabétesz legnagyobb gyakorisággal a 15 hét körül jelentkezik és 30. hétre az egerek mintegy 80%-ban kialakul. A vizsgálatot 70 nőstény egérrel indítjuk, hogy a csoportokhoz szükséges 50 állatot 2-3 hét alatt ki tudjuk választani.

A kontroll csoportot az orális inzulin hígítására használt oldószerrel kezeljük orálisan (gavage), $0,1\text{ ml}/10\text{g}$ testsúly térfogatban naponta egyszer 10 hétig. A kontroll állatokban heti

két alkalommal ellenőrizzük a vércukorszintet mindaddig, amíg az a 400 mg/dl-es szintet ismételen el nem éri. Ekkor az állatokat ip. nembutal injekcióval elaltatjuk, szívpunkcióval vért veszünk, a plazmát izolálunk autoantitest és C-peptid meghatározás céljára, a mintákat a felhasználásig -20 °C-on tároljuk.

A vizsgálatban alkalmazni orális inzulin formula tervezett dózisát és a kezelés ütemezését előkísérletben kell ellenőrizni. Az eddigi eredmények alapján elképzelhető, hogy sikerül olyan dózist találni, ami napi egyszeri kezeléssel is elfogadható tartományban (50-200mg/dl) tartja az egész nap az egerek vércukorszintjét. Az előkísérletben diabéteszes NOD egereket (2-2 egér, vércukorszint ismételen magasabb, mint 250mg/dl) az orális inzulin formula 2 és 4 U/egér dózisával orálisan kezeljük, majd 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24 óra múlva végzett méréssel meghatározzuk az állatok napi vércukor profilját. Ha szükséges, a napi dózist és a kezelési ütemezést úgy módosítjuk (dózis emelés, csökkentés vagy napi kétszeri kezelés), hogy a napi minimális és maximális vércukorszint az 50-200 mg/dl tartományban maradjon. Az előkísérletben kiválasztott orális inzulin formula dózis és ütemezés szerint indítjuk el az állatok kezelését.

A parenterális inzulin kezelést Alzet ozmotikus minipumpa használatával fogjuk végezni. Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy Alzet ozmotikus minipumpával adagolt inzulinnal több, mint két hétig a normális tartományban tartható a NOD1 diabéteszes egerek vércukorszintje (Comp Med. 2012; 62(5): 381–390). Az egerekbe 50 U/ml Humulin R-el feltöltött Alzet ozmotikus minipumpát fogunk beültetni, amely napi 0,3 U folyamatos inzulint kezelést biztosít és fenntartja a normális vércukorszintet [3]. Az egerek leborotvált bőrét alkoholos jóddal fertőtlenítjük, majd izoflurán narkózisban kis vágáson keresztül intraperitoneálisan behelyezzük a gyártó használati utasítása szerint előkészített ozmotikus minipumpát, majd a sebet kapcsokkal zárjuk. Az Alzet minipumpákat 16-18 naponként cseréni fogjuk. Hetente egyszer meghatározzuk a csoportban két állat vércukorszintjét, továbbá soron kívül megvizsgáljuk a tüneteket vagy szokatlan viselkedést mutató állatok vércukorszintjét.

Az orális inzulin formulával végzett kezelés során (kezelési térfogat 0,1ml/10g testsúly) hetente egyszer meghatározzuk két állat glukóz profilját (a kezelés előtt és 3, 9, 18, 24 órával utána) valamint ugyancsak meghatározzuk a tüneteket, vagy eltérő viselkedést mutató állatok vércukorszintjét. Az eredmények függvényében az orális inzulin formula dózisát, vagy a kezelés ütemezését módosíthatjuk, hogy az egerek napi vércukorszintje az meghatározott tartományban maradjon.

Öt hét kezelés után 5 napra felfüggesztjük az orális inzulin adását, hogy megbecsüljük az egerek inzulin termelését. A kezelés felfüggesztését követően naponta mérjük (délelőtt) az egerek vércukorszintjét és plazma mintát nyerünk C-peptid meghatározásra, valamint figyeljük az állatok viselkedését. Amennyiben a vércukorszint öt napnál hamarabb 250 mg/dl fölé emelkedik az orális inzulin kezelést újraindítjuk és a 10. hét végéig folytatjuk. Az inzulin dózis módosítására, az állatok vércukor profilja alapján ebben az időszakban is sor kerülhet.

A tíz hét inzulin kezelési időt követően öt napon keresztül naponta, majd hetente kétszer meghatározzuk az állatok vércukorszintjét. A 13. és 15. és héten 100 µl vért veszünk a Treg sejtszám, valamint plazma mintát (20 µl) nyerünk C-peptid és autoantitest szint meghatározásra, amit -20 °C-on tárolunk felhasználásig. A Treg limfociták meghatározáshoz poolozzuk az 50 µl-es vérmintákat.

Amennyiben egy állat vércukorszintje ismételten 400 mg/dl fölé emelkedik az állatot extermináljuk, a hasnyálmirigyet eltávolítjuk a páratlan mintákat 4 %-os formalinban fixáljuk, páros mintákat gyors fagyasztás után -70 °C-on tároljuk. A 26. héten az összes maradék állatot pentobarbitállal túlaltatjuk, a hasnyálmirigyeket a at előbbivel azonos módon fixáljuk, vagy lefgyasztjuk.

A már kialakult diabéteszben a legfontosabb kérdés, hogy a az orális inzulin formula képes-e remissziót kiváltani. Ennek legegyszerűbb hatékony mérője a diabétesz megjelenési idő vizsgálata az inzulin kezelés befejezése után. Várhatóan a parenterális inzulinnal kezelt állatok vércukorszintje rövid időn belül (néhány nap-egy hét) újra eléri a diabétesz küszöbértékül szabott 250 mg/dl értéket. Amennyiben az orális inzulin formulával kezelt állatokban csak jelentősen később alakul ki újra diabétesz, akkor az orális inzulin csökkenti a Langerhans szigetek elleni autoimmunitást.

- b) meg kell adnia a kísérlet időtartamát,

Egy kísérlet teljes időtartama 0,5-1 év az orális inzulin formula takékonyságától függően.

- c) meg kell adnia a kísérletben felhasznált állatok fajtát és fejlődési állapotát, adott esetben jeleznie és indokolnia kell az állatok ismételt felhasználásának előfordulását,

A kísérletekben NOD/ShiLtJ egeret használunk a hatás vizsgálatára, a vizsgálat indulásakor az egerek 3 és 10 hetes koruak lesznek. Az állatok nem kerülnek ismételt felhasználásra.

- d) ki kell térnie a felhasznált kísérleti állatok számának csökkentése érdekében alkalmazott kísérleti vagy statisztikai módszertanra; meg kell adnia a tervezett mintaelemszámot,

Helyettesítés: A jelen projektben vizsgálandó jelenségek komplexitása in vivo modell használatát kívánja meg, ezért vizsgálatainkat egéren végezzük. Csökkentés: A felhasználandó állatok számát a vizsgálandó változók irodalomban leírt szórása alapján tervezve (korábbi hasonló vizsgálatok Kaplan-Meier analízisének eredményei alapján becsülve) úgy alakítottuk ki, hogy kísérleteink során a lehető legkevesebb egyed használjunk fel. Ekkora minta a becslések alapján elegendő ahhoz, hogy a vizsgált hatásokról megfigyeléseink alapján megfelelő következtetéseket vonjunk le a vizsgálandó populációt tekintve, de még nem jár indokolatlanul nagy egyedszám felhasználásával.

- e) ismertetnie kell a felhasznált kísérleti állatok fájdalmának, szenvedésének, kínjának csökkentése érdekében alkalmazott kísérleti, megfigyelési vagy mérés-technikai módszereket, kitérve a kíméletes végpontok alkalmazására,

Az Alzet minipumpák beültetését és cseréjét rövid izoflurán narkózisban végezzük, minimális nagyságú sebet ejtve. A seb zárásakor a sebszélekre 1% lidocain helyi érzéstelenítőt cseppentünk.

- f) be kell mutatnia, mi történik az állatokkal a kísérlet végeztével, milyen módon történik az állatok életének kioltása,

Az állatokat pentobarbitallal extermináljuk.

- g) meg kell adnia a kísérlet javasolt súlyossági besorolását, ismételt felhasználás esetén külön figyelemmel az előző kísérletek halmozódó hatására.

A kísérlet súlyossági besorolása enyhe, mivel a kezelések, orális gavage, szubkután injekció csak minimális kellemetlenséget okoznak, az Alzet minipumpa beültetése rövid, néhány perces narkózisban történik lokális fájdalomcsillapítással, a diabétesz kialakulása esetén, mielőtt az súlyosan megviselné az állatot (vércukorszint >400 mg/dl) ip. adott pentobarbitallal leöljük az egereket. A vérmintákat a farokvénából és a retroorbitális vénából rövid kellemetlenséget okozva nyerjük. Az állatok egyéb kellemetlen vagy fájdalmas hatásoknak a kísérlet során nincsenek kitéve.

Hivatkozások:

1. Mao, R.F., et al., Type 1 diabetes mellitus and its oral tolerance therapy. *World J Diabetes*, 2020. 11(10): p. 400-415.
2. Brezar, V., et al., Short-term subcutaneous insulin treatment delays but does not prevent diabetes in NOD mice. *Eur J Immunol*, 2012. 42(6): p. 1553-61.
3. Grant, C.W., et al., Development of standardized insulin treatment protocols for spontaneous rodent models of type 1 diabetes. *Comp Med*, 2012. 62(5): p. 381-90.
6. A projektben felhasználni kívánt állatfajok felsorolása a felhasználni kívánt állatok tervezett számának és eredetének a megjelölésével.

195 NOD/ShiLtJ egér, Jackson Laboratory
7. A projektben felhasználni kívánt állatok elhelyezésének, tartásának és gondozásának körülményei.

Hepa filteres Micro-Isolator rendszerben, vagy Hepa filteres BioContainment rendszer az egerek tartására, Zsilipelt, VAF (vírus ellenanyagtól mentes) állatházban
8. Amennyiben a projektet nem vagy nem kizárólag az I. pont 2. alpontjában megnevezett létesítményben hajtják végre, a kísérletek végrehajtásának helyszínéül szolgáló

létesítmény, illetve terep megnevezése:

a létesítmény működési engedélyének száma:

az azt kiadó hatóság megnevezése:

9. A kérelmező nyilatkozata arról, hogy a projektben részt vevő munkatársak megfelelnek a 35. §-ban előírt oktatási, végzettségi és képzettségi követelményeknek

10. Mentességi kérelmek felsorolása a megfelelő indoklással ellátva:
 - a) a 3. § (1) bekezdés a)–i) és k)–l) pontjaiban felsorolt fajok nem kifejezetten kísérleti célra tenyésztett egyedeinek felhasználására tudományos indokok alapján;

 - b) házasított fajok gazdátlan vagy elvadult egyedének kísérletben való felhasználására az 5. § a), illetve b) pontjában szereplő indokok alapján;

 - c) vadon élő vagy vadon befogott állat felhasználására tudományos indokok alapján a 7. § (1) és (4) bekezdésének feltételei szerint;

 - d) vadon befogott sérült vagy rossz egészségi állapotú állat szenvedésének minimalizálására irányuló intézkedések alól tudományos indokok alapján a 7. § (3) bekezdése szerint;

 - e) -

 - f) -

 - g) az állat leölésére a 4. mellékletben felsorolt módszerektől eltérő módszerrel a 14. § (5) bekezdés a) és b) pontjában szereplő indokok alapján;

 - h) az állatok tartására (elhelyezésére és gondozására) vonatkozó, a 24–27. §-okban foglalt előírások alkalmazása alól tudományos, állatjóléti vagy állategészségügyi okból;

- i) a 3. mellékletben foglalt elhelyezési és gondozási előírások alkalmazása alól tudományos, állatjóléti vagy állategészségügyi okból.

11. A projekt nem szakmai jellegű összefoglalója:

Az 1-es típusú, más néven gyermekkori cukorbetegség (T1D) közvetlen oka az inzulin termelő β -sejtek autoimmun gyulladás következtében kialakuló pusztulása, ezáltal az inzulin termelés megszűnése. Inzulin hiányában elsősorban a glukóz felhasználás súlyos, kezelés nélkül halálhoz is vezető zavara következik be. Jelenleg a betegek egész életükben inzulin kezelésre (inzulin injekció) szorulnak és még a leggondosabb kezelés esetén sem lehet elkerülni betegség hosszútávú következményeit, elsősorban a fokozott szív és érrendszeri betegség hajlamot.

Az autoimmun megbetegedést a szervezett saját molekuláival szemben természetesen kialakuló tolerancia varavar váltja ki. Immunreakció indul el a saját inzulin molekula, ezen keresztül az inzulin termelő sejtek ellen, ami végül az inzulin termelő sejtek pusztulásához vezet. A saját molekulák, így az inzulinhoz kapcsolódó tolerancia helyreállítása megszüntetné a betegség hajtómotorját, így lehetőség nyílna az inzulin termelő sejtek regenerálására, vagy pótlására, ami a betegek akár végleges gyógyulását jelentheti.

A tolerancia helyreállításának egyik módja az immunológiai reakciót kiváltó molekula nagy mennyiségének adása. Ez a módszer jól működik például egyes allergiát okozó anyagok esetében. Állaton végzett kísérletes és human klinikai vizsgálatok arra utalnak, hogy nagy dózisú inzulin szájon át történő adásával az inzulinra tolerancia váltható ki T1DM-ben. A bélbe jutó inzulint az emésztő enzimek lebontják, így a szájon át beadott inzulin molekuláknak csak elenyésző része juthat át a bélhámra és válthat ki immunológiai reakciót.

Az szájon át adott inzulinra ezt a gyenge pontját kerülheti meg a Debreceni Egyetemen kifejlesztett orális inzulin formula, amely biztosítja, hogy az inzulin egy része a bélcsatornából hatékony formában bejut a szervezetbe és a bélcsatorna falában található nagy mennyiségű immunsejten keresztül helyreállíthatja az inzulin iránti toleranciát.

Az orális inzulin formula feltételezett hatásának vizsgálatára több állatmodell használható, közülük a NOD egér modell a legalkalmasabb. Ebben az egértörzsben spontán módon a humán T1DM-hez hasonló, autoimmun mechanizmusú cukorbetegség alakul ki.

Kísérleteinkben azt vizsgáljuk, hogy szájon át adott orális inzulin formula, képes-e meggátolni a cukorbetegség kialakulását, vagy a már kialakult cukorbetegséget visszafordítani, továbbá miként befolyásolja a kezelés az inzulinra kialakult autoimmunitást. A cukorbetegség követése az állatban egyszerű, mert az drámaian megemeli az egerek vércukorszintjét, így a vércukorszinten keresztül monitorozhatjuk a betegség kialakulását és a kezelés hatását is.

Amennyiben a kezelés hatékonyan bizonyul a NOD egér modellben, akkor az orális inzulin formula terápiás hatást eredményezhet betegeken is.

12. A kérelem

kelte: 2021. 01. ..

13. A kérelmező

aláírása:

14. A munkahelyi állatjóléti bizottság vagy az állatjóléti felelős nyilatkozata arról, hogy

a) az engedélyezni kért projektben alkalmazott kísérleteket a munkahelyi állatjóléti bizottság (állatjóléti felelős) előzetesen elbírálta, azok alkalmazását a javasolt súlyossági besorolással jóváhagyta,

b) a projekt ártalom-haszon elemzése alapján a betervezett kérelmet támogatja.

15. A II. pont 14. alpontja szerinti nyilatkozatokra vonatkozóan a munkahelyi állatjóléti bizottság elnökének vagy az állatjóléti felelősnek

neve:

aláírása:

a nyilatkozattétel dátuma:

16. Felhívjuk a kérelmező figyelmét arra, hogy a 40/2013. (II. 14.) Korm. rendelet 47. § (7) bekezdése értelmében a projektengedély módosítását vagy megújítását kell kérelmezni a projektben bekövetkező, az állatok jólétét esetlegesen hátrányosan érintő bármely változás esetén.

III. A kérelem további tartalmi elemei hatályos engedély megújítása esetén:

Megegyeznek az új engedély megszerzéséhez szükséges, II. fejezet szerinti elemekkel, kiegészítve annak ismertetésével a II. pont 4. alpontjában, hogy mi tette indokoltá a megújítást és melyek a hatályos engedélyben foglaltakhoz képest megváltozó főbb elemek.

IV. A kérelem további tartalmi elemei hatályos engedély módosítása esetén:

1. A hatályos engedéllyel rendelkező projekt

megnevezése:

2. Az engedély módosítandó feltételének

megjelölése:

a módosítás indokolása:

3. A módosított feltétel

leírása:

4. Adott esetben a projekt módosított nem szakmai jellegű összefoglalója.

5. A kérelem

kelte:

6. A kérelmező

aláírása:

7. A munkahelyi állatjóléti bizottság vagy az állatjóléti felelős nyilatkozata arról, hogy az engedélyeztetni kívánt módosítást elbírálta és azt támogatja.

8. A IV. pont 7. alpontja szerinti nyilatkozatra vonatkozóan a munkahelyi állatjóléti bizottság elnökének vagy az állatjóléti felelősnek

neve:

aláírása:

a nyilatkozattétel dátuma:

9. Felhívjuk a kérelmező figyelmét arra, hogy a 40/2013. (II. 14.) Korm. rendelet 47. § (7) bekezdése értelmében a projektengedély módosítását vagy megújítását kell kérelmezni a projektben bekövetkező, az állatok jólétét esetlegesen hátrányosan érintő bármely változás esetén.

V. A kérelem további tartalmi elemei hatályos engedély meghosszabbítása esetén:

1. A hatályos engedéllyel rendelkező projektmegnevezése:

2. A meghosszabbítás kérelmezett

ideje:

5. A kérelem

kelte:

6. A kérelmező

aláírása:

5. Felhívjuk a kérelmező figyelmét arra, hogy a 40/2013. (II. 14.) Korm. rendelet 47. § (7) bekezdése értelmében a projektengedély módosítását vagy megújítását kell kérelmezni a projektben bekövetkező, az állatok jólétét esetlegesen hátrányosan érintő bármely változás esetén.

Kelt: , . év . hó . nap



Orális inzulin vakcina fejlesztése az I-es típusú diabétesz kialakulásának megelőzésére gyermekekben

Klinikai fejlesztési tervek

Debreceni Egyetem

GINOP-2.3.4-15-2016-00002

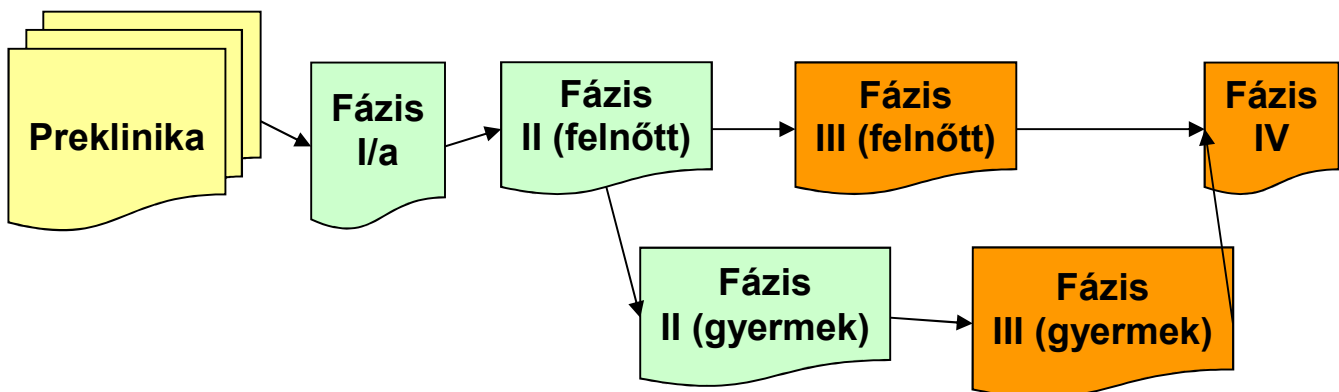
Klinikai vizsgálati terv

1. Bevezetés

A preklinikai fejlesztési lépések sikeres befejezését és kiértékelését követően kerülhet sor a humán fejlesztés kivitelezésére. Ehhez mindenekelőtt a felügyelő hatóságnál kell kezdeményezni az engedélyezést, vagyis EU terminológiával CTA-t (Clinical Trial Application) kell benyújtani.

Elméletileg a humán fejlesztés első lépése lehetne egy összevont Fázis I-II jellegű klinikai vizsgálat. Tekintetbe kell venni azonban, hogy inzulin orális bevitelével kapcsolatban jelenleg igen kevés szakirodalmilag megalapozott információval rendelkezünk. Ezen túlmenően az inzulin sikeres felszívódása esetén nem csupán a jelen fejlesztés szempontjából kívánatos terápiás hatás (vagyis az immunrendszerre gyakorolt kedvező hatás), hanem az inzulin vércukorháztartásra gyakorolt hatása is megjelenhet, ezért legcélszerűbb a humán fejlesztést klasszikus módon, azaz egészséges önkéntesek bevonásával végrehajtott humán I/a fázisú klinikai vizsgálattal kezdeni.

A klasszikus lineáris fejlesztési séma a jelen esetre alkalmazva vázlatosan a következő:



A fejlesztés tervezésének jelenlegi szakaszában a fázis III és Fázis IV vizsgálatok (az ábrán barna háttérrel jelennek meg) tervezése még nem indokolt, mivel azokra csak a korai humán fejlesztés sikeres befejezése, és a fejlesztési hipotézis igazolása után kerülhet sor.

A T1D minden fázisában lehet terápiás értéke az orális inzulinnal antigén specifikus toleranciát indukáló kezelésnek

Előnyök és hátrányok a különböző fázisokban:

Fázis	Előny	Hátrány
0	Nincs még ismert autoimmunitás (<1 autoantitest), csak predispozíció	Nincs még ismert autoimmunitás, nem biztos, hogy valaha lesz megbetegedés
1	Az elsődleges immunológiai folyamat már elindult, minimális a β -sejt vesztés, kevés a halmozódó patológiás elváltozás,	Szűrést igényel a gyerekek kiválasztása; (van hatékony módszer autoantitestre) még nincs nyilvánvaló betegség, kisebb a hajlandóság a kezelésre.
2	Diszglykémia, szűrni kell, prediktív progresszióra	Csökkenő érzékenység?
3	Jelentős a β -sejt vesztés, halmozódó patológiai elváltozások	Definitív megbetegedés, a betegek azonosítottak, jobb hajlandóság a kezelésre, a kezelés hatása az általános várakozás szerint alacsonyabb.

Javaslat: 1-2 fázisok határa, screen autoantitest szűrés, utána metabolizmus vizsgálat (OGTT, C-peptid)

2-3 autoantitest jelenléte esetén, a 3 éven belüli progresszió manifeszt diabéteszhez kb. 15%. Ezt az arányt a metabolizmus és HLA vizsgálat még jelentősen emelheti, kívánatos a legalább 50%-os arány, hogy a statisztikai analízishez szükséges esetszám elérhető legyen.

Szisztémás inzulin hatás:

Az orális inzulin formula kb. 30%-os felszívódása révén jelentős szisztémás hatással rendelkezik, ezért adásánál mérlegelni kell a potenciális nyereség és az esetleges, nem jól ismert rizikó arányát. A szisztémás inzulin hatás minden esetben limitálni fogja a maximálisan adható dózist.

Fázis	Szisztémás inzulin hatás megítélése	Lehetséges orális inzulin dózis
0	Nem kívánatos, safety, alacsony betegség prediktivitás miatt felesleges kezelés	Inkább nem

1	Nem kívánatos, de a betegség valószínű kialakulása már megengedőbb állapot	0,1-0,3 U/kg/nap, ebből felszívódik 30% (napi inzulin igény 7-20%-a)
2	A kezdődő β -sejt diszfunkció miatt indokolható az orális inzulin kezelés.	A testsúly alapján számított napi inzulin igény 30-100%-a
3	Inzulin pótlás mindenképpen szükséges, ennek része lehet az orális inzulin	Napi inzulin igény 100%-a (33% szisztémás hatás)

Javaslat: Elfogadható az orális inzulin kezelés késői 1. fázistól.

Betegek elérhetősége:

Fázis	Betegek kiválasztása	Szükséges betegszám
0	1./ T1D hozzátartozó: 5% high risk, genetikai szűrés: 10% high risk; nem elég hatékonyak	-----
1	Autoantitest szűrés: 0,3% találati arány; 1 milliós vonzaskörzetben évente kb. 8 ezer születés, (1.5-6 év 35 ezer) kb. 90 gyerek autoantitesttel (60 (0.22%) with stage 1)	Elsődleges végpont: progresszió diabéteszhez 3, (5?) év alatt. Kaplan Meier modellezést el kell végezni.
2	Csökkent glukóz toleranciát macerás mérni, marad az autoantitest, mint elsődleges szűrés	Kb. 2x30 beteg, de egy dózis nem elégséges
3	Az új megbetegedéseket (<6 hónap) lehet érdemes vizsgálni, évente (3-12 éves kb 50/100ezer)	Ha nincs remisszió, gyenge a végpont

2. Tervezett klinikai vizsgálatok

A felnőtt és gyermek populációk bevonásával tervezett klinikai vizsgálat(ok) főbb paramétereinek (elrendezés, kezelési idő, végpontok, stb.) és ütemtervének meghatározása az első feladat.

A human hatástani klinikai vizsgálat realitása a preklinikai vizsgálatokban megfigyelt hatás függvénye. Ugyancsak a preklinikai vizsgálatokban megfigyelt hatékonyság alapvető meghatározza a human klinikai vizsgálatok lehetséges céljaira, például, ha csak mérsékelt preventív hatás várható, akkor az hosszú kezelést igényel és nagyszámú még tüneteket nem mutató gyerek bevonását, kezelését igényli, vagy kifejezett terápiás hatás, aminek vizsgálata kisebb számú, már a T1D tüneteit mutató, ismert betegeken sokkal könnyebben megvalósítható.

A klinikai vizsgálat előfeltétele

- Stabil, minősített gyógyszerformulák (verum és placebo), ami a klinikai vizsgálat várható végéig felhasználható, újra gyártható.
- Analitikai vizsgáló módszer a gyógyszerformula minősítéséhez.
- A hatástani klinikai vizsgálatok előfeltétele a human fázis I vizsgálat sikeres eredménye.

A korábbi, inzulinnal történő immunológiai tolerancia kiváltását célzó klinikai vizsgálatok átlagos hatékonyságánál jobbat feltételezve, ami eléri a CD-3 ellenes antitestek hatását - legalább két évvel késleltetni tudják a humán T1D megjelenését- a következő általános megfontolások merülnek fel egy T1D prevenció klinikai vizsgálat kapcsán.

Preklinikai eredmények és a T1D ismert immunológiai patomechanizmusa alapján, a T1D összes klinikai fázisában várható kedvező terápiás hatás antigén specifikus. A T1D kialakulásának egyes szakaszai az eddigi vizsgálatok alapján azonban eltérő módon reagálnak az immunológiai toleranciát eredményező kezelésre.

2.1. Fázis I klinikai vizsgálat - egészséges felnőtt önkénteseken tervezett vizsgálat összefoglalása

A humán I/ a fázisú vizsgálat során átlagos létszámú, egészséges önkéntesek bevonására kerülne sor. Mivel a készítmény humán sajátosságai értelemszerűen kevésbé ismertek, ezért célszerűen több dózisszint alkalmazása kívánatos. A dózisosk száma azonban praktikusán ne legyen túl magas, mivel az a klinikai vizsgálat elhúzódsához vezetne.

Fázis I klinikai vizsgálat főbb adatai:

A vizsgálat időtartama:	akár 10 hét is lehet
Vizsgálóhely:	Debreceni Egyetem – Klinikai Farmakológiai Tanszék
A vizsgálat elrendezése:	Kettős vak, randomizált, placebo-kontrollált elrendezés dózis eszkalációval, egy vizsgálóhelyen
A vizsgálat alanyai:	24 egészséges férfi és nő

A humán fázis I/a vizsgálat tipikusan az alábbi információkat szolgáltatja:

- a) Gyógyszerbiztonságosság igazolása
- b) Mellékhatások feltérképezése
- c) Maximálisan tolerálható humán dózis meghat.
- d) 4: Humán PK/metabolizmus vizsgálata
- e) 5: Terápiás/farmakodinámiás hatás vizsgálata

Jelen fejlesztés során a fenti a) és b) szempontok (Gyógyszerbiztonságosság, illetve Mellékhatások) vizsgálata kiemelt fontosságú, különösen, mert az orálisan adott inzulin felszívódása esetén az befolyásolhatja a vércukor-szintet. A tervezett inzulin-dózisok mellett, egészséges szervezet esetén nem várható komoly, tünetekkel járó vércukor-esés, azonban ennek lehetőségét – különösen ebben a legkorábbi humán klinikai fejlesztési szakban mindenképpen indokolt figyelemmel követni.

A korábban a humán fázis I vizsgálatokban nagy fontosságú szempont, a maximálisan tolerálható dózis meghatározása napjainkban háttérbe szorult. Mivel a fejlesztés középpontjában várhatóan nem dóziszfüggő szervezeti változást kívánunk kutatni, ezért e szempont vizsgálata nem indokolt.

A humán farmakokinetikai paraméterek vizsgálatát abban az esetben érdemes a vizsgálat céljai közé felvenni, amennyiben az állatkísérletes adatok szerint mérhető vérszint-változások alakulnak ki az orálisan adott inzulin következtében. A vizsgálat ezen irányú kiterjesztéséről ezért a preklinikai szakasz adatainak ismeretében lehet dönteni.

Szintén a fejlesztés középpontjában álló indikáció, valamint az egészséges önkéntesek szervezetének homeosztatisz pufferekapacitása miatt a terápiás/farmakodinámiás hatás várhatóan nem lesz vizsgálható.

A Fázis I/a vizsgálat eredményeként az alábbi eredményekre lehet számítani:

- Megállapítható, hogy egészséges önkénteseknek az orális inzulint tartalmazó készítmény biztonságosan adagolható, illetve, hogy az alkalmazás jár-e, és ha igen, milyen mellékhatásokkal. Tekintettel arra, hogy a humán Fázis I/a vizsgálatban csak kis létszámú önkéntes csoport vesz részt, ebből a vizsgálatból csupán a leggyakrabban előforduló mellékhatások azonosítása várható. A mellékhatás-spektrum megbízható megállapítása várhatóan csak a Fázis III, de még inkább a posztregisztrációs (Fázis IV és későbbi) klinikai vizsgálatok révén lesz lehetséges. Ez fontos szempont annak eldöntéséhez, hogy a készítmény kedvező kockázati profillal adható-e betegeknek, illetve – később – gyermekeknek.
- Megfelelő farmakokinetikai vizsgálati lehetőség esetén humán adatokra alapozva lehet a későbbi humán fejlesztési szakaszokban alkalmazandó inzulín-adagokat kiválasztani.

Összességében megállapítható, hogy a humán Fázis I/a vizsgálatok elsődleges célja és értéke annak igazolása, hogy az orális inzulinkészítmény betegeken történő alkalmazása várhatóan kedvező kockázat-haszon egyensúly alapján valósulhat meg.

Amennyiben a Fázis I/a vizsgálat során kedvező eredmények születnek, a fejlesztés továbbvihető a Fázis II. szakaszba, vagyis a betegeken történő klinikai vizsgálatokra. A fejlesztési terv két csoporttal számol: felnőtt és gyermek betegekkal. A „beteg” terminológia jelen fejlesztés esetében nem a klasszikus értelemben vett, már manifeszt betegségállapotban lévő személyeket jelent, hanem olyan személyeket, akik esetében a más dokumentumokban részletesen ismertetett biokémiai marker-paraméterek alapján várhatóan ki fog alakulni idővel a manifeszt diabetes mellitus. A gyermekek vizsgálatára csak a felnőtt fázis II vizsgálatok lezárása, kiértékelése és kedvező eredménye esetén lehet sort keríteni. A fejlesztéshez kapcsolódó klinikai vizsgálatok gyermekekre történő kiterjesztése esetén külön gyermekgyógyászati fejlesztési tervet (PIP – Paediatric Investigation Plan) kell készíteni.

A humán fázis I vizsgálat tervezett protokollját a melléklet tartalmazza.

2.2. Fázis II klinikai vizsgálat tervezet összefoglalása

Az exploratív terápiás jellegű Fázis II vizsgálatok célkitűzése lényegében megegyezik a Fázis I vizsgálatokéval, egy lényeges különbséggel. A Fázis II vizsgálatok során kiemelt szemponttá válik a fejlesztett készítmény megcélzott terápiás hatékonysága meglétének igazolása. Amennyiben ezt a szempontot nem sikerül meggyőző adatokon alapuló bizonyítékkal alátámasztani, a készítmény további fejlesztése nem indokolt. A jelen fejlesztési terv sajátossága (felnőtt és gyermek Fázis II

vizsgálat) ez azt jelenti, hogy a felnőtteken elvégzett sikertelen Fázis II vizsgálat esetén már nem kerülne sor a gyermekek Fázis II vizsgálatára.

A Fázis II vizsgálatokba olyan személyek kiválasztása és bevonása szükséges, akiknél a meghatározott biokémiai marker-profil egyértelműen jelzi, hogy az illető személyek diabetes mellitus (T1DM) kialakulása szempontjából egyértelműen veszélyeztetettnek tekinthetők. Ez egyúttal a vizsgált személyek toborzását jelentős mértékben nehezítő tényező. Szakirodalmi adatokból ismert, hogy ez a konstelláció viszonylag ritkán fordul elő az átlagos populációban. Hasonlóképpen, a megfelelő szűrővizsgálatok híján ez a betegségmegelőző állapot ritkán kerül felismerésre. A kialakult T1DM esetén pedig már bizonytalan, hogy az orális inzulin-terápia képes-e ezt az állapotot kedvezően befolyásolni. Mindezek alapján a Fázis II vizsgálatokban gyakorlati okból jelentős (néhány száz) fős betegpopuláció bevonása nem reálisan elérhető cél. A jelen fejlesztés keretében végzendő Fázis II vizsgálatok ezért „Proof of Concept” jellegű és igényű vizsgálatok lehetnek. A kezelési idő tekintetében mindazonáltal mérlegelni kell, hogy az alkalmas legyen az optimális terápiás hatás kifejlődéséhez.

Fázis II felnőtt klinikai vizsgálat főbb adatai:

A vizsgálat időtartama:	25 hónap
Vizsgálóhely:	3-5 klinikai vizsgálati hely Magyarországon
A vizsgálat elrendezése:	Kettős vak, randomizált, placebó-kontrollált elrendezés dózis eszkalációval, 3-5 vizsgálóhelyen
A vizsgálat alanyai:	50 fő 18-25 év közötti felnőtt

Fázis II gyermek klinikai vizsgálat főbb adatai:

A vizsgálat időtartama:	25 hónap
Vizsgálóhely:	3-5 klinikai vizsgálati hely Magyarországon
A vizsgálat elrendezése:	Kettős vak, randomizált, placebó-kontrollált elrendezés dózis eszkalációval, 3-5 vizsgálóhelyen
A vizsgálat alanyai:	50 fő 6-18 év közötti gyermek/serdülő

A vizsgálatnak a készítmény hatékonyságának megállapítására szolgáló aspektusához szükséges a vizsgálatokba bevont személyek állapotának a szakirodalom adatainak ismeretében kialakított

hatékonysági paraméterek hosszmetzeti követése és értékelése. E tekintetben a felnőtteken, illetve a később a gyermekeken elvégzendő Fázis II vizsgálatok felépítése hasonló.

A Fázis II vizsgálatokból származó eredmények alátámaszthatják a terápiás hipotézist, tehát a premorbid státusból manifest T1DM betegségbe történő átalakulás elmaradását. Mindazonáltal a Fázis II vizsgálatok időben korlátozott hosszúsága miatt e tekintetben inkább egy szignifikánsan kedvező tendencia várható elsősorban. Amennyiben ez a tendencia igazolható, úgy a valós hatékonyság bizonyítására Fázis III vizsgálatok elvégzése indokolt.

A humán fázis II vizsgálatok tervezett protokolljait a melléklet tartalmazza.

3. Megfontolások egy eredményes klinikai vizsgálat megvalósításához.

Az immunológiai tolerancia kialakulását igen jelentősen befolyásolhatja a tolerancia kiváltására alkalmazott antigén mennyisége. A rágcsőbe hatékony antigén mennyisége alapján, csak nagy kockázattal válsztható egyetlen humán dózis, ezért legalább két human antigén dózis vizsgálata kívánatos.

A CD-3 ellenes antitestek legalább két évvel késleltetni tudják a humán T1D megjelenését. Ezért egy új prevenciós célú eljárástól legalább ez a hatékonyság elvárható, hogy terápiás értéke legyen.

Ezekből a feltételekből - a kontroll csoportban 5 év alatt 50%-os diabétesz megjelenése, a kezelt csoportban 2 évet késik a megbetegedés - a sikeres vizsgálathoz szükséges esetszám 25-27 betegnek adódik karonként, hogy a placeboval és orális inzulinnal kezelt csoportok közt $p < 0,05$ megbízhatósággal különbséget tudjunk tenni.

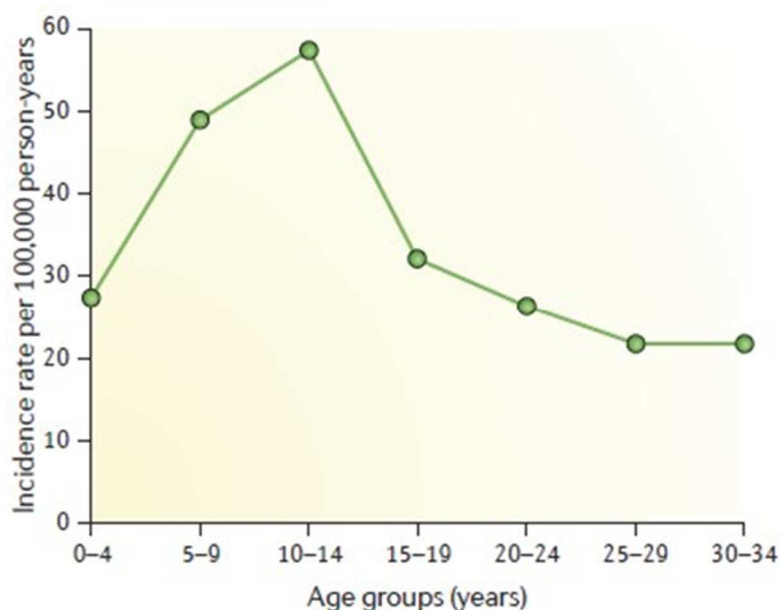
Akár lehetne open vizsgálat is, mert elegendő adat áll rendelkezésre a betegség lefolyására. Mivel a környezeti hatások fontos szerepe van a betegség kialakulásában, a kettős vak vizsgálat eredménye sokkal többet ér.

Preklinikai eredmények és a T1D ismert immunológiai patomechanizmusa alapján a T1D összes klinikai fázisában várható kedvező terápiás hatás antigén specifikus, részben az inzulinhoz kapcsolódó immunológiai tolerancia kiváltásától. A T1D kialakulásának egyes szakaszai az eddigi vizsgálatok alapján azonban eltérő módon reagálnak az immunológiai toleranciát eredményező kezelésre. A tünetmentes és autoantitest termelést még nem mutató korai fázisban a predispozíció csak alacsony hatékonysággal mutatható ki. A T1 diabéteszes betegek közeli rokonai közt csak 5%-os a későbbi T1D előfordulása, a genetikai jegyek alapján legfeljebb 10%-os biztonsággal jelezhető előre a diabétesz

megjelenése, így 0 fázisban végzett vizsgálat hatékonysága rendkívül alacsony és a résztvevők döntő többsége feleslegesen lenne kitéve a kezelésnek, mert náluk sosem alakul ki a betegség.

A T1D első fázisában már megfogható objektív elváltozások jelennek meg, Langerhans szigetek elleni autoantitestek és a β -sejt funkció finom romlása. Az autoantitestek (≥ 2) jelenléte nagy hatékonysággal akár néhány μl plazmából is kimutatható, a β -sejt funkció romlása OGTT és C-peptid méréssel érzékenyen meghatározható, de a kis fokú, a természetes variabilitás szélén levő értékek növelik a fals pozitív egyének kiválasztásának az esélyét. A betegség még bizonytalan megjelenése ronthatja a vizsgálatban való részvételi hajlandóságot. A bizonytalanságok ellenére a késői egyes fázisban 50% feletti hatékonysággal választhatóak ki azok a gyerekek, akikben később kialakul a T1D. A csoport fontosságát adja, hogy várhatóan magasan érzékeny a toleranciát indukáló kezelésre.

A T1D második fázisában lévő betegek nagy hatékonysággal azonosítani lehet az autoantitestek (≥ 2) jelenléte és a diszglykémia (OGTT) alapján. A tünetek megjelenése előtt a betegek azonosítása szűrővizsgálatot igényel. A T1D-es betegek leszármazottjai közt 5%-ban alakul ki később T1D ezért köztük hatékonyabb a szűrés, de az így azonosítható esetek száma messze nem elég egy klinikai vizsgálat számára. Az alábbi ábra a T1D incidenciáját mutatja a kor függvényében. A görbe csúcsa 10-12 év köré esik, ezért a 1-2 fázisú betegeket kimutatására 10 éves kor alatt van a legnagyobb esély.



The incidence of diabetes among 0-34 year olds in Sweden. Rawshani A et al. Diabetologia. 2014 Jul;57(7):1375-81.

Magyarországon évente 200-250 új T1D jelenik meg gyermekkorban és ennek mintegy fele 10 éves kor előtt.

Két-hét éves T1D predispozícióval rendelkező gyerekek követése esetén a T1D legnagyobb megjelenési valószínűsége beleesik egy még tolerálható öt éves követési időbe. A teljes 2-7 éves korcsoport mintegy 420.000 fő Magyarországon. Közülük várhatóan 1200-nál alakul majd ki T1D és kb. 300 gyereknél ez 12 éves koruk előtt következik be. Az 1-2 stádiumú T1D-es betegeket csak szűréssel lehet megtalálni, gyerek populáció szűrések a vizsgáltak 0,3-ban mutatnak ki szigetsejt ellenei autoantitestet (2-5 éves kórcsoport) [3]. A következő ábra mutatja, hogy időben hogyan jelenik meg a diabétesz az autoantitestet hordozó betegek körében. A két autoantitestet hordozó gyerekeknek mintegy 20%-ban alakult ki diabétesz 5 éven belül (zöld). A β -sejt működés zavara alapján a kiválasztási arány javítható, de ez azzal jár, hogy a szűrés hatékonysága becsülhetően a felére csökken, ha 50% -os diabétesz megjelenést várunk a kiválasztott csoportban 5 éven belül. Tehát 100 potenciális vizsgálati jelölt kiválasztásához kb. 66.000 gyerek szűrését (autoantitest, OGTT) kell elvégezni

A harmadik fázisú T1D-es betegek a tünetek alapján már azonosítottak. A csoport legnagyobb hátránya, hogy az **általános nézet szerint** a tünetek megjelenésekor, évekkel az immunológiai folyamat elindulása után, **a betegekben már kevésbé váltható ki immunológiai tolerancia**. A patológiás elváltozások a betegség tartamával arányosan halmozódnak (pl. epigenetikai változások jelennek meg), ami jól magyarázhatja a csökkent terápiás érzékenységet.

A már diabéteszes betegek esetén a kezelés hatásának megítélését nehezíti, hogy a tünetek megjelenésekor a β -sejtek jelentős része már elpusztult és a inzulin termelés helyreállításához a β -sejtek proliferációja is szükség van az autoimmunitás felfüggesztése mellett. Az inzulin kezelés miatt az immunológiai kezelés hatását csak az inzulin igény és a C-peptid szint változása alapján lehet mérni. Az immunológiai hatás egyszerűen becsülhető az autoantitestek mennyiségi változása és a Treg limfociták számának változása alapján. Ugyancsak bonyolítja a hatás megítélését, hogy a diabétesz diagnosztizálását követően inzulin kezelés mellett, vagy akár a nélkül is, mitegy az esetek felében a betegek állapota átmenetileg javulást ("honeymoon period") mutat. A már diabéteszes betegek esetén a β -sejt funkció kismértékű javulásának lehet értékes eredménye, mert az exogén inzulin mellett hozzásegíthet az egyenletesebb egész napi glukóz szint fenntartásához, aminek hosszú távon a szövődmények csökkenése lehet az eredménye.

Az immunológiai tolerancia kialakulását igen jelentősen befolyásolhatja a tolerancia kiváltására alkalmazott antigén mennyisége. A rágcslóba hatékony antigén mennyisége alapján, csak nagy kockázattal válsztható egyetlen humán dózis, ezért legalább két human antigén dózis vizsgálata kívánatos.

A CD-3 ellenes antitestek legalább két évvel késleltetni tudják a humán T1D megjelenését. Ezért egy új prevenciós célú eljárástól legalább ez a hatékonyság elvárható, hogy terápiás értéke legyen.

Ezekből a feltételekből - a kontroll csoportban 5 év alatt 50%-os diabétesz megjelenése, a kezelt csoportban 2 évet késik a megbetegedés - a sikeres vizsgálathoz szükséges esetszám 25-27 betegnek adódik karonként, hogy a placeboval és orális inzulinnal kezelt csoportok közt $p < 0,05$ megbízhatósággal különbséget tudjunk tenni.

Ez azt jelenti, hogy két inzulin dózis esetén 75-80 beteget kellene bevonni a vizsgálatba, ami mintegy **50 ezer gyerek szűrését** igényli. Debrecen körzetében mintegy egymillió ember él, a 2-5 éves korcsoport nagysága mintegy 70.000 fő. Ez azt jelenti, hogy szinte a teljes korcsoport vizsgálatára szükség akkor is, ha magas a hajlandóság a vizsgálatban való részvételre. Az alacsony vizsgálati hajlandóság valószínű, mivel a gyerekek még nem mutatnak klinikai tüneteket, nem betegek, ezért a szülők nem szívesen teszik ki a gyerekeket vizsgálati fázisban levő gyógyszerrel folytatott kezelésnek, különösen akkor, ha a családban nincs T1D-es beteg. Alacsonyabb vizsgálati hajlandóság esetén Debrecen vonzáskörzete nem elégséges a szükséges betegszám szűrésére.

Ugyanakkor létező gyakorlat a gyerekek T1D rizikójának szűrése. A Helmholtz Zentrum Münchenben vezette a világon először gyerekek T1D rizikójának nagy volumenű szűrését az autoantitestek alapján, és 2015-19 közt több, mint 90.000 vizsgálatot végeztek. Figyelembe véve a nagy volumenű vizsgálat rendkívüli költségét, célszerűbbnek látszik a klinikai vizsgálatnál egy már működő szűrő rendszerhez csatlakozni, mint a vizsgálatok céljából új vizsgáló rendszert alapítani.

Jelenleg nincs klinikai vizsgálat, ami irányadó lenne a várható hatékonyságra. A preklinikai vizsgálatok eredményire lehet alapozni majd a vizsgálatot. A vizsgálat célozhatja az inzulin termelés részleges helyreállítását legalább 3 évig. Rövidebb idejű, vagy kisebb hatásnak nincs terápiás értéke, ha a beteg úgy is inzulin kezelésen van. Legjobb esetben is csak a betegek egy része fog reagálni a kezelésre. Amennyiben a kezelt betegek 25%-ban látunk javulást és placeboval kezelt betegeken ez az arány négyszer kisebb, akkor karonként 30-40 beteg esetén értékelhető lehet a vizsgálat. Amennyiben a kezelésre reagáló betegek aránya ennek a fele, akkor karonként 80-100 beteg esetén várhatunk csak, hogy kimutatható a hatás.

A fenti fejlesztési tervben hivatkozott szakirodalmi adatok külön dokumentumban találhatóak.



Orális inzulin vakcina fejlesztése az I-es típusú diabétesz kialakulásának megelőzésére gyermekekben

Fázis I klinikai vizsgálati protokoll tervezet

Debreceni Egyetem

GINOP-2.3.4-15-2016-00002

UNIVERSITY OF DEBRECEN

Trial Protocol

Protocol No: TBD
EudraCT Number: TBD
Phase: phase 1

**A randomized, double-blind, placebo controlled human Phase I study of a novel
oral insulin preparation in healthy volunteers**

This clinical trial protocol belongs to the University of Debrecen. The protocol is confidential and it can be applied in connection with this trial only. Application and reproduction of any part of this protocol anywhere is not allowed without written contribution of SPONSOR. Informing anybody, who is not involved in this trial, about the content of this protocol, is not allowed.

Sponsor: University of Debrecen
Address: H-4032 Debrecen, Egyetem tér 1., Hungary

Clinical Study Site: University of Debrecen, Department of Clinical Pharmacology
Address: H-4032 Debrecen, Nagyerdei krt. 94., Hungary

Investigational medical products:
Oral insulin capsules
Matching placebo

State of protocol: Draft

Date: 20 November 2020

CONFIDENTIAL

Declaration and Signature of Persons Responsible for the Study

The Sponsor and investigator agree with the protocol and declare that they will carry out the study according to the protocol, current legislations, GCP guidelines as well as requirements of authorities. If any intentional change from the protocol turns out to be necessary the Sponsor and the Investigator should make an agreement on amendment of protocol in a written form.

Sponsor:

University of Debrecen
H-4032 Debrecen, Egyetem tér 1.,
Hungary

Responsible study supervisor:

Name/Signature

Date /dd.mmm.yyyy./

Clinical Study Site name:

University of Debrecen, Department of
Clinical Pharmacology
H-4032 Debrecen, Nagyerdei krt. 94.,
Hungary

Principal investigator:

Name/Signature

Date /dd.mmm.yyyy./

Table of Contents

1. SYNOPSIS	5
2. STUDY FLOW CHART	7
3. ABBREVIATIONS AND ACRONYMS	8
4. GENERAL INFORMATION	9
5. RESPONSIBILITIES AND ADDRESSES	9
6. BACKGROUND AND RATIONALE	11
6.1. DESCRIPTION OF THE INVESTIGATIONAL DRUG: IMP	11
6.1.1. <i>Mode of action of IMP</i>	11
6.1.2. <i>Indications of (IMP):</i>	11
6.1.3. <i>Side effect profile of IMP</i>	11
6.1.4. <i>Pharmacokinetic profile of IMP</i>	11
6.2. RATIONALE FOR STUDY	12
6.3. REFERENCES RELEVANT TO THE BACKGROUND AND RATIONALE FOR THE STUDY	13
7. STUDY OBJECTIVE(S)	17
7.1. PRIMARY OBJECTIVES	17
7.2. SECONDARY OBJECTIVES	17
8. STUDY POPULATION	17
8.1. SAMPLE SIZE	17
8.2. SELECTION OF STUDY POPULATION	17
8.3. SUBJECT RECRUITMENT PROCEDURES	17
8.4. SUBJECT INCLUSION CRITERIA	18
8.5. SUBJECT EXCLUSION CRITERIA	18
8.6. SUBJECT COMPLIANCE	19
8.7. SUBJECT WITHDRAWAL CRITERIA	19
8.8. REPLACEMENT OF DROP-OUTS	20
8.9. PREMATURE TERMINATION OF THE STUDY	20
9. STUDY DESIGN	20
9.1. ASSIGNMENT TO TREATMENTS AND RANDOMIZATION PROCEDURES	20
9.2. BLINDING	21
9.3. PROTOCOL ADHERENCE	21
9.4. STATISTICAL ANALYSIS	21
9.4.1. <i>Efficacy data analysis</i>	21
9.4.2. <i>Safety data analysis</i>	21
10. STUDY MEDICATION, DOSAGES AND DURATION OF TREATMENT	21
10.1. SUPPLY, PACKAGING AND LABELLING	21
10.2. STORAGE, HANDLING PROCEDURES, ACCOUNTABILITY	22
10.3. DETAILED DESCRIPTION OF STUDY MEDICATIONS	22
10.4. DOSAGE AND ADMINISTRATION	23
10.5. DURATION OF TREATMENT	23
10.6. SELECTION OF DOSES AND DURATION OF TREATMENT	23
10.7. CONCOMITANT THERAPY	23
11. STUDY PROCEDURES	23
11.1. SCREENING	24
11.2. STUDY PROCEDURE IN EACH TREATMENT PERIOD	24
11.3. POST-STUDY PROCEDURE	25
11.4. SAFETY ASSESSMENTS	26

11.5.	STUDY RESTRICTIONS	26
12.	DETERMINATION OF SAFETY	26
12.1.	DEFINITION	26
12.2.	DOCUMENTATION AND REPORTING OF ADVERSE EVENTS	27
12.2.1.	Reporting procedure	27
12.2.2.	Documentation of adverse events	29
12.3.	VALIDATION, EVALUATION OF ADVERSE EVENT REPORTS	30
12.4.	CODING DICTIONARY	30
12.5.	ANALYSIS OF SAFETY DATA	30
12.6.	EMERGENCY PROCEDURES.....	30
12.7.	CLINICAL LABORATORY TESTS.....	30
13.	QUALITY CONTROL AND QUALITY ASSURANCE.....	31
13.1.	MONITORING.....	31
13.2.	AUDITING.....	31
14.	REGULATORY AND ETHICAL ISSUES	31
14.1.	DECLARATION OF HELSINKI.....	31
14.2.	ETHICS COMMITTEE AND REGULATORY AUTHORITIES	31
14.3.	INFORMATION FOR VOLUNTEERS AND INFORMED CONSENT	32
14.4.	CONFIDENTIALITY.....	32
15.	DATA MANAGEMENT	33
15.1.	INVESTIGATOR’S FILE	33
15.2.	CASE REPORT FORMS.....	33
15.3.	ARCHIVING.....	33
15.4.	DISCLOSURE OF INFORMATION.....	33
16.	PROTOCOL AMENDMENTS AND DEVIATIONS.....	34
17.	FINANCIAL ASPECTS	34
18.	INSURANCE.....	34
19.	CLINICAL STUDY REPORT.....	35
20.	PUBLICATION POLICY	35
21.	GENERAL REFERENCES	35

1. Synopsis

Name of Sponsor: University of Debrecen	
Study medication: A novel new orally active insulin preparation in capsule form	
Title of Study: A randomized, double-blind, placebo controlled human Phase I study of a novel oral insulin preparation in healthy volunteers	
Investigator: Prof. Dr. Dénes PALL	
Study centre: University of Debrecen, Department of Clinical Pharmacology H-4032 Debrecen, Nagyerdei krt. 94., Hungary	
Study period per subject: Up to 10 weeks	Phase of development: Phase 1
Objectives: 1. To investigate the safety of single ascending doses of IMP administered per os. 2. To investigate the tolerability of single ascending doses of IMP administered per os.	
Study design: Single center, double-blind, placebo controlled, randomized design with dose-escalation.	
Subjects: 24 eligible healthy male and female subjects will be enrolled into the study. (Drop-outs will be replaced.)	
Screening procedures: <ul style="list-style-type: none">➤ Demography data (age, race), body weight and height, BMI.➤ Medical history.➤ Physical examination (including measurements of blood pressure and heart rate after 5 minutes supine rest, and body temperature), standard 12 lead ECG.➤ Laboratory tests (after 10 hours fasting): haematology, blood chemistry and urinalysis.➤ Urine drug screen.➤ Alcohol breath test.➤ Viral serology (HBsAg, Anti HCV, HIV 1+2, COVID PCR).	
Confinements and visits: For each period, subjects will be confined at least 11 hours before dosing until 24±1 hours post-dose	
Subject safety: In each study period: <ul style="list-style-type: none">➤ Medical history update, short interview for presence of exclusion criteria.➤ Physical examination update➤ Temperature before dosing.➤ Blood pressure, pulse rate before dosing and 1, 2 and 4 hours post dose➤ ECG before dosing and 5 hours post-dose➤ Blood sampling for routine lab assessments before dosing➤ Blood sampling for blood glucose, Se insulin, C-peptide before dosing and 30', 60', 90', 120', 180' and 240' post-dose All adverse events will be monitored and recorded throughout the study period.	
Statistical analysis: Individual and summary blood pressures, heart rate, ECG parameters, and clinical laboratory data will be presented in tabular form with mean, median, standard deviation and range (min and max) as appropriate. For the laboratory safety data, out of range values will be flagged in the data listings and a list of	

clinically significantly abnormal values will be presented.
Adverse events will be tabulated and summarised according to the current version of Medical Dictionary for Regulatory Activities (MedDRA)

This study will be conducted in compliance with GCP guidelines (CPMP/ICH/FDA).

2. Study Flow Chart

###

Assessment	Screening	Treatment Periods 1, 2, 3, 4			Follow-up
		Day -1	Day 1	Day 2	
Informed Consent	X				
Demographic Data	X				
HIV, HbsAg, Hep C	X				
Medical History	X				
Medical History update		X			X
Drug + Alcohol Screen	X	X			
Physical Exam	X	X			X
IMP Administration OD			X		
Vital Signs (blood pressure, pulse rate, body temperature)	X		X ¹	X ²	X
12 lead ECG	X		X ³	X ²	X
Routine lab tests	X		X ⁴	X ⁴	X
Blood glucose, Se insulin, C-peptide			X ⁵		
Adverse Events		X	X	X	X
Discharge from Unit				X	

1: before dosing and 1, 2 and 4 hours after dosing

2: before discharge

3: before dosing and 5 hours after dosing

4: before dosing and approx. 24 hours after dosing (before discharge)

5: before dosing and 30', 60', 90', 120', 180' and 240' after dosing

3. Abbreviations and Acronyms

AE	Adverse Event
ALP	Alkaline Phosphatase
ALT	Alanine amino transferase
ANOVA	Analysis of Variance
AST	Aspartate amino transferase
CEC	Central Ethics Committee
CK	Creatine phosphokinase
CRF	Case Report Form
ECG	Electrocardiography
FDA	Food and Drug Administration
GCP	Good Clinical Practice
GGT	Gamma glutamyl transpeptidase
GLP	Good Laboratory Practice
GMP	Good Manufacturing Practice
HbsAg	Hepatitis B surface antigen
HCV	Hepatitis C
HIV	Human immunodeficiency virus
ICH	International Council for Harmonization
IMP	Investigational Medical Product
ITT	Intention-to-treat
LDH	Lactate dehydrogenase
Max	Maximum
MCHC	Mean corpuscular haemoglobin concentration
MCV	Mean corpuscular volume
Min	Minimum
OD	Once daily
PP	Per Protocol
SD	Standard deviation
SOP	Standard Operating Procedure
SAE	Serious Adverse Events
SUSAR	Suspected Unexpected Serious Adverse Reaction
SDV	Source document verification
TBD	To be defined (later)

4. General Information

Name and address of the Sponsor	University of Debrecen H-4032 Debrecen, Egyetem tér 1., Hungary ☎: (+36 1) TBD Fax. (+36 1)
Name and address of the clinical investigational site	University of Debrecen, Department of Clinical Pharmacology H-4032 Debrecen, Nagyerdei krt. 94., Hungary ☎: (+36 1) TBD Fax. (+36 1)
Statistical evaluation	TBD
Safety data analysis	TBD
In case of adverse drug reaction should be informed	TBD
Estimated start of the study	Q3 2021
Estimated end of the clinical part of the study	Q4 2021
Final report	Q2 2022

5. Responsibilities and Addresses

Sponsor

Study Supervisor: Name and address, phone, mail

Study Manager: Name and address, phone, mail

Monitor: Name and address, phone, mail

Drug Safety: Name and address, phone, mail

Clinical investigational site

Principal investigator: Name and address, phone, mail

Clinical Laboratory: Name and address, phone, mail

Statistical evaluation: Name and address, phone, mail

Safety analysis and Reporting

Safety data analysis: Name and address, phone, mail

Author of Integrated Study Report: Name and address, phone, mail

6. Background and rationale

6.1. Description of the Investigational Drug: IMP

6.1.1. Mode of action of IMP

Oral administration of insulin, i.e. absorption from the intestinal tract, has several benefits. The oral medicine avoids the risk of infection with frequent use of parenteral insulin. Oral drug compliance, as it is not unpleasant, is not painful is also superior to injectable treatment. During enteral absorption, insulin gets closer to the pathway of its physiological action, as first it enters the liver through the portal veins, and the highest insulin levels will not be observed at the periphery as it happens subcutaneous administration.

6.1.2. Indications of (IMP):

Diabetes mellitus (both Type 1 and Type 2) is a common illness affecting more and more people – both adults and children. One of the mainstays of diabetes therapy is insulin, known and used for over 100 years. The insulin, being a protein is not absorbed from the gastrointestinal tract intactly, thus it can be administered only parenterally (subcutaneously or intravenously). While this does not limit its use, an insulin preparation that could be administered orally offer huge advantage and increase patient compliance.

Another potential use of the oral insulin could be the prevention or at least delaying onset of Type 1 diabetes in children.

6.1.3. Side effect profile of IMP

At this stage of development human adverse event profile is unknown yet.

It can be expected that potential blood glucose lowering may occur with its linked side-effects (e.g. hypoglycaemia, weakness, feeling faint, feeling hungry, fainting), but at the doses administrated in this study such events are unlikely.

Also, allergic reactions to all components of the preparations may be expected.

6.1.4. Pharmacokinetic profile of IMP

Absorption: IMP is rapidly absorbed. Available data show that 30' after administration of the oral insulin preparation the blood glucose levels are already decreasing.

Distribution: Oral insulin enters the circulation in a near-physiological way, and enters the liver in the portal system. Thus its distribution follows the physiological process.

Elimination: Elimination of the insulin also occurs by a physiological pattern.

Important and favourable feature of IMP is that no dose adjustment is necessary in liver or kidney diseases because due to its metabolism it does not cumulate.

Changes of pharmacokinetic properties under special circumstances (e.g. age, accompanying diseases): This was not examined in depth. Further clinical trials are necessary to define this aspect.

6.2. Rationale for study

Type 1 diabetes mellitus (T1DM) is one of the most common hormonal and metabolic diseases that occur in childhood. The main feature of the disease, i.e. elevated blood sugar levels, is caused by the destruction of insulin-producing β cells in the pancreatic islets of Langerhans (1). In the vast majority of cases, the death and loss of function of β cells is caused by the autoimmune process against β cells. The cause of β -cell death in a small proportion of patients is unknown (2). The incidence of T1DM is increasing by 2-3% per year worldwide, with growth even faster in the under-5 age group (3).

Figure 1 illustrates the incidence and prevalence of childhood T1DM worldwide.

Figure 1. Incidence and prevalence of childhood T1DM worldwide

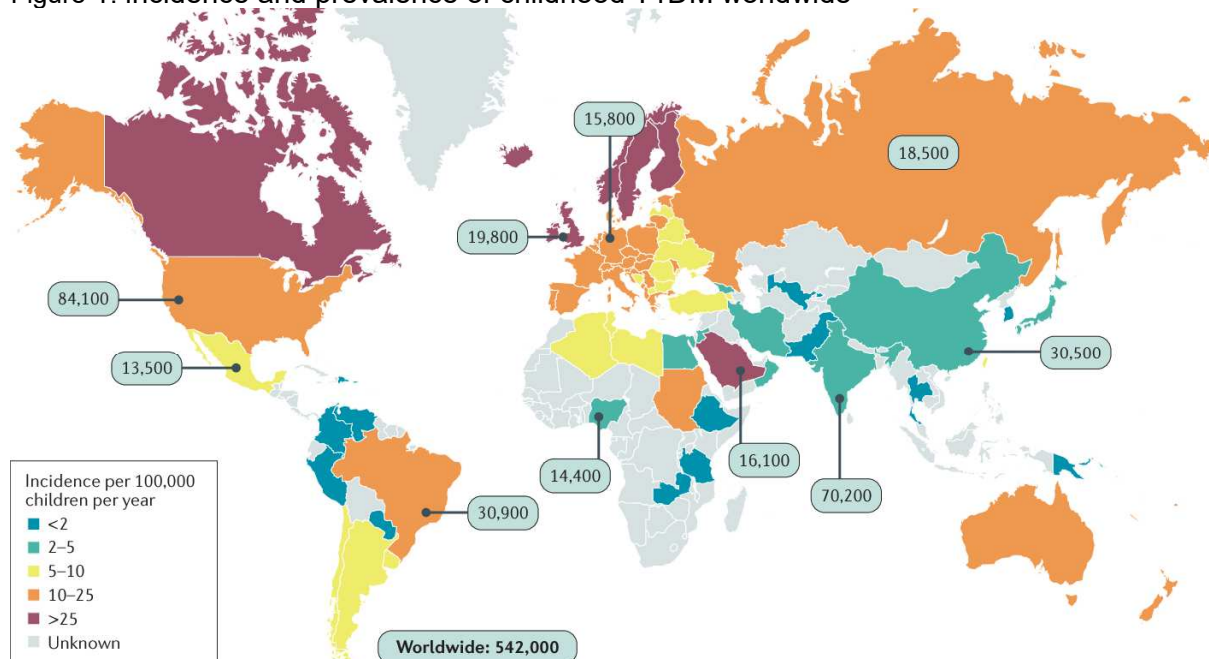


Figure 2 | The incidence and prevalence of T1DM in children. The estimated number of new cases of type 1

The direct cause of autoantibody production is not precisely known, an essential prerequisite is the antigen presentation by dendritic cells and the interaction of B cells with antigen-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells.

Treating T1DM requires an interdisciplinary approach, and collaboration between physician, dietitian, psychologist, patient, parents, and environment is essential to success. The goal of treatment is to maintain a long-term glycemic balance in a healthy lifestyle and to avoid severe hypoglycemic and hyperglycemic ketoacidosis. From the third stage of the disease, continuous insulin treatment is essential due to severe insufficiency of endogenous insulin production.

Since the mid-1970s, a number of open-label, uncontrolled studies have aimed to maintain or increase the amount and insulin-producing capacity of residual insulin-producing β cells through inhibition of the autoimmune process.

A new procedure to prevent the development of the disease has been started in the last few years. In a mouse model the chronic administration of oral insulin significantly decreased the incidence of Type 1 diabetes.

Given the autoimmune origin of the disease, the procedure attempts to desensitize the patient's body by an analogy to allergic diseases, which is also an abnormal immune response. In doing so, different amounts of insulin (oral insulin therapy) were given orally to at-risk children.

The aim of the current drug development is an oral insulin preparation that can be used in the everyday clinical practice.

6.3. References relevant to the background and rationale for the study

1. Eisenbarth GS. Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. *N Engl J Med*. 1986;314(21):1360-8.
2. American Diabetes A. (2) Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes Care*. 2015;38 Suppl:S8-S16.
3. Chobot A, Polanska J, Brandt A, Deja G, Glowinska-Olszewska B, Pilecki O, et al. Updated 24-year trend of Type 1 diabetes incidence in children in Poland reveals a sinusoidal pattern and sustained increase. *Diabet Med*. 2017;34(9):1252-8.
4. Diaz-Valencia PA, Bougneres P, Valleron AJ. Global epidemiology of type 1 diabetes in young adults and adults: a systematic review. *BMC Public Health*. 2015;15:255.
5. Rawshani A, Landin-Olsson M, Svensson AM, Nystrom L, Arnqvist HJ, Bolinder J, et al. The incidence of diabetes among 0-34 year olds in Sweden: new data and better methods. *Diabetologia*. 2014;57(7):1375-81.
6. Thomas NJ, Jones SE, Weedon MN, Shields BM, Oram RA, Hattersley AT. Frequency and phenotype of type 1 diabetes in the first six decades of life: a cross-sectional, genetically stratified survival analysis from UK Biobank. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2018;6(2):122-9.
7. Zhang R, Cai XL, Liu L, Han XY, Ji LN. Type 1 diabetes induced by immune checkpoint inhibitors. *Chin Med J (Engl)*. 2020;133(21):2595-8.
8. Cooper JD, Howson JM, Smyth D, Walker NM, Stevens H, Yang JH, et al. Confirmation of novel type 1 diabetes risk loci in families. *Diabetologia*. 2012;55(4):996-1000.
9. Redondo MJ, Jeffrey J, Fain PR, Eisenbarth GS, Orban T. Concordance for islet autoimmunity among monozygotic twins. *N Engl J Med*. 2008;359(26):2849-50.
10. Redondo MJ, Geyer S, Steck AK, Sharp S, Wentworth JM, Weedon MN, et al. A Type 1 Diabetes Genetic Risk Score Predicts Progression of Islet Autoimmunity and Development of Type 1 Diabetes in Individuals at Risk. *Diabetes Care*. 2018;41(9):1887-94.
11. Erlich HA, Valdes AM, McDevitt SL, Simen BB, Blake LA, McGowan KR, et al. Next generation sequencing reveals the association of DRB3*02:02 with type 1 diabetes. *Diabetes*. 2013;62(7):2618-22.
12. Krischer JP, Lynch KF, Schatz DA, Ilonen J, Lernmark A, Hagopian WA, et al. The 6 year incidence of diabetes-associated autoantibodies in genetically at-risk children: the TEDDY study. *Diabetologia*. 2015;58(5):980-7.
13. Polychronakos C, Li Q. Understanding type 1 diabetes through genetics: advances and prospects. *Nat Rev Genet*. 2011;12(11):781-92.
14. Hayter SM, Cook MC. Updated assessment of the prevalence, spectrum and case definition of autoimmune disease. *Autoimmun Rev*. 2012;11(10):754-65.
15. Hyoty H. Viruses in type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes*. 2016;17 Suppl 22:56-64.
16. Knip M, Virtanen SM, Akerblom HK. Infant feeding and the risk of type 1 diabetes. *Am J Clin Nutr*. 2010;91(5):1506s-13s.
17. Rešić Lindehammer S, Honkanen H, Nix WA, Oikarinen M, Lynch KF, Jönsson I, et al. Seroconversion to islet autoantibodies after enterovirus infection in early pregnancy. *Viral Immunol*. 2012;25(4):254-61.
18. Taplin CE, Barker JM. Autoantibodies in type 1 diabetes. *Autoimmunity*. 2008;41(1):11-8.
19. Savola K, Bonifacio E, Sabbah E, Kulmala P, Vähäsalo P, Karjalainen J, et al. IA-2 antibodies--a sensitive marker of IDDM with clinical onset in childhood and adolescence. Childhood Diabetes in Finland Study Group. *Diabetologia*. 1998;41(4):424-9.
20. Ziegler AG, Rewers M, Simell O, Simell T, Lempainen J, Steck A, et al. Seroconversion to multiple islet autoantibodies and risk of progression to diabetes in children. *Jama*. 2013;309(23):2473-9.

21. Mao RF, Chen YY, Zhang J, Chang X, Wang YF. Type 1 diabetes mellitus and its oral tolerance therapy. *World J Diabetes*. 2020;11(10):400-15.
22. Katsarou A, Gudbjörnsdóttir S, Rawshani A, Dabelea D, Bonifacio E, Anderson BJ, et al. Type 1 diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17016.
23. Oling V, Reijonen H, Simell O, Knip M, Ilonen J. Autoantigen-specific memory CD4+ T cells are prevalent early in progression to Type 1 diabetes. *Cell Immunol*. 2012;273(2):133-9.
24. McLaughlin RJ, Spindler MP, van Lummel M, Roep BO. Where, How, and When: Positioning Posttranslational Modification Within Type 1 Diabetes Pathogenesis. *Curr Diab Rep*. 2016;16(7):63.
25. Babon JA, DeNicola ME, Blodgett DM, Crèvecoeur I, Buttrick TS, Maehr R, et al. Analysis of self-antigen specificity of islet-infiltrating T cells from human donors with type 1 diabetes. *Nat Med*. 2016;22(12):1482-7.
26. Burrack AL, Martinov T, Fife BT. T Cell-Mediated Beta Cell Destruction: Autoimmunity and Alloimmunity in the Context of Type 1 Diabetes. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017;8:343.
27. Lampeter EF, McCann SR, Kolb H. Transfer of diabetes type 1 by bone-marrow transplantation. *Lancet*. 1998;351(9102):568-9.
28. Rodriguez-Calvo T, Richardson SJ, Pugliese A. Pancreas Pathology During the Natural History of Type 1 Diabetes. *Curr Diab Rep*. 2018;18(11):124.
29. 5. Glycemic Targets. *Diabetes Care*. 2016;39 Suppl 1:S39-46.
30. Rewers A, Klingensmith G, Davis C, Petitti DB, Pihoker C, Rodriguez B, et al. Presence of diabetic ketoacidosis at diagnosis of diabetes mellitus in youth: the Search for Diabetes in Youth Study. *Pediatrics*. 2008;121(5):e1258-66.
31. Nathan DM. The diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications study at 30 years: overview. *Diabetes Care*. 2014;37(1):9-16.
32. Skyler JS. Immune intervention for type 1 diabetes mellitus. *Int J Clin Pract Suppl*. 2011(170):61-70.
33. Cyclosporin-induced remission of IDDM after early intervention. Association of 1 yr of cyclosporin treatment with enhanced insulin secretion. The Canadian-European Randomized Control Trial Group. *Diabetes*. 1988;37(11):1574-82.
34. Herold KC, Hagopian W, Auger JA, Poumian-Ruiz E, Taylor L, Donaldson D, et al. Anti-CD3 monoclonal antibody in new-onset type 1 diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 2002;346(22):1692-8.
35. Pescovitz MD, Greenbaum CJ, Krause-Steinrauf H, Becker DJ, Gitelman SE, Goland R, et al. Rituximab, B-lymphocyte depletion, and preservation of beta-cell function. *N Engl J Med*. 2009;361(22):2143-52.
36. Atkinson MA, Roep BO, Posgai A, Wheeler DCS, Peakman M. The challenge of modulating β -cell autoimmunity in type 1 diabetes. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2019;7(1):52-64.
37. Campbell-Thompson M, Fu A, Kaddis JS, Wasserfall C, Schatz DA, Pugliese A, et al. Insulinitis and β -Cell Mass in the Natural History of Type 1 Diabetes. *Diabetes*. 2016;65(3):719-31.
38. Wasserfall C, Nick HS, Campbell-Thompson M, Beachy D, Haataja L, Kusmartseva I, et al. Persistence of Pancreatic Insulin mRNA Expression and Proinsulin Protein in Type 1 Diabetes Pancreata. *Cell Metab*. 2017;26(3):568-75.e3.
39. Bonifacio E, Ziegler AG, Klingensmith G, Schober E, Bingley PJ, Rottenkolber M, et al. 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):1541-9.
40. Rezende RM, Weiner HL. History and mechanisms of oral tolerance. *Semin Immunol*. 2017;30:3-11.
41. Knoop KA, Miller MJ, Newberry RD. Transepithelial antigen delivery in the small intestine: different paths, different outcomes. *Curr Opin Gastroenterol*. 2013;29(2):112-8.
42. Niess JH, Brand S, Gu X, Landsman L, Jung S, McCormick BA, et al. CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science*. 2005;307(5707):254-8.

43. Tordesillas L, Berin MC. Mechanisms of Oral Tolerance. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2018;55(2):107-17.
44. Krischer JP, Lynch KF, Schatz DA, Ilonen J, Lernmark Å, Hagopian WA, et al. The 6 year incidence of diabetes-associated autoantibodies in genetically at-risk children: the TEDDY study. *Diabetologia.* 2015;58(5):980-7.
45. Carel JC, Bougnères P, Vardi P. Suppression of diabetes in nonobese diabetic mice by oral administration of porcine insulin. *J Endocrinol Invest.* 1994;17(7):573-80.
46. Bresson D, Togher L, Rodrigo E, Chen Y, Bluestone JA, Herold KC, et al. Anti-CD3 and nasal proinsulin combination therapy enhances remission from recent-onset autoimmune diabetes by inducing Tregs. *J Clin Invest.* 2006;116(5):1371-81.
47. Raab J, Haupt F, Scholz M, Matzke C, Warncke K, Lange K, et al. Capillary blood islet autoantibody screening for identifying pre-type 1 diabetes in the general population: design and initial results of the Fr1da study. *BMJ Open.* 2016;6(5):e011144.
48. Wan X, Unanue ER. Unique features in the presentation of insulin epitopes in autoimmune diabetes: an update. *Curr Opin Immunol.* 2017;46:30-7.
49. Zhang ZJ, Davidson L, Eisenbarth G, Weiner HL. Suppression of diabetes in nonobese diabetic mice by oral administration of porcine insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(22):10252-6.
50. Pham MN, Gibson C, Rydén AK, Perdue N, Boursalian TE, Pagni PP, et al. Oral insulin (human, murine, or porcine) does not prevent diabetes in the non-obese diabetic mouse. *Clin Immunol.* 2016;164:28-33.
51. Pozzilli P, Pitocco D, Visalli N, Cavallo MG, Buzzetti R, Crinò A, et al. No effect of oral insulin on residual beta-cell function in recent-onset type 1 diabetes (the IMDIAB VII). *IMDIAB Group. Diabetologia.* 2000;43(8):1000-4.
52. Chaillous L, Lefèvre H, Thivolet C, Boitard C, Lahlou N, Atlan-Gepner C, et al. Oral insulin administration and residual beta-cell function in recent-onset type 1 diabetes: a multicentre randomised controlled trial. *Diabète Insuline Orale group. Lancet.* 2000;356(9229):545-9.
53. Pozzilli P, Gisella Cavallo M. Oral insulin and the induction of tolerance in man: reality or fantasy? *Diabetes Metab Res Rev.* 2000;16(5):306-7.
54. Skyler JS, Krischer JP, Wolfsdorf J, Cowie C, Palmer JP, Greenbaum C, et al. Effects of oral insulin in relatives of patients with type 1 diabetes: The Diabetes Prevention Trial--Type 1. *Diabetes Care.* 2005;28(5):1068-76.
55. Krischer JP, Schatz DA, Bundy B, Skyler JS, Greenbaum CJ. Effect of Oral Insulin on Prevention of Diabetes in Relatives of Patients With Type 1 Diabetes: A Randomized Clinical Trial. *Jama.* 2017;318(19):1891-902.
56. Makino S, Kunimoto K, Muraoka Y, Mizushima Y, Katagiri K, Tochino Y. Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Jikken Dobutsu.* 1980;29(1):1-13.
57. Racine JJ, Stewart I, Ratiu J, Christianson G, Lowell E, Helm K, et al. Improved Murine MHC-Deficient HLA Transgenic NOD Mouse Models for Type 1 Diabetes Therapy Development. *Diabetes.* 2018;67(5):923-35.
58. Xu H, Wang B, Ono M, Kagita A, Fujii K, Sasakawa N, et al. Targeted Disruption of HLA Genes via CRISPR-Cas9 Generates iPSCs with Enhanced Immune Compatibility. *Cell Stem Cell.* 2019;24(4):566-78.e7.
59. Mordes JP, Bortell R, Blankenhorn EP, Rossini AA, Greiner DL. Rat models of type 1 diabetes: genetics, environment, and autoimmunity. *Ilar j.* 2004;45(3):278-91.
60. Furman BL. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Curr Protoc Pharmacol.* 2015;70:5.47.1-5..20.
61. Nelson RW, Reusch CE. Animal models of disease: classification and etiology of diabetes in dogs and cats. *J Endocrinol.* 2014;222(3):T1-9.

62. Wong FS, Visintin I, Wen L, Flavell RA, Janeway CA, Jr. CD8 T cell clones from young nonobese diabetic (NOD) islets can transfer rapid onset of diabetes in NOD mice in the absence of CD4 cells. *J Exp Med.* 1996;183(1):67-76.
63. Serreze DV, Fleming SA, Chapman HD, Richard SD, Leiter EH, Tisch RM. B lymphocytes are critical antigen-presenting cells for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol.* 1998;161(8):3912-8.
64. Abiru N, Yu L, Miao D, Maniatis AK, Liu E, Moriyama H, et al. Transient insulin autoantibody expression independent of development of diabetes: comparison of NOD and NOR strains. *J Autoimmun.* 2001;17(1):1-6.
65. Bowman MA, Leiter EH, Atkinson MA. Prevention of diabetes in the NOD mouse: implications for therapeutic intervention in human disease. *Immunol Today.* 1994;15(3):115-20.
66. Tisch R, McDevitt H. Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell.* 1996;85(3):291-7.
67. Thébault-Baumont K, Dubois-Laforgue D, Krief P, Briand JP, Halbout P, Vallon-Geoffroy K, et al. Acceleration of type 1 diabetes mellitus in proinsulin 2-deficient NOD mice. *J Clin Invest.* 2003;111(6):851-7.
68. Elso CM, Scott NA, Mariana L, Masterman EI, Sutherland APR, Thomas HE, et al. Replacing murine insulin 1 with human insulin protects NOD mice from diabetes. *PLoS One.* 2019;14(12):e0225021.
69. Mao R, Chen Y, Wu Q, Zhang T, Diao E, Wu D, et al. Oral delivery of single-chain insulin (SCI-59) analog by bacterium-like particles (BLPs) induces oral tolerance and prevents autoimmune diabetes in NOD mice. *Immunol Lett.* 2019;214:37-44.
70. Shehadeh N, Weis R, Teninboum G, Benderly A, Etzioni A, Shamir R. The influence of oral insulin on the development of autoimmune diabetes in NOD mice fed a hypoallergenic diet. *Diabetes Nutr Metab.* 2004;17(1):1-5.
71. Peppia M, He C, Hattori M, McEvoy R, Zheng F, Vlassara H. Fetal or neonatal low-glycotoxin environment prevents autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes.* 2003;52(6):1441-8.
72. Brezar V, Culina S, Gagnerault MC, Mallone R. Short-term subcutaneous insulin treatment delays but does not prevent diabetes in NOD mice. *Eur J Immunol.* 2012;42(6):1553-61.
73. Atkinson MA, Maclaren NK, Luchetta R. Insulinitis and diabetes in NOD mice reduced by prophylactic insulin therapy. *Diabetes.* 1990;39(8):933-7.

7. STUDY OBJECTIVE(S)

7.1. Primary objectives

- To investigate the tolerability of repeated ascending doses of IMP administered per os.

7.2. Secondary objectives

- To investigate the safety of repeated ascending doses of IMP administered per os.
- To investigate the treatment effect on blood glucose, se-insulin and C-peptide

8. STUDY POPULATION

8.1. Sample size

24 eligible healthy male and female subjects will be enrolled into the study. (Drop-outs will be replaced.)

8.2. Selection of study population

There will be three subject populations defined for the study:

- The full analysis set is defined to be as close to the idea of including all randomized subjects (by intention-to-treat principle, ITT). Volunteers will be excluded from the full analysis set for the following reasons:
 - Failing to satisfy major entry criteria
 - Failing to take at least one dose of the study medication
 - Lack of any data post randomization
- The per-protocol (PP) population will include all randomized subjects who were included in the ITT and who completed the 3 treatment periods according to the protocol. Volunteers will be excluded from the PP set for the following reasons:
 - Failing to satisfy full analysis set criteria
 - Presence of a major protocol violation
 - Pharmacokinetic target parameters not available for any of the periods.
- The safety population will include all randomized subjects who received at least one dose of study medication.

8.3. Subject recruitment procedures

Subjects will be recruited according to the standard operating procedures of the study site.

Potential male and female volunteers will be screened for eligibility within 14 days of admission having given written informed consent. Screening will consist of demographic data, medical and medication histories, physical examination, body measurements (height, weight, BMI, body temperature), vital signs, 12 lead ECG, clinical laboratory safety tests (haematology, biochemistry, urinalysis, HBsAg, anti-HCV and HIV I & II, drugs of abuse and alcohol screen).

A person is considered healthy, if medical examination does not find any pathological signs and other screening test parameters stated in the Protocol are within the normal range and the volunteer does not mention any significant disease when taking the case history.

If, in the course of screening, some pathological values would be observed, these findings have to be regarded as an exclusion criterion. Any laboratory value outside the normal range could generally not be regarded as an exclusion criterion provided that:

- they were not accompanied by clinical symptoms, and
- the context of related laboratory values gave no indication of pathological process, and

- the Investigator classified them as clinically irrelevant in written form in the CRF.

Every deviation from the normal laboratory parameters should be explained in the Case Report Form. In case of enrolment the following short comment would be enough to be marked: "NCR" (no clinical relevance).

8.4. Subject inclusion criteria

Subjects enrolled in this study will be members of the community at large.

They must meet all of the following criteria in order to be included in the study:

- Adult males and females aged 18-45 years with body mass index between 18.5-30 kg/m²
- Healthy as determined by pre-study medical history, physical examination and 12 lead ECG.
- Have clinical laboratory tests within the reference ranges or clinically acceptable to the investigator.
- Are negative for hepatitis HbsAg, C antibody and HIV I and II tests at screening.
- Are negative for COVID PCR test at screening
- Are negative for drugs of abuse and alcohol tests at screening and admission.
- Able and willing to give written informed consent.

8.5. Subject exclusion criteria

Subjects to whom any of the following applies will be excluded from the study:

- A clinically relevant history or presence of respiratory, gastrointestinal, renal, hepatic, haematological, lymphatic, neurological, psychological, cardiovascular, psychiatric, musculoskeletal, genitourinary, immunological, dermatological, connective tissue diseases or disorders.
- Any medical disorder or previous surgery that might significantly interfere with absorption, metabolism, or excretion of the study medication.
- A history of relevant atopy or drug hypersensitivity to IMP or any of the ingredients.
- A history of alcohol or other drug abuse.
- Frequently consume more than 10 units of alcohol a week. (1 unit = 150 mL of wine or 360 mL of beer or 45 mL of alcohol 40%).
- A significant infection or known inflammatory process on screening.
- ECG abnormalities (clinically significant); or vital signs abnormalities (systolic blood pressure lower than 90 or over 140 mmHg, or diastolic blood pressure lower than 50 or over 90 mmHg, or heart rate less than 50 or over 100 bpm at screening after resting in supine position for 5 minutes).
- QTc is greater than 450 ms at screening.
- Acute gastrointestinal symptoms at the time of screening and/or admission (e.g. nausea, vomiting, diarrhoea, heartburn).
- An acute infection such as influenza at the time of screening and/or admission.
- Used prescription drugs or over the counter medication within 2 weeks of first dosing unless agreed by the investigator and the sponsor.
- Smoking more than 10 cigarettes per day.

- Excessive caffeine drinking (more than 3 cups a day).
- Used any investigational drug within 3 months or have participated in any other clinical trial within 3 months of their first admission to this study
- Donated and/or received any blood or blood products within the previous 3 months prior to screening.
- Vegans, or any food allergy, intolerance, restriction or special diet that, in the opinion of the investigator, contraindicates the subject's participation in this study.
- Caffeine, alcohol and grapefruit containing food and beverages are prohibited at 48 hours before dosing until after the last blood collection.
- Can not communicate reliably with the investigator.
- Unlikely to co-operate with the requirements of the study.
- Vulnerable subject.

8.6. Subject compliance

The study will be run in a hospital environment. Subject compliance will be maintained by the study team.

8.7. Subject withdrawal criteria

In accordance with the Declaration of Helsinki and the applicable regulatory requirements, the subject involved in the study can withdraw his consent at any time without giving any reason, and it should not be announced in written form. It is enough to inform the investigator about his decision orally.

Volunteers may be withdrawn for the following reason:

- at their own request with or without giving reasons,
- at the discretion of the Investigator for reason of medical prudence,
- at the proposal of the Sponsor.

The principal investigator or the institutional ethics committee should initiate the withdrawal in the following cases:

- If circumstances defined as exclusion criteria are registered.
- Onset of any disease demanding any medicinal treatment during the study period, which can influence the validation of the results, even if any relationship between the illness and the study treatment seems not to be likely.
- In cases of adverse events that are dangerous to the health of the subject.
- If the volunteer does not cooperate with the investigator, and does not comply with the regulations prescribed in Volunteers' Information Sheet.
- If personal circumstances suggest that the visits required by the protocol cannot be guaranteed any longer.
- In case of serious protocol deviation.

Each volunteer being withdrawn should undergo a complete final examination within one week after the withdrawal with regard to the volunteer's health conditions and for safety aspects.

In case of any withdrawal from the study (whether voluntary or not) the Sponsor should be immediately notified. The date and reason of withdrawal should be clearly stated in the volunteer's CRF.

The Sponsor should also be immediately consulted / notified in the following cases:

- Vomiting within $2 \times t_{\max}$ of the active ingredients (namely within 2 hours after drug administration).
- Protocol violations which are potentially serious, and thus being potential reasons to withdraw the volunteers from the trial.
- Concomitant medication or other events which can influence the authenticity of data collected throughout the study.
- Serious adverse events, whether expected or unexpected.

8.8. Replacement of Drop-outs

Subjects being withdrawn must be replaced. For details see Section 9.2.

8.9. Premature Termination of the Study

If the study sponsor or the Principal Investigator discovers conditions arising during the study which indicate that the clinical investigation should be stopped, the study can be terminated after appropriate consultation among the study sponsor and the Principal Investigator.

In addition, conditions which may warrant study termination include, but not limited to the following:

- Unexpected and significant or unacceptable risks for the subjects are revealed during the study.
- The sponsor's decision to suspend or discontinue the trial for administrative or other reason.

If a trial is prematurely terminated or suspended, the sponsor has to inform promptly the investigators, the authorities and the EC of the termination or suspension and the reason(s) for the termination or suspension.

If premature termination of the study is unavoidable, investigators must take measures to safeguard the interests of the included subjects.

Premature termination does not affect the documentation responsibilities of the investigator and the sponsor.

9. Study design

Single center, double-blind, placebo controlled, randomized design with dose-escalation.

Stopping rules

Dose escalation will be stopped when one of the following conditions applies:

- A serious adverse event (SAE), which, in the opinion of the Principal Investigator or Sponsor's medical representative, is likely to be causally related to drug (code break if necessary) and warrants discontinuation of dose-escalation on safety grounds.
- Unacceptable adverse events (AEs) in at least 2 of the subjects, whether serious or not, that, in the opinion of the Principal Investigator or Sponsor's medical representative, are likely to be causally related to drug (code break if necessary) e.g. clear evidence of severe hypoglycaemia.

9.1. Assignment to treatments and randomization procedures

Following admission to the study, subjects will be randomly assigned a treatment number. The treatment number will determine the treatment sequence.

Subjects who are replacing dropouts will be allocated the same treatment number prefixed with the number 1 e.g. if treatment number 008 is replaced then the replacement number will be 108. Replacement subjects will receive the same treatment allocation sequence as those whom they replace starting from the beginning of the study.

Randomization will be carried out by a modified latin square design, where each subject will be treated by 3 different doses of the IMP and once by placebo in a randomized order.

A paper copy of the allocation will be produced, quality controlled and retained by the Unit responsible for statistical analysis. Individual sealed subject codes with instructions for code breaking will be provided to the Principal Investigator.

9.2. Blinding

In the event of a medical emergency when management of a subject's condition requires knowledge of the trial medication, the sealed "code-break" envelope provided may be opened to determine the nature of the trial medication dispensed. If possible, such emergencies should be discussed with Sponsor's representative prior to disclosure of the treatment allocation.

Reasons for breaking a code must be clearly explained and justified in the CRF. The date on which the code was broken together with the identity of the person responsible must also be documented.

9.3. Protocol adherence

The protocol must be read thoroughly and the instructions followed exactly. Any intentional change should be agreed by both the Sponsor and the Investigator, with the appropriate written and approved protocol amendments made to reflect the changes agreed upon. Where the change occurs for the wellbeing of the subject, the Sponsor must be informed of the action.

9.4. Statistical analysis

9.4.1. Efficacy data analysis

Methods and details of the analysis of efficacy data will be detailed in a separate Statistical Analysis Plan.

9.4.2. Safety data analysis

Individual and summary blood pressures, heart rate, ECG parameters, and clinical laboratory data will be presented in tabular form with mean, median, standard deviation and range (min and max) as appropriate.

For the laboratory safety data, out of range values will be flagged in the data listings and a list of clinically significantly abnormal values will be presented.

Adverse events will be tabulated and summarised according to the current version of Medical Dictionary for Regulatory Activities (MedDRA).

10. STUDY MEDICATION, DOSAGES AND DURATION OF TREATMENT

10.1. Supply, packaging and labelling

The study medications will be produced and packaged by an appropriate GMP-compliant facility selected by the Sponsor.

Individual subject study medications will be packaged in bottles for each subject and each study period separately according to the randomization list.

Analytical certificates with the batch numbers will be attached to the study medications. Study medications should be released before transport to the clinical study site by a Qualified Person.

Labelling instructions (in Hungarian):

- Name, address of the sponsor;
- The batch and/or code number to identify the contents and packaging operation,
- Dosage and administration as detailed in Section 10.4
- Investigator's name, phone,
- Study code number,
- Expiry date,
- Storage conditions,
- "For clinical trial use only",
- Subject identification number,
- Name and formula of the study medication,
- Name and strength of the active ingredient,
- Study period number,

10.2. Storage, handling procedures, accountability

All study medication will be stored as stated in the Certificate of Analysis.

No special procedures for the safe handling of the medication are required.

The Investigator will dispense the study medication only to volunteers included in the study, by following the procedure set in this protocol. It is forbidden to use the study medication for any other purpose.

The sponsor will be permitted upon request to audit the supply storage and dispensing procedures and records.

All unused supplies of study medication will be returned to SPONSOR., at the end of the study. Copies of the study drug accountability record will be provided to the sponsor.

10.3. Detailed description of study medications

Name:	IMP capsule 10 NE
Formulation:	Capsule
Manufacturer:	TBD
Active ingredient:	Insulin humanum
Unit dose:	10 IU
Mode of administration:	Oral
Regimen:	See Section 10.4
Batch number:	See the Certificate of Analysis
Expiry date:	See the Certificate of Analysis
Storage conditions:	As stated in the Certificate of Analysis

Name:	IMP capsule 20 NE
Formulation:	Capsule
Manufacturer:	TBD
Active ingredient:	Insulin humanum
Unit dose:	20 IU
Mode of administration:	Oral
Regimen:	See Section 10.4
Batch number:	See the Certificate of Analysis
Expiry date:	See the Certificate of Analysis
Storage conditions:	As stated in the Certificate of Analysis

Name:	IMP capsule 30 NE
--------------	-------------------

Formulation: Capsule
Manufacturer: TBD
Active ingredient: Insulin humanum
Unit dose: 30 IU
Mode of administration: Oral
Regimen: See Section 10.4
Batch number: See the Certificate of Analysis
Expiry date: See the Certificate of Analysis
Storage conditions: As stated in the Certificate of Analysis

Name: Placebo capsule
Formulation: Capsule
Manufacturer: TBD
Active ingredient: No active ingredient
Unit dose: N/A
Mode of administration: Oral
Regimen: See Section 10.4
Batch number: See the Certificate of Analysis
Expiry date: See the Certificate of Analysis
Storage conditions: As stated in the Certificate of Analysis

10.4. Dosage and administration

In each period, study medication will be administered to each subject in a fed state with approximately 200 mL water, which will be followed by a hand and mouth check. Administration of the medications will only be performed by authorized members of the clinical research staff in the following manner:

10.5. Duration of treatment

There are 4 treatment periods. After each period an interval of at least 7 days will be inserted.

10.6. Selection of doses and duration of treatment

There will be 3 active doses in the study:

- 10 IU oral insulin capsule preparation once daily
- 20 IU oral insulin capsule preparation once daily
- 30 IU oral insulin capsule preparation once daily

The active doses will be administered for 3 consecutive days. The next dose level can be started when the lower dose level is completed. In the 4th treatment cycle all subjects will be given placebo capsules. The placebo cycle will be randomly positioned among the active treatment cycles for each volunteer by a pre-arranged order.

10.7. Concomitant therapy

In the interests of subject safety and acceptable standards of medical care the Investigator will be permitted to prescribe treatment(s) at his/her discretion which must be recorded on the subjects Case Report Form. Volunteers will not be permitted to take any other medication unless prescribed by the Investigator.

11. STUDY PROCEDURES

Prior to participation in the trial, each volunteer should give his/her consent to participate by signing and dating the informed consent form. The investigator should not undertake any investigations specifically required only for the clinical study until valid consent had been obtained.

The screening examination will be carried out not more than 3 weeks prior to the study drug administration.

Volunteers will be interrogated with respect to inclusion and exclusion criteria. Those who seem to be suitable will be included.

Subjects will attend the unit not later than 8 p.m. on the evening before the treatment (this is the hospitalization day in all treatment periods, day -1 in the flow chart) and will remain there for 24±1 hours after the dosing in each study period. The investigator will check on each volunteer well-being prior to their discharge from clinic. If necessary, some volunteers will remain at the clinic until any adverse events have resolved.

The second, third and fourth period will be conducted according to the same procedure after a wash-out period of at least 7 days.

All volunteers will return to the clinic 4-10 days after the 4th study period for a post-study examination.

For each volunteer being withdrawn from the study due to any reason, a complete final examination has to be performed within one week after the withdrawal with regard to the volunteer's safety.

11.1. Screening

Within three weeks prior to beginning of the study:

- Signature of Informed Consent Form.
- Demography data (age, race), body weight and height, BMI.
- Medical history.
- Physical examination (including measurements of blood pressure and heart rate after 5 minutes supine rest, and body temperature), standard 12 lead ECG.
- Laboratory tests (after 10 hours fasting): haematology, blood chemistry and urinalysis.
- Urine drug screen.
- Alcohol breath test.
- Viral serology (HBsAg, Anti HCV, HIV 1+2, COVID PCR).

All laboratory tests will be carried out in the local laboratory of clinical study site.

If in the course of screening any clearly pathological value is observed, this finding will be regarded as an exclusion criterion. Single laboratory values outside the normal range will generally not be regarded as an exclusion criterion provided that:

- they are not accompanied by clinical symptoms,
- the context of related laboratory values gives no indication of a pathological process,
- the investigator regards them as clinically irrelevant.

11.2. Study procedure in each treatment period

Hospitalisation of subjects

Before dosing days subjects will be required to attend the Unit on the evening preceding dose administration not later than 8 p.m. Subjects will be allowed to read, write and watch television, etc. during the hospitalisation. Excessive effort or physical activity is not allowed for volunteers. Meals are provided within the Unit, and it is prohibited to consume any other meals or drink. Subjects will be allowed to leave the clinic after the blood sampling 24±1 hours after IMP dosing.

Daily activities during the trial

All 4 treatment periods will be carried out the same way.

Days -1: This day is the day before administration of study medication and has to be not later than 3 weeks after screening procedure or 7 days following the previous treatment period. Volunteers will have to report to the clinic not later than 8 p.m. on the day before dosing. Following medical procedures will be performed:

- Medical history update, short interview for presence of exclusion criteria.
- Physical examination update (including measuring of body temperature).
- Questioning for and registration of adverse events.
- Urine drug abuse test.
- Alcohol breath test.

Afterwards the volunteers will receive an evening meal not later than 8:45 p.m.

Days 1: Following procedures will be carried out or checked in case of all volunteers:

- Short interview for possible presence of exclusion criteria.
- Temperature before dosing.
- Blood pressure, pulse rate before dosing and 1, 2 and 4 hours post dose
- ECG before dosing and 5 hours post-dose
- Blood sampling for routine lab assessments before dosing
- Blood sampling for blood glucose, Se insulin, C-peptide before dosing and 30', 60', 90', 120', 180' and 240' post-dose
- Treatment: randomized administration according to the randomization table of the study medication with mouth check. Subjects will take the medication in upright position and will remain upright for 1 minute after dosing.
- Standard meal before dosing, 4 ± 0.5 h after morning dose (lunch), 12 ± 0.5 h after morning dose (dinner).
- Questioning for and registration of adverse events.

Days 2: Following procedures will be carried out:

- Short interview for possible presence of exclusion criteria.
- Temperature before discharge.
- Blood pressure, pulse rate before discharge
- ECG before discharge
- Blood sampling for routine lab assessments before discharge
- Standard morning meal will be offered before subjects leave the Unit

Wash-out periods:

Wash-out period of at least 7 days follows after the first, second and third period; with registration of adverse events.

11.3. Post-Study Procedure

After 4-10 days after the fourth treatment period.

- Questioning for and registration of adverse events.
- Medical history update (focusing to any changes since the screening examination and the last drug administration).
- Physical examination update (including blood pressure and heart rate after 5 minutes supine rest, ECG and body temperature measuring).
- Laboratory tests: haematology, blood chemistry and urinalysis (after 10 hours of fasting condition).

Clinically relevant deviations of laboratory parameters should be regarded as adverse events. Laboratory values outside the normal range repeatedly found as while screening, unaccompanied by symptoms and giving no indication of any pathological process, and therefore judged as clinically non-significant by the Principal Investigator will not be recorded as adverse events.

11.4. Safety assessments

Complete medical history will be obtained at screening and will include evaluation for past or present cardiovascular, respiratory, gastrointestinal, renal, hepatic, neurological, endocrine, lymphatic, haematologic, immunologic, dermatologic, psychiatric, genitourinary, drug, and surgical history or any other diseases or disorders. A medical history update will be obtained on each admission (Day-1).

At screening, at Day -1 and at follow-up physical examinations will be performed by a physician and will include body measurements (weight, height, BMI only at screening) and examination of the following: general appearance, head, ears, eyes, nose, throat, neck, skin, cardiovascular system, respiratory system, abdominal system, nervous system.

All adverse events will be monitored and recorded throughout the whole study period. The Investigator and study personnel will provide close monitoring for possible signs of significant hypoglycaemia for the first 4 hours post-dose in each treatment period.

12-lead ECGs (with measurement RR, PQ, QRS, QT and QTc), blood pressure (supine systolic and diastolic) and heart rate and body temperature will be monitored at screening, during the study periods as described in Section 11.2 and at follow up.

Blood will be sampled for full blood counts and biochemistry at screening, before and 24 h after dosing in each treatment period again at follow-up. Routine urinalysis will be performed at the same time-points.

Blood sampling for blood glucose, Se insulin, C-peptide will be carried out before dosing and 30', 60', 90', 120', 180' and 240' post-dose in each treatment period.

11.5. Study Restrictions

- Subjects will be required to attend the Unit for screening and follow up visits and will be admitted to the Unit for 4 study periods.
- For each treatment periods subjects will be admitted to the Unit in the afternoon/evening of Day -1, approximately 11 hours prior to receiving the dose of trial medication.
- During each treatment period subjects will receive a standard diet as described above.
- Caffeine, alcohol and grapefruit containing food and beverages will be prohibited 48 hours prior the dosing and for Days 1 and 2 in each study period.
- For 7 days before the first dosing occasion and for the duration of the study, subjects will be required to abstain from rigorous exercise.

12. Determination of Safety

12.1. Definition

Adverse event (AE): any untoward medical occurrence in a patient or clinical trial subject administered a medicinal product and which does not necessarily have a causal relationship with this treatment.

Adverse reaction of an investigational medicinal product (AR): all untoward and unintended responses to an investigational medicinal product related to any dose administered.

Serious adverse event or adverse reaction (SAE, SAR): any untoward medical occurrence or effect that at any dose results in death, is life-threatening, requires hospitalisation or prolongation of existing hospitalisation, results in persistent or significant disability or incapacity, or is a congenital anomaly or birth defect. Additionally, based upon appropriate medical judgement, the adverse event can be regarded as serious if it may jeopardize the subject and may require medical or surgical intervention to prevent one of the other outcomes listed in the definition of serious.

Suspected Unexpected Serious Adverse Reaction (SUSAR): a serious adverse event judged by either the investigator or the sponsor as having reasonable causal relationship to the investigational medicinal product, with the nature or severity of which is not consistent with the investigators brochure. They are subject to expedited reporting.

12.2. Documentation and Reporting of adverse events

Reporting requirements from a clinical trial are described in 35/2005. Hungarian Ministerial decree and the 20/2001 EU Clinical Trial Directive.

12.2.1. Reporting procedure

12.2.1.1. The Investigator is responsible for:

Independently from the time of the next visit in case of adverse event the subject can revisit the investigator.

The starting point for the collection of AEs will be the time the volunteer signs the Informed Consent. All adverse events must be entered into the Case Report Form (CRF), whether or not they are considered to be drug-related. Signs and symptoms of each AE should be described in detail in the AE report form.

The investigator shall report any serious adverse events immediately (within 24 hours of the investigator's awareness) to the sponsor's representative and the Local Ethics Committee (IKEB). The immediate report shall be followed by detailed, written reports. The immediate and follow-up reports shall identify subjects by unique code numbers assigned to the latter. For reported deaths of a subject, the investigator shall supply the sponsor and the Ethics Committee with any additional information requested.

The Investigator will be requested to complete a separate SAE (Serious Adverse Event) Report Form form in addition to the information on the CRF.

In the event of unexplained or unexpected laboratory values abnormalities encountered during or after the study, the tests have to be repeated as soon as possible and followed up until the results turn to normal range and/or adequate explanation for abnormality is found.

Adverse events which are related or possibly related to the Investigational Medicinal Product(s) should be followed until recovery or a trend towards recovery becomes evident. All specialized medical interventions needed in case of such adverse events should be documented.

The investigator will clearly mark in the Case Report Form all laboratory findings outside the normal range and will indicate which of these deviations are clinically significant.

Only clinically significant laboratory findings should be recorded on the AE Registration Form.

12.2.1.2. The Sponsor is responsible for:

Serious adverse events

The sponsor shall report any serious, unexpected, suspected adverse reactions (SUSAR) to the competent authority (OGYÉI) and the Central Ethics Committee (ETT KFEB).

The sponsor ensures that all relevant information about suspected serious unexpected adverse reactions (SUSAR) that are fatal or life-threatening is reported to the OGYÉI and to the ETT KFEB, as soon as possible but no later than seven days after knowledge by the sponsor of such a case, and that relevant follow-up information is subsequently communicated within an additional eight days.

All other suspected serious unexpected adverse reactions shall be reported to the OGYÉI and to the ETT KFEB as soon as possible but within a maximum of fifteen days of first knowledge by the sponsor.

Once a year throughout the clinical trial, the sponsor shall provide OGYÉI and ETT KFEB with a listing of all suspected serious adverse reactions which have occurred over this period and a report of the subjects' safety.

The sponsor will keep detailed records about all serious adverse events reported by the Investigators at any time during the whole clinical period of the study. All records are to be submitted on request of the competent authority.

Non-serious adverse events

Non-serious adverse events will be recorded in the CRF and will be entered into clinical database after closing the clinical phase of the study.

The following table shows the reporting responsibility of the **Investigators**.

What	Reporting to	Timelines	Means
Serious adverse event /reaction (SAE / SAR)	<ul style="list-style-type: none"> ○ Sponsor ○ Local Ethics Committee 	Within 24 hours	Phone , fax, e-mail (following by a written confirmation on SAE report form)
Non-serious AE / AR	<ul style="list-style-type: none"> ○ Sponsor 	On the occasion of monitor visit	Detection in CRF

The following table shows the reporting responsibility of the **Sponsor**.

What	Reporting to	Timelines	Means
Serious suspected and unexpected adverse reaction (SUSAR) resulting in death or being life-threatening	<ul style="list-style-type: none"> ○ OGYÉI ○ ETT KFEB 	Within 7 calendar days Follow up report within 8 calendar day after 1 st report.	Fax or e-mail SAE form, to EMEA electronically.
Serious suspected and unexpected adverse reaction (SUSAR) which are not resulting	<ul style="list-style-type: none"> ○ OGYÉI ○ ETT KFEB 	Within 15 calendar days	Fax or e-mail SAE form, to EMEA electronically.

in death or being life-threatening.			
All serious suspected adverse reactions	<ul style="list-style-type: none"> ○ OGYÉI ○ ETT KFEB 	Once a year, or according to the authority's request	Written form in Line listing
Non-serious AE / AR	<ul style="list-style-type: none"> ○ OGYÉI 	At the end of the study	Final Report

12.2.2.

Documentation of adverse events

AE report form:

1. Date of AE reporting
2. Type of report:
 - Initial
 - Follow up
3. Verbatim of the event
4. Description of event,
5. Severity:
 - Mild: It does not affect the daily activity of the subject.
 - Moderate: Interfere with the daily activity of the subject.
 - Severe: Severely interfere with the daily activity of the subject or there is a need of complex treatment or hospitalization.
6. Onset time and date of AE,
7. Outcome:
 - Recovered without sequelae
 - Recovered with sequelae
 - Ongoing
 - Lost for follow up
 - Death
8. Offset time and date of AE,
9. Last date of administration of investigational product,
10. Dates of treatment
11. Criteria of seriousness:
 - Death
 - Life threatening
 - Involved or prolonged subject hospitalisation
 - Involved persistence of significant disability or incapacity
 - Congenital anomaly
 - Medically important
12. Seriousness:
 - Serious
 - Non serious
13. Relationship to investigational product:
 - Related: Reasonable temporal relation to study medication administration, AND cannot be reasonably explained by other factors (such as the subject's clinical state, concomitant therapy, and/or other interventions).
 - Possibly related: Relationship to study medication could not be ruled out.
 - Not related: Data are available to identify a clear alternative cause for the reaction.
14. Action taken to the investigational product:

- there is no need to stop administration
- there is a need to stop administration
- protocol specific (tapering, reduction...)

15. Action taken due to AE:

- 1 = None
- 2 = Medication
- 3 = Intervention
- 4 = Medication and intervention

16. Need to follow-up:

- no
- yes

17. Comments

The criteria of seriousness are listed above (see section “Definition”). Additionally, based upon appropriate medical judgement, the adverse event can be regarded as serious if it may jeopardize the subject and may require medical or surgical intervention to prevent one of the other outcomes listed in the definition of serious.

Adverse events which are definitely or possibly related to the investigational medicinal product(s) should be followed until recovery or a trend towards recovery becomes evident. All specialized medical interventions needed in case of such adverse events should be documented.

12.3. Validation, evaluation of adverse event reports

Validation and evaluation of adverse event reports are pursued according to regulations and standard operating procedures of the sponsor.

12.4. Coding dictionary

Medical Dictionary for Regulatory Activities (MedDRA) will be used as coding dictionary. Serious AE(s) / AR(s) will be coded as soon as they will be recorded in safety database by sponsor. Non-serious AE(s) /AR(s) will be coded after ending the clinical phase of the study.

12.5. Analysis of safety data

Safety data from the clinical trial will be regularly overviewed by the sponsor during the clinical phase of the study.

All subjects who received at least one dose of study medication will be included in the final safety data analysis (including those who did not complete the study).

12.6. Emergency Procedures

Emergency equipment and drugs should be available within the clinical unit. In that case if emergency treatment would be necessary, the treatment, and the drugs used during the emergency should be documented.

12.7. Clinical laboratory tests

All clinical laboratory (safety) tests will be performed at the lab of study site. Sample volumes and sampling conditions are according to the local lab requirements. Details of reference ranges are provided in the Trial Master File. Any clinically relevant deviation of laboratory parameters should be regarded as adverse events and should be handled accordingly.

13. Quality Control and Quality Assurance

13.1. *Monitoring*

The purposes of trial monitoring are to verify the following:

- The rights and well-being of human subjects are protected.
- The reported trial data are accurate, complete and verifiable from source documents.
- The conduct of the trial is in compliance with the currently approved protocol/amendments, with GCP, and with the applicable regulatory requirements.

The Sponsor should ensure that the trial be adequately monitored. The Sponsor should determine the appropriate extent and nature of monitoring. Sponsor has to be informed about the state of the trial. Representatives of Sponsor may conduct visits also at suitable intervals throughout the trial.

It is the responsibility of the Investigator to assure that the study will be conducted in accordance with the protocol and the valid data are entered into the CRF. The Investigator will permit the representatives of the Sponsor to monitor the study as frequently as necessary to determine that data recording and protocol adherence are satisfactory. The CRFs and related documents will be reviewed in detail in accordance with Good Clinical Practice regulations.

The monitor in accordance with the Sponsor's requirements should ensure that the trial is conducted and documented properly by carrying out the following activities, when relevant and necessary:

- Verifying that the investigator has adequate qualification and resource and remain adequate throughout the trial period.
- Verifying if the study is conducted properly and complied with the Good Clinical Practice guidelines, the Helsinki Declaration and the applicable regulatory requirements.
- Verifying the compliance with the protocol
- Verifying if the CRFs are completed continuously and accurately and stored in accordance with the requirements.
- Verifying the registration of the investigational drug.
- Verifying the signed Informed Consent.
- Checking the source data with the data in the CRF.
- Verifying if the necessary documents are available.
- Verifying if the works described in protocol are accurately done.
- Inform the principal investigator and Sponsor about the perceptions.

13.2. *Auditing*

The purpose of Sponsor's audit, which is independent of and separate from routine monitoring or quality control functions, should be to evaluate trial conduct and compliance with the protocol, SOPs, GCP and applicable regulatory requirements.

14. REGULATORY AND ETHICAL ISSUES

14.1. *Declaration of Helsinki*

The study should be performed in accordance with the spirit and principles of the current revision of the Declaration of Helsinki (Fortaleza, Brazil, 2013).

14.2. *Ethics Committee and Regulatory Authorities*

Before the start of the study, the protocol and other appropriate documents must be submitted to the Medical Research Council Ethics Committee for Clinical Pharmacology (ETT-KFEB), as Independent

Ethics Committee and the National Institute of Pharmacy (OGYÉI) as Regulatory Authority, for review and approval.

The trial should be conducted in compliance with the protocol.

If significant changes require a protocol amendment, the amendment has to be also submitted to the Regulatory Authority and Ethics Committee for review and approval. Non-significant changes that do not affect the conduct of the study or do not have a significant effect on the safety of the subjects or do not significantly reduce the scientific value of the trial, have to be submitted to the Ethics Committee and the Regulatory Authority for notification only.

It is the Principal Investigator's responsibility to get the approval of the leader of the institute. The leader of the institute declares that the investigational site is in possession of personal and material conditions for the study. The Principal Investigator informs the Local Ethics Committee about the study.

14.3. Information for Volunteers and Informed Consent

Before the subject being admitted to the trial, she/he has consent to participate in the study, after that he has been given written and verbal information about the clinical study. These information forms, both the written and verbal should be clear to all. Neither the written, nor the verbal information should contain technical terms, and any formulation that causes the volunteer to waive or to appear to waive any legal rights or that releases or appears to release the investigators, institute, the Sponsor or their agents from liability for negligence.

Information Sheets and Informed Consent can be used to confirm the volunteers' consents to participate in the trial. After the subject have read the Information Sheet and got oral information about the trial, they confirm their participation in the study by signing and dating the Informed Consent. The Investigator has to sign and date the Information for Volunteers and the Informed Consent too. By signing and dating the Case Report Form the Investigator states that the Informed Consent has been obtained. The original signed and dated Consent Forms will be kept and archived by the Principal Investigator. All subjects will receive both the signed Informed Consent Form and the Volunteers Information Sheet.

To ensure the medical confidentiality and data protection the signed Informed Consent Forms remain with the Principal Investigator and must be archived in accordance with the current legislation after the study has been completed. The Investigator who is responsible for archiving of the Informed Consent Forms will allow inspection of these documents by the competent authority, the ethics committee and the sponsor's representatives.

14.4. Confidentiality

Volunteers' identity data (name, date, and place of birth) should be handled strictly confidential. The Principal Investigator is responsible for preserve the identity data in Subject Identification Forms and takes care of that the data will not be available to any unauthorized person. Each subject gets a randomization number. For further protection of the identity data, only the volunteers' initials and randomization numbers will appear on the Case Report Form (data sheet).

Laboratory findings and other source documents made at the investigational site will contain the full name of the subjects; these should be reached only by the investigator staff, the monitor and auditor on behalf of Sponsor, the inspector of the Regulatory Authorities and the ethics committee.

Other person can gain access to only the data written in the CRFs or originated form these documents. Rules related to the handling of the identity data are stated in the Volunteers Information Sheet too.

15. DATA MANAGEMENT

15.1. *Investigator's File*

Investigator's File will be set up according to the latest guideline (ICH Topic E6 Note for Guidance on Good Clinical Practice CPMP/ICH/135/95).

15.2. *Case Report Forms*

These forms are used to transmit the information collected during the clinical trial to the Sponsor. Case Report Forms must be completed for each subject enrolled in this study. All Case Report Form must be legible and completed in black or blue ball point pen. The Investigators may enter corrections on original CRFs. Data should not be obliterated by blacking out, correction fluid or an eraser.

The examination findings should be written into the Case Report Form as soon as possible, at least on the day of the examination or on that day, when the investigator receives the findings. At all times the investigator has final responsibility for the accuracy and authenticity of all clinical and laboratory data entered in the CRFs.

The Principal Investigator has to review the Case Report Form for completeness and accuracy and has to sign and date it on the first page at the end of the study. Selected pages should be signed by an investigator after filling in. These signatures serve to attest that data contained on the CRFs are true and have not been falsified.

The monitor and auditor will review the complete Case Report Forms against the volunteers' medical records and verify that all data are complete and accurate.

Major corrections have to be justified.

Assurance of the completion, review and approval of all CRFs is the investigator's responsibility.

15.3. *Archiving*

The Screening LOG, the Subject Identification LOG, all Information for Volunteers, Informed Consents, source documents (laboratory findings, case history), and copies of the CRFs, whether these CRFs are completed or not, should be archived in accordance with the current legislation at the investigational site.

The Sponsor archives all other documents (except Informed Consent Forms, and source documents) related to the study in accordance with the requirements of GCP guidelines and applicable regulatory requirements.

Any transfer of responsibilities for archiving should be documented.

15.4. *Disclosure of information*

Information concerning the study, patent applications, processes, scientific data or other pertinent information is confidential and remains the property of the sponsor. The investigator may use this information for the purposes of the study only.

It is understood by the investigator that the sponsor will use information developed in this clinical study in connection with the development of IMP, and therefore may disclose it as required to other clinical investigators and to regulatory agencies. In order to allow the use of the information derived from this clinical study, the investigator understands that he/she has an obligation to provide complete test results and all data developed during this study to the sponsor.

Verbal or written discussion of results prior to study completion and full reporting should only be undertaken with written consent from the sponsor.

16. Protocol Amendments and deviations

Anytime after the approval of the protocol (before, during, and after the start of the study) any amendment turns out to be necessary it should be done in written form by the completion of the form "Amendment of Approved Protocol".

If significant changes require a protocol amendment, the amendment has to be submitted to the Regulatory Authority for approval. Except for shifts regarding the quality of the investigational medicinal products and changes of administrative nature, the Regulatory Authority also should transmit the planned protocol amendments to the CEC for review and approval.

Minor changes, that do not affect the conduct of the study or do not have a significant effect on the safety of the subject's, do not imply changes of the Volunteer Information Leaflet, or do not significantly reduce the scientific value of the trial, do not need a re-submit to the Regulatory Authority for approval. These amendments will be sent to the Regulatory Authority only for information.

The approved amendment should be sent to everybody, who signed the original protocol; and they have to enclose it to the original protocol.

The Investigator should not implement any deviation from or changes of the protocol without agreement by the Sponsor and prior review and documented approval of the CEC and/or Regulatory Authority, except when necessary to eliminate an immediate hazard to trial subjects or when the changes involve only logistical or administrative aspects (e.g. changes of addresses).

Any deviation from the approved protocol should be regarded as protocol deviation. Any deviation will be recorded in the raw data of the study and covered in the final report.

As soon as possible, the implemented deviation or change, the reason for it and if appropriate, the proposed protocol amendment should be submitted to the

- Ethics Committee
- Sponsor for agreement and approval
- Competent Authorities.

17. Financial Aspects

Agreement on the amount and the methods of payment will be stated in a separate document signed and dated by the Sponsor and the study site.

The study is financed from Government grant No. TBD

18. Insurance

Volunteers participating in the study will be duly insured for any study-related health deterioration for which the Sponsor is held legally liable.

The Sponsor will submit a copy of the certificate of insurance for the Trial Master File and the Investigator Site File of the study. This insurance, however, will be waived if the health deterioration is probably connected with the non-compliance of the volunteer or the professional misconduct of the study site personnel.

The subjects participating in the study can report their claim of damages in written form, directly to the Insurance Company mentioned above, or to the Principal Investigator, or to the Sponsor as soon as possible, but not later than 7 days after notice.

19. Clinical study report

The integrated study report will be prepared by Sponsor according to CPMP/ICH/137/95 (ICH Topic E 3) Structure and Content of Clinical Study Report. This report should include the results of efficacy and safety statistical reports.

20. Publication Policy

By signing this protocol the Principal Investigator agrees that the results of this study may be used for submission to national and/or international registration and supervisor authorities.

Inasmuch the principal investigator wants to write publication about the study, the manuscript of this publication should be handed over the Sponsor for approval. In this way the Sponsor can state whether the publication does or does not infringe patent or trade secret brake.

If the Sponsor initiates the publication or the expose of study results, he/she should notify the Principal Investigator and consider his/her professional opinion.

21. GENERAL REFERENCES

1. Declaration of Helsinki Adopted by the 18th WMA General Assembly, Helsinki, Finland, June 1964 and amended by the: 29th WMA General Assembly, Tokyo, Japan, October 1975, 35th WMA General Assembly, Venice, Italy, October 1983, 41st WMA General Assembly, Hong Kong, September 1989, 48th WMA General Assembly, Somerset West, Republic of South Africa, October 1996, 52nd WMA General Assembly, Edinburgh, Scotland, October 2000, 53rd WMA General Assembly, Washington DC, USA, October 2002 (Note of Clarification added), 55th WMA General Assembly, Tokyo, Japan, October 2004 (Note of Clarification added), 59th WMA General Assembly, Seoul, Republic of Korea, October 2008 and 64th WMA General Assembly, Fortaleza, Brazil, October 2013
2. ICH Topic E6R2. Guideline for Good Clinical Practice.
https://database.ich.org/sites/default/files/E6_R2_Addendum.pdf
3. 1997. évi XLVII tv. Az egészségügyről és a hozzájuk kapcsolódó személyes adatok kezeléséről és védelméről
4. 1997. évi CLIV. tv. Az egészségügyről
5. 35/2005 EüM rendelet Az emberi felhasználásra kerülő vizsgálati készítmények klinikai vizsgálatáról és a helyes klinikai gyakorlat alkalmazásáról
6. 2005. évi XCV. törvény Az emberi alkalmazásra kerülő gyógyszerekről és egyéb, a gyógyszerpiacot szabályozó törvények módosításáról

7. 235/2009. (X. 20.) Korm. rendelet az emberen végzett orvostudományi kutatások, az emberi felhasználásra kerülő vizsgálati készítmények klinikai vizsgálata, valamint az emberen történő alkalmazásra szolgáló, klinikai vizsgálatra szánt orvostechnikai eszközök klinikai vizsgálata engedélyezési eljárásának szabályairól
8. AZ EURÓPAI PARLAMENT ÉS A TANÁCS 2001/20/EK IRÁNYELVE az emberi felhasználásra szánt gyógyszerekkel végzett klinikai vizsgálatok során alkalmazandó helyes klinikai gyakorlat bevezetésére vonatkozó tagállami törvényi, rendeleti és közigazgatási rendelkezések közelítéséről
9. AZ EURÓPAI PARLAMENT ÉS A TANÁCS 536/2014/EU RENDELETE emberi felhasználásra szánt gyógyszerek klinikai vizsgálatairól és a 2001/20/EK irányelv hatályon kívül helyezéséről
10. ICH Topic E3 Structure And Content Of Clinical Study Reports
https://database.ich.org/sites/default/files/E3_Guideline.pdf



Orális inzulin vakcina fejlesztése az I-es típusú diabétesz kialakulásának megelőzésére gyermekekben

Fázis II klinikai vizsgálati protokoll tervezet- felnőtt

Debreceni Egyetem

GINOP-2.3.4-15-2016-00002

UNIVERSITY OF DEBRECEN

Trial Protocol

Protocol No: TBD
EudraCT Number: TBD
Phase: phase 2

Phase 2, double-blind, parallel assignment, randomized, placebo-controlled study to evaluate the preventive effect of oral insulin formula on the development of T1D in high-risk young individuals through the induction of immunological tolerance

This clinical trial protocol belongs to the University of Debrecen. The protocol is confidential and it can be applied in connection with this trial only. Application and reproduction of any part of this protocol anywhere is not allowed without written contribution of SPONSOR. Informing anybody, who is not involved in this trial, about the content of this protocol, is not allowed.

Sponsor: University of Debrecen
Address: H-4032 Debrecen, Egyetem tér 1., Hungary

Clinical Study Sites: 3-5 Departments of Diabetology in Hungary

Investigational medical products:
Oral insulin capsules
Matching placebo

State of protocol: Draft

Date: 20 November 2020

CONFIDENTIAL

Declaration and Signature of Persons Responsible for the Study

The Sponsor and investigator agree with the protocol and declare that they will carry out the study according to the protocol, current legislations, GCP guidelines as well as requirements of authorities. If any intentional change from the protocol turns out to be necessary the Sponsor and the Investigator should make an agreement on amendment of protocol in a written form.

Sponsor:

University of Debrecen
H-4032 Debrecen, Egyetem tér 1.,
Hungary

Responsible study supervisor:

Name/Signature

Date /dd.mmm.yyyy./

Clinical Study Sites:

3-5 Departments of Diabetology in
Hungary

Principal (coordinating)
investigator:

Name/Signature

Date /dd.mmm.yyyy./

Table of Contents

1. SYNOPSIS	5
2. STUDY FLOW CHART	8
3. ABBREVIATIONS AND ACRONYMS	10
4. GENERAL INFORMATION	11
5. RESPONSIBILITIES AND ADDRESSES	11
6. BACKGROUND AND RATIONALE	13
6.1. DESCRIPTION OF THE INVESTIGATIONAL DRUG: IMP	13
6.1.1. <i>Mode of action of IMP</i>	13
6.1.2. <i>Indications of (IMP):</i>	13
6.1.3. <i>Side effect profile of IMP</i>	13
6.1.4. <i>Pharmacokinetic profile of IMP</i>	13
6.2. RATIONALE FOR STUDY	14
6.3. REFERENCES RELEVANT TO THE BACKGROUND AND RATIONALE FOR THE STUDY	15
7. STUDY OBJECTIVE(S)	19
7.1. PRIMARY OBJECTIVE	19
7.2. SECONDARY OBJECTIVE	19
7.3. PRIMARY ENDPOINT	19
7.4. SECONDARY ENDPOINTS.....	19
8. STUDY POPULATION	19
8.1. SAMPLE SIZE	19
8.2. SELECTION OF STUDY POPULATION	19
8.3. SUBJECT RECRUITMENT PROCEDURES	19
8.4. SUBJECT INCLUSION CRITERIA	20
8.5. SUBJECT EXCLUSION CRITERIA	20
8.6. SUBJECT COMPLIANCE.....	20
8.7. SUBJECT WITHDRAWAL CRITERIA.....	20
8.8. REPLACEMENT OF DROP-OUTS	21
8.9. PREMATURE TERMINATION OF THE STUDY	21
9. STUDY DESIGN	22
9.1. ASSIGNMENT TO TREATMENTS AND RANDOMIZATION PROCEDURES	22
9.2. BLINDING	22
9.3. PROTOCOL ADHERENCE.....	22
9.4. STATISTICAL ANALYSIS.....	22
10. STUDY MEDICATION, DOSAGES AND DURATION OF TREATMENT	22
10.1. SUPPLY, PACKAGING AND LABELLING	22
10.2. STORAGE, HANDLING PROCEDURES, ACCOUNTABILITY	23
10.3. DETAILED DESCRIPTION OF STUDY MEDICATIONS	23
10.4. DOSAGE AND ADMINISTRATION	24
10.5. DURATION OF TREATMENT	24
10.6. CONCOMITANT THERAPY	24
11. STUDY PROCEDURES	24
11.1. SCREENING.....	24
11.2. STUDY PROCEDURES IN THE TREATMENT PERIOD	25
11.3. POST-STUDY PROCEDURE	25
11.4. SAFETY ASSESSMENTS.....	26

Phase 2, double-blind, parallel assignment, randomized, placebo-controlled study to evaluate the preventive effect of oral insulin formula on the development of T1D in high-risk young individuals through the induction of immunological tolerance

12. DETERMINATION OF SAFETY	26
12.1. DEFINITION	26
12.2. DOCUMENTATION AND REPORTING OF ADVERSE EVENTS	26
12.2.1. Reporting procedure	27
12.2.2. Documentation of adverse events	28
12.3. VALIDATION, EVALUATION OF ADVERSE EVENT REPORTS	30
12.4. CODING DICTIONARY	30
12.5. ANALYSIS OF SAFETY DATA	30
12.6. EMERGENCY PROCEDURES.....	30
12.7. CLINICAL LABORATORY TESTS.....	30
13. QUALITY CONTROL AND QUALITY ASSURANCE.....	30
13.1. MONITORING.....	30
13.2. AUDITING.....	31
14. REGULATORY AND ETHICAL ISSUES	31
14.1. DECLARATION OF HELSINKI.....	31
14.2. ETHICS COMMITTEE AND REGULATORY AUTHORITIES	31
14.3. INFORMATION FOR SUBJECTS AND INFORMED CONSENT.....	31
14.4. CONFIDENTIALITY.....	32
15. DATA MANAGEMENT	32
15.1. INVESTIGATOR'S FILE	32
15.2. CASE REPORT FORMS.....	32
15.3. ARCHIVING.....	33
15.4. DISCLOSURE OF INFORMATION.....	33
16. PROTOCOL AMENDMENTS AND DEVIATIONS.....	33
17. FINANCIAL ASPECTS	34
18. INSURANCE.....	34
19. CLINICAL STUDY REPORT.....	34
20. PUBLICATION POLICY	34
21. GENERAL REFERENCES	35

1. Synopsis

Name of the Sponsor/Company: University Debrecen	Study Code:
Name of the Investigational Product: Oral insulin formula	EudraCT No:
Development Phase of the Study: Phase II	
TITLE OF THE STUDY: Phase 2, double-blind, parallel assignment, randomized, placebo-controlled study to evaluate the preventive effect of oral insulin formula on the development of T1D in high-risk young individuals through the induction of immunological tolerance	
OBJECTIVES: Primary objective: Prevention of the development of T1D in high-risk young individuals. Secondary objective: Evaluation of the long-term efficacy and safety of oral insulin formula in young individuals with increased risk for the development of T1D.	
ENDPOINTS: Primary endpoint: The difference in the newly appearing T1D in the active ingredient and placebo treated groups. Secondary endpoints: Change in c-peptide level. Change in insulin autoantibody level. Insulin demand at the end of the treatment period.	
STUDY DESIGN: Phase 2, double-blind, parallel assignment, randomized, placebo-controlled study on young individuals (18-25 years of age) with high-risk T1D defined by the presence of autoantibodies and impaired glucose tolerance. Subjects will be enrolled in 1:1 ratio into the active ingredient and placebo groups. Participants will take one capsule of active ingredient or placebo once per day. Fifty young adults with high-risk T1D are planned to be enrolled.	
TREATMENT DURATION: Treatment starts immediately after randomization. Treatment ends (whichever comes first): <ul style="list-style-type: none">• after two years• development of T1D Estimated study period: 2023-2026 The total maximum duration per patient is up to 25 months The study consists of minimum 11 visits: <ul style="list-style-type: none">• A screening and randomization visit on Day 0 and Day 1.	

Phase 2, double-blind, parallel assignment, randomized, placebo-controlled study to evaluate the preventive effect of oral insulin formula on the development of T1D in high-risk young individuals through the induction of immunological tolerance

- During the treatment period visits will be at the end of the 1., 3., 6., 9., 12., 15., 18., 21., 24. months.
- The Follow-up Visit will be performed 30 days after the End of Treatment Visit
- For individuals who discontinue the study early, all the assessments listed for the Early Discontinuation Visit as specified in the schedule of visits (End of Treatment) will be performed.

First patient in: January 2023

Last patient in: August 2024

Last patient out: September 2026

INVESTIGATIONAL MEDICINAL PRODUCT:

Name: Oral insulin formula

Active ingredient: insulin, Humulin R

Dose: 20 IU Humulin R + 300 mg Acepramin once daily (May be subject to change if the results of the Phase 1 study warrants it.)

Administration: oral

Formulation: capsule

Developed by: CeraMed Kft. / University of Debrecen

Manufactured by: Meditop Gyógyszeripari Kft.

Name: **Placebo**

Active ingredient: None

Daily Dose: 1 capsule once daily

Administration: oral

Formulation: capsule

Manufactured by: Meditop Gyógyszeripari Kft.

Investigational Medicinal Products will be taken with 200 ml water.

Storage: According to the Certificate of Analysis

STUDY POPULATIONS:

Fifty young adults with anti-islet antibodies positivity (one of the antibodies is anti-insulin) and decreased glucose tolerance (GTT, 60 min PG:>8 mmol/l) aged 18-25 years.

NUMBER OF STUDY CENTRES:

3-5 study sites are envisaged in Hungary.

MAIN INCLUSION AND EXCLUSION CRITERIA:

Inclusion Criteria:

1. 18-25 years age
2. Presence of two anti-islet antibodies
3. Impaired glucose tolerance, GTT 60 min PG > 8 mmol/l
4. Ability to comprehend and willingness to sign statements of the Informed Consent Form
5. Agree to use medically acceptable and effective birth control throughout the study

Exclusion criteria:

1. Pre-existing T1D
2. Any disease if the investigator considers that it can significantly influence the development of T1D.
3. Long-term steroid treatment.
4. Ongoing immunosuppressive or immunomodulator treatment
5. Cytostatic therapy

6. Positive urine pregnancy test
7. Any disease that can be negatively influenced by insulin treatment.

Study procedures

Screening after signing the ICF.

Personal data, medical history, physical examinations (height, weight, 12-lead ECG), vital signs (blood pressure, heart rate, temperature) and laboratory tests. (including: GTT, c-peptide, anti-islet antibody assay)

Randomization to treatment: 1:1 ratio receiving oral insulin formula or placebo respectively.

Blood samples:

The prescribed blood samples are drawn at the appropriate timepoints.

- Screening: 10-15 ml
- In every three months: glucose, GTT, c-peptide (25-30 ml)
- End of Treatment: 10-15 ml
- Total taken blood volume per patient: 250-300 ml.

SAFETY ASSESSMENTS:

Clinical safety:

- physical examination
- 12 lead ECG
- Pulse rate, body temperature
- Concomitant medication
- Adverse Events

Laboratory Safety:

- Clinical chemistry
- Urinalysis
- Hematology

EFFICACY AND SAFETY VARIABLES:

Efficacy Variables:

- Appearance of T1D
- Blood glucose level/GTT
- C-peptide level
- Anti-islet autoantibody level

Safety Variables:

- Adverse Events
- Vital signs: pulse rate, body temperature

Sample size: Using a two-sided alpha level of 0.05, a total of 50 subjects is required to achieve 80% power if the change in the appearance T1D is 30%.

Statistical Analysis:

Statistical analysis will be described in a separate Statistical analysis Plan

This study will be conducted in compliance with GCP guidelines (CPMP/ICH/FDA).

2. Study Flow Chart

<i>Visit</i>	<i>Screening</i>	<i>Rando- mization</i>	<i>Visit 2</i>	<i>Visit 3</i>	<i>Visit 4</i>	<i>Visit 5</i>	<i>Visit 6</i>	<i>Visit 7</i>	<i>Visit 8</i>	<i>Visit 9</i>	<i>End of treatment*</i>	<i>Follow- up</i>
<i>Study Day, Month</i>	<i>Day -1</i>	<i>Day 1</i>	<i>Month 1</i>	<i>Month 3</i>	<i>Month 6</i>	<i>Month 9</i>	<i>Month 12</i>	<i>Month 15</i>	<i>Month 18</i>	<i>Month 21</i>	<i>Month 24</i>	<i>Month 25</i>
<i>Informed consent</i>	X											
<i>Inclusion/exclusion criteria</i>		X										
<i>Randomization</i>		X										
<i>Demography</i>	X											
<i>Medical History</i>	X											
<i>Concomitant Medication</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Physical examination</i>	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Height and Weight</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
<i>Vital signs</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
<i>12 lead ECG</i>	X						X				X	
<i>Blood sampling (routine labs)</i>	X				X		X		X		X	
<i>Urine sampling</i>	X				X		X		X		X	
<i>Blood sampling (Se insulin, C-peptide, islet antibodies)</i>	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	
<i>Pregnancy test (for female subjects only)</i>	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	
<i>Oral Glucose Tolerance test</i>	X			X	X		X		X		X	
<i>IMP dispensation</i>		X		X	X	X	X	X	X	X		
<i>IMP return</i>				X	X	X	X	X	X	X	X	
<i>AE recording</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Subject compliance check</i>			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

- In case of early withdrawal an Early Termination Visit should be performed. The Early Termination Visit will be identical to the End-of-Treatment Visit

Phase 2, double-blind, parallel assignment, randomized, placebo-controlled study to evaluate the preventive effect of oral insulin formula on the development of T1D in high-risk young individuals through the induction of immunological tolerance

3. Abbreviations and Acronyms

AE	Adverse Event
ALP	Alkaline Phosphatase
ALT	Alanine amino transferase
ANOVA	Analysis of Variance
AST	Aspartate amino transferase
CEC	Central Ethics Committee
CK	Creatine phosphokinase
CRF	Case Report Form
ECG	Electrocardiography
FDA	Food and Drug Administration
GCP	Good Clinical Practice
GGT	Gamma glutamyl transpeptidase
GLP	Good Laboratory Practice
GMP	Good Manufacturing Practice
GTT	(oral) Glucose Tolerance test
HbsAg	Hepatitis B surface antigen
HCV	Hepatitis C
HIV	Human immunodeficiency virus
ICH	International Council for Harmonization
IMP	Investigational Medical Product
ITT	Intention-to-treat
LDH	Lactate dehydrogenase
Max	Maximum
MCHC	Mean corpuscular haemoglobin concentration
MCV	Mean corpuscular volume
Min	Minimum
mmol/l	millimol(liter
OD	Once daily
PP	Per Protocol
SD	Standard deviation
SOP	Standard Operating Procedure
SAE	Serious Adverse Events
SUSAR	Suspected Unexpected Serious Adverse Reaction
SDV	Source document verification
TBD	To be defined (later)

4. General Information

Name and address of the Sponsor	University of Debrecen H-4032 Debrecen, Egyetem tér 1., Hungary ☎: (+36 1) TBD Fax. (+36 1)
Name and address of the clinical investigational site	TBD
Statistical evaluation	TBD
Safety data analysis	TBD
In case of adverse drug reaction should be informed	TBD
Estimated start of the study	Q1 2023 Q3 2026
Estimated end of the clinical part of the study	
Final report	Q1 2027

5. Responsibilities and Addresses

Sponsor

Study Supervisor: Name and address, phone, mail

Study Manager: Name and address, phone, mail

Monitor: Name and address, phone, mail

Drug Safety: Name and address, phone, mail

Safety analysis and Reporting

Safety data analysis:

Name and address, phone, mail

Author of Integrated Study Report:

Name and address, phone, mail

6. Background and rationale

6.1. Description of the Investigational Drug: IMP

6.1.1. Mode of action of IMP

Oral administration of insulin, i.e. absorption from the intestinal tract, has several benefits. The oral medicine avoids the risk of infection with frequent use of parenteral insulin. Oral drug compliance, as it is not unpleasant, is not painful is also superior to injectable treatment. During enteral absorption, insulin gets closer to the pathway of its physiological action, as first it enters the liver through the portal veins, and the highest insulin levels will not be observed at the periphery as it happens subcutaneous administration.

6.1.2. Indications of (IMP):

Diabetes mellitus (both Type 1 and Type 2) is a common illness affecting more and more people – both adults and children. One of the mainstays of diabetes therapy is insulin, known and used for over 100 years. The insulin, being a protein is not absorbed from the gastrointestinal tract intactly, thus it can be administered only parenterally (subcutaneously or intravenously). While this does not limit its use, an insulin preparation that could be administered orally offer huge advantage and increase patient compliance.

Another potential use of the oral insulin could be the prevention or at least delaying onset of Type 1 diabetes in children.

6.1.3. Side effect profile of IMP

At this stage of development human adverse event profile is unknown yet.

It can be expected that potential blood glucose lowering may occur with its linked side-effects (e.g. hypoglycaemia, weakness, feeling faint, feeling hungry, fainting), but at the doses administrated in this study such events are unlikely.

Also, allergic reactions to all components of the preparations may be expected.

6.1.4. Pharmacokinetic profile of IMP

Absorption: IMP is rapidly absorbed. Available data show that 30' after administration of the oral insulin preparation the blood glucose levels are already decreasing.

Distribution: Oral insulin enters the circulation in a near-physiological way, and enters the liver in the portal system. Thus its distribution follows the physiological process.

Elimination: Elimination of the insulin also occurs by a physiological pattern.

Important and favourable feature of IMP is that no dose adjustment is necessary in liver or kidney diseases because due to its metabolism it does not cumulate.

Changes of pharmacokinetic properties under special circumstances (e.g. age, accompanying diseases): This was not examined in depth. Further clinical trials are necessary to define this aspect.

6.2. Rationale for study

Type 1 diabetes mellitus (T1DM) is one of the most common hormonal and metabolic diseases that occur in childhood. The main feature of the disease, i.e. elevated blood sugar levels, is caused by the destruction of insulin-producing β cells in the pancreatic islets of Langerhans (1). In the vast majority of cases, the death and loss of function of β cells is caused by the autoimmune process against β cells. The cause of β -cell death in a small proportion of patients is unknown (2). The incidence of T1DM is increasing by 2-3% per year worldwide, with growth even faster in the under-5 age group (3).

Figure 1 illustrates the incidence and prevalence of childhood T1DM worldwide.

Figure 1. Incidence and prevalence of childhood T1DM worldwide

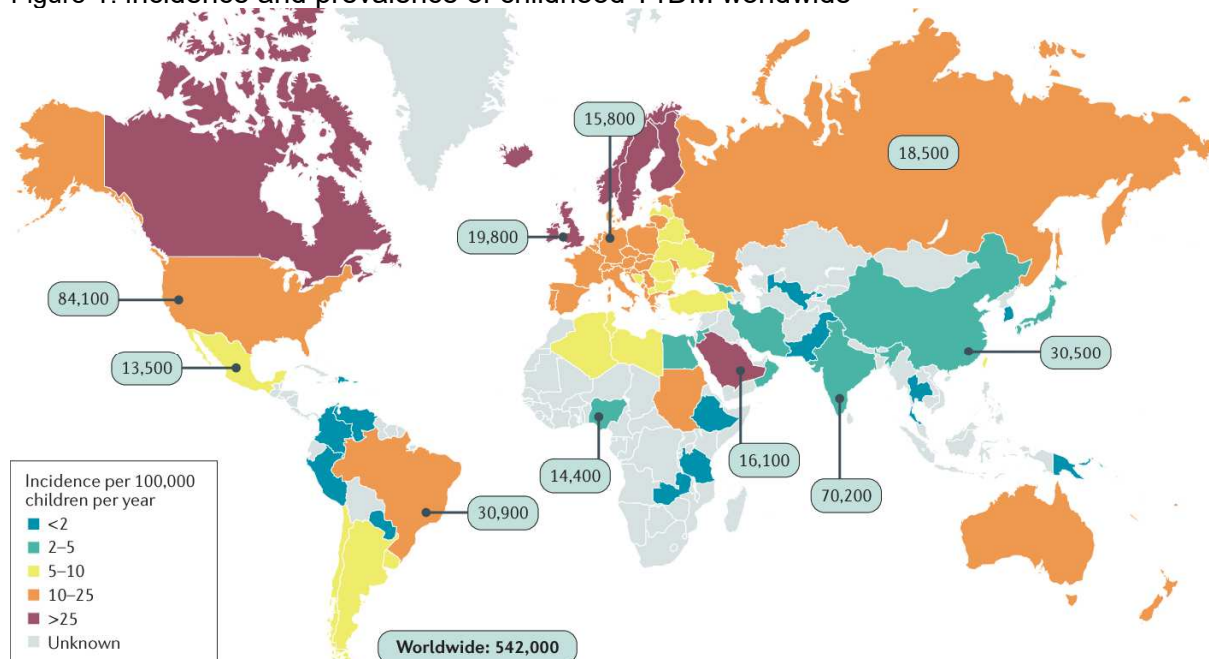


Figure 2 | The incidence and prevalence of T1DM in children. The estimated number of new cases of type 1

The direct cause of autoantibody production is not precisely known, an essential prerequisite is the antigen presentation by dendritic cells and the interaction of B cells with antigen-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells.

Treating T1DM requires an interdisciplinary approach, and collaboration between physician, dietitian, psychologist, patient, parents, and environment is essential to success. The goal of treatment is to maintain a long-term glycemic balance in a healthy lifestyle and to avoid severe hypoglycemic and hyperglycemic ketoacidosis. From the third stage of the disease, continuous insulin treatment is essential due to severe insufficiency of endogenous insulin production.

Since the mid-1970s, a number of open-label, uncontrolled studies have aimed to maintain or increase the amount and insulin-producing capacity of residual insulin-producing β cells through inhibition of the autoimmune process.

A new procedure to prevent the development of the disease has been started in the last few years. In a mouse model the chronic administration of oral insulin significantly decreased the incidence of Type 1 diabetes.

Given the autoimmune origin of the disease, the procedure attempts to desensitize the patient's body by an analogy to allergic diseases, which is also an abnormal immune response. In doing so, different amounts of insulin (oral insulin therapy) were given orally to at-risk children.

The aim of the current drug development is an oral insulin preparation that can be used in the everyday clinical practice.

6.3. References relevant to the background and rationale for the study

1. Eisenbarth GS. Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. *N Engl J Med.* 1986;314(21):1360-8.
2. American Diabetes A. (2) Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes Care.* 2015;38 Suppl:S8-S16.
3. Chobot A, Polanska J, Brandt A, Deja G, Glowinska-Olszewska B, Pilecki O, et al. Updated 24-year trend of Type 1 diabetes incidence in children in Poland reveals a sinusoidal pattern and sustained increase. *Diabet Med.* 2017;34(9):1252-8.
4. Diaz-Valencia PA, Bougneres P, Valleron AJ. Global epidemiology of type 1 diabetes in young adults and adults: a systematic review. *BMC Public Health.* 2015;15:255.
5. Rawshani A, Landin-Olsson M, Svensson AM, Nystrom L, Arnqvist HJ, Bolinder J, et al. The incidence of diabetes among 0-34 year olds in Sweden: new data and better methods. *Diabetologia.* 2014;57(7):1375-81.
6. Thomas NJ, Jones SE, Weedon MN, Shields BM, Oram RA, Hattersley AT. Frequency and phenotype of type 1 diabetes in the first six decades of life: a cross-sectional, genetically stratified survival analysis from UK Biobank. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2018;6(2):122-9.
7. Zhang R, Cai XL, Liu L, Han XY, Ji LN. Type 1 diabetes induced by immune checkpoint inhibitors. *Chin Med J (Engl).* 2020;133(21):2595-8.
8. Cooper JD, Howson JM, Smyth D, Walker NM, Stevens H, Yang JH, et al. Confirmation of novel type 1 diabetes risk loci in families. *Diabetologia.* 2012;55(4):996-1000.
9. Redondo MJ, Jeffrey J, Fain PR, Eisenbarth GS, Orban T. Concordance for islet autoimmunity among monozygotic twins. *N Engl J Med.* 2008;359(26):2849-50.
10. Redondo MJ, Geyer S, Steck AK, Sharp S, Wentworth JM, Weedon MN, et al. A Type 1 Diabetes Genetic Risk Score Predicts Progression of Islet Autoimmunity and Development of Type 1 Diabetes in Individuals at Risk. *Diabetes Care.* 2018;41(9):1887-94.
11. Erlich HA, Valdes AM, McDevitt SL, Simen BB, Blake LA, McGowan KR, et al. Next generation sequencing reveals the association of DRB3*02:02 with type 1 diabetes. *Diabetes.* 2013;62(7):2618-22.
12. Krischer JP, Lynch KF, Schatz DA, Ilonen J, Lernmark A, Hagopian WA, et al. The 6 year incidence of diabetes-associated autoantibodies in genetically at-risk children: the TEDDY study. *Diabetologia.* 2015;58(5):980-7.
13. Polychronakos C, Li Q. Understanding type 1 diabetes through genetics: advances and prospects. *Nat Rev Genet.* 2011;12(11):781-92.
14. Hayter SM, Cook MC. Updated assessment of the prevalence, spectrum and case definition of autoimmune disease. *Autoimmun Rev.* 2012;11(10):754-65.
15. Hyoty H. Viruses in type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes.* 2016;17 Suppl 22:56-64.
16. Knip M, Virtanen SM, Akerblom HK. Infant feeding and the risk of type 1 diabetes. *Am J Clin Nutr.* 2010;91(5):1506s-13s.
17. Rešić Lindehammer S, Honkanen H, Nix WA, Oikarinen M, Lynch KF, Jönsson I, et al. Seroconversion to islet autoantibodies after enterovirus infection in early pregnancy. *Viral Immunol.* 2012;25(4):254-61.
18. Taplin CE, Barker JM. Autoantibodies in type 1 diabetes. *Autoimmunity.* 2008;41(1):11-8.
19. Savola K, Bonifacio E, Sabbah E, Kulmala P, Vähäsalo P, Karjalainen J, et al. IA-2 antibodies--a sensitive marker of IDDM with clinical onset in childhood and adolescence. *Childhood Diabetes in Finland Study Group. Diabetologia.* 1998;41(4):424-9.
20. Ziegler AG, Rewers M, Simell O, Simell T, Lempainen J, Steck A, et al. Seroconversion to multiple islet autoantibodies and risk of progression to diabetes in children. *Jama.* 2013;309(23):2473-9.

Phase 2, double-blind, parallel assignment, randomized, placebo-controlled study to evaluate the preventive effect of oral insulin formula on the development of T1D in high-risk young individuals through the induction of immunological tolerance

21. Mao RF, Chen YY, Zhang J, Chang X, Wang YF. Type 1 diabetes mellitus and its oral tolerance therapy. *World J Diabetes*. 2020;11(10):400-15.
22. Katsarou A, Gudbjörnsdottir S, Rawshani A, Dabelea D, Bonifacio E, Anderson BJ, et al. Type 1 diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17016.
23. Oling V, Reijonen H, Simell O, Knip M, Ilonen J. Autoantigen-specific memory CD4+ T cells are prevalent early in progression to Type 1 diabetes. *Cell Immunol*. 2012;273(2):133-9.
24. McLaughlin RJ, Spindler MP, van Lummel M, Roep BO. Where, How, and When: Positioning Posttranslational Modification Within Type 1 Diabetes Pathogenesis. *Curr Diab Rep*. 2016;16(7):63.
25. Babon JA, DeNicola ME, Blodgett DM, Crèvecoeur I, Buttrick TS, Maehr R, et al. Analysis of self-antigen specificity of islet-infiltrating T cells from human donors with type 1 diabetes. *Nat Med*. 2016;22(12):1482-7.
26. Burrack AL, Martinov T, Fife BT. T Cell-Mediated Beta Cell Destruction: Autoimmunity and Alloimmunity in the Context of Type 1 Diabetes. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017;8:343.
27. Lampeter EF, McCann SR, Kolb H. Transfer of diabetes type 1 by bone-marrow transplantation. *Lancet*. 1998;351(9102):568-9.
28. Rodriguez-Calvo T, Richardson SJ, Pugliese A. Pancreas Pathology During the Natural History of Type 1 Diabetes. *Curr Diab Rep*. 2018;18(11):124.
29. 5. Glycemic Targets. *Diabetes Care*. 2016;39 Suppl 1:S39-46.
30. Rewers A, Klingensmith G, Davis C, Petitti DB, Pihoker C, Rodriguez B, et al. Presence of diabetic ketoacidosis at diagnosis of diabetes mellitus in youth: the Search for Diabetes in Youth Study. *Pediatrics*. 2008;121(5):e1258-66.
31. Nathan DM. The diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications study at 30 years: overview. *Diabetes Care*. 2014;37(1):9-16.
32. Skyler JS. Immune intervention for type 1 diabetes mellitus. *Int J Clin Pract Suppl*. 2011(170):61-70.
33. Cyclosporin-induced remission of IDDM after early intervention. Association of 1 yr of cyclosporin treatment with enhanced insulin secretion. The Canadian-European Randomized Control Trial Group. *Diabetes*. 1988;37(11):1574-82.
34. Herold KC, Hagopian W, Auger JA, Poumian-Ruiz E, Taylor L, Donaldson D, et al. Anti-CD3 monoclonal antibody in new-onset type 1 diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 2002;346(22):1692-8.
35. Pescovitz MD, Greenbaum CJ, Krause-Steinrauf H, Becker DJ, Gitelman SE, Goland R, et al. Rituximab, B-lymphocyte depletion, and preservation of beta-cell function. *N Engl J Med*. 2009;361(22):2143-52.
36. Atkinson MA, Roep BO, Posgai A, Wheeler DCS, Peakman M. The challenge of modulating β -cell autoimmunity in type 1 diabetes. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2019;7(1):52-64.
37. Campbell-Thompson M, Fu A, Kaddis JS, Wasserfall C, Schatz DA, Pugliese A, et al. Insulinitis and β -Cell Mass in the Natural History of Type 1 Diabetes. *Diabetes*. 2016;65(3):719-31.
38. Wasserfall C, Nick HS, Campbell-Thompson M, Beachy D, Haataja L, Kusmartseva I, et al. Persistence of Pancreatic Insulin mRNA Expression and Proinsulin Protein in Type 1 Diabetes Pancreata. *Cell Metab*. 2017;26(3):568-75.e3.
39. Bonifacio E, Ziegler AG, Klingensmith G, Schober E, Bingley PJ, Rottenkolber M, et al. 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):1541-9.
40. Rezende RM, Weiner HL. History and mechanisms of oral tolerance. *Semin Immunol*. 2017;30:3-11.
41. Knoop KA, Miller MJ, Newberry RD. Transepithelial antigen delivery in the small intestine: different paths, different outcomes. *Curr Opin Gastroenterol*. 2013;29(2):112-8.
42. Niess JH, Brand S, Gu X, Landsman L, Jung S, McCormick BA, et al. CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science*. 2005;307(5707):254-8.

Phase 2, double-blind, parallel assignment, randomized, placebo-controlled study to evaluate the preventive effect of oral insulin formula on the development of T1D in high-risk young individuals through the induction of immunological tolerance

43. Tordesillas L, Berin MC. Mechanisms of Oral Tolerance. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2018;55(2):107-17.
44. Krischer JP, Lynch KF, Schatz DA, Ilonen J, Lernmark Å, Hagopian WA, et al. The 6 year incidence of diabetes-associated autoantibodies in genetically at-risk children: the TEDDY study. *Diabetologia*. 2015;58(5):980-7.
45. Carel JC, Bougnères P, Vardi P. Suppression of diabetes in nonobese diabetic mice by oral administration of porcine insulin. *J Endocrinol Invest*. 1994;17(7):573-80.
46. Bresson D, Togher L, Rodrigo E, Chen Y, Bluestone JA, Herold KC, et al. Anti-CD3 and nasal proinsulin combination therapy enhances remission from recent-onset autoimmune diabetes by inducing Tregs. *J Clin Invest*. 2006;116(5):1371-81.
47. Raab J, Haupt F, Scholz M, Matzke C, Warncke K, Lange K, et al. Capillary blood islet autoantibody screening for identifying pre-type 1 diabetes in the general population: design and initial results of the Fr1da study. *BMJ Open*. 2016;6(5):e011144.
48. Wan X, Unanue ER. Unique features in the presentation of insulin epitopes in autoimmune diabetes: an update. *Curr Opin Immunol*. 2017;46:30-7.
49. Zhang ZJ, Davidson L, Eisenbarth G, Weiner HL. Suppression of diabetes in nonobese diabetic mice by oral administration of porcine insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(22):10252-6.
50. Pham MN, Gibson C, Rydén AK, Perdue N, Boursalian TE, Pagni PP, et al. Oral insulin (human, murine, or porcine) does not prevent diabetes in the non-obese diabetic mouse. *Clin Immunol*. 2016;164:28-33.
51. Pozzilli P, Pitocco D, Visalli N, Cavallo MG, Buzzetti R, Crinò A, et al. No effect of oral insulin on residual beta-cell function in recent-onset type 1 diabetes (the IMDIAB VII). *IMDIAB Group. Diabetologia*. 2000;43(8):1000-4.
52. Chaillous L, Lefèvre H, Thivolet C, Boitard C, Lahlou N, Atlan-Gepner C, et al. Oral insulin administration and residual beta-cell function in recent-onset type 1 diabetes: a multicentre randomised controlled trial. *Diabète Insuline Orale group. Lancet*. 2000;356(9229):545-9.
53. Pozzilli P, Gisella Cavallo M. Oral insulin and the induction of tolerance in man: reality or fantasy? *Diabetes Metab Res Rev*. 2000;16(5):306-7.
54. Skyler JS, Krischer JP, Wolfsdorf J, Cowie C, Palmer JP, Greenbaum C, et al. Effects of oral insulin in relatives of patients with type 1 diabetes: The Diabetes Prevention Trial--Type 1. *Diabetes Care*. 2005;28(5):1068-76.
55. Krischer JP, Schatz DA, Bundy B, Skyler JS, Greenbaum CJ. Effect of Oral Insulin on Prevention of Diabetes in Relatives of Patients With Type 1 Diabetes: A Randomized Clinical Trial. *Jama*. 2017;318(19):1891-902.
56. Makino S, Kunimoto K, Muraoka Y, Mizushima Y, Katagiri K, Tochino Y. Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Jikken Dobutsu*. 1980;29(1):1-13.
57. Racine JJ, Stewart I, Ratiu J, Christianson G, Lowell E, Helm K, et al. Improved Murine MHC-Deficient HLA Transgenic NOD Mouse Models for Type 1 Diabetes Therapy Development. *Diabetes*. 2018;67(5):923-35.
58. Xu H, Wang B, Ono M, Kagita A, Fujii K, Sasakawa N, et al. Targeted Disruption of HLA Genes via CRISPR-Cas9 Generates iPSCs with Enhanced Immune Compatibility. *Cell Stem Cell*. 2019;24(4):566-78.e7.
59. Mordes JP, Bortell R, Blankenhorn EP, Rossini AA, Greiner DL. Rat models of type 1 diabetes: genetics, environment, and autoimmunity. *Ilar j*. 2004;45(3):278-91.
60. Furman BL. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Curr Protoc Pharmacol*. 2015;70:5.47.1-5..20.
61. Nelson RW, Reusch CE. Animal models of disease: classification and etiology of diabetes in dogs and cats. *J Endocrinol*. 2014;222(3):T1-9.

Phase 2, double-blind, parallel assignment, randomized, placebo-controlled study to evaluate the preventive effect of oral insulin formula on the development of T1D in high-risk young individuals through the induction of immunological tolerance

62. Wong FS, Visintin I, Wen L, Flavell RA, Janeway CA, Jr. CD8 T cell clones from young nonobese diabetic (NOD) islets can transfer rapid onset of diabetes in NOD mice in the absence of CD4 cells. *J Exp Med.* 1996;183(1):67-76.
63. Serreze DV, Fleming SA, Chapman HD, Richard SD, Leiter EH, Tisch RM. B lymphocytes are critical antigen-presenting cells for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol.* 1998;161(8):3912-8.
64. Abiru N, Yu L, Miao D, Maniatis AK, Liu E, Moriyama H, et al. Transient insulin autoantibody expression independent of development of diabetes: comparison of NOD and NOR strains. *J Autoimmun.* 2001;17(1):1-6.
65. Bowman MA, Leiter EH, Atkinson MA. Prevention of diabetes in the NOD mouse: implications for therapeutic intervention in human disease. *Immunol Today.* 1994;15(3):115-20.
66. Tisch R, McDevitt H. Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell.* 1996;85(3):291-7.
67. Thébault-Baumont K, Dubois-Laforgue D, Krief P, Briand JP, Halbout P, Vallon-Geoffroy K, et al. Acceleration of type 1 diabetes mellitus in proinsulin 2-deficient NOD mice. *J Clin Invest.* 2003;111(6):851-7.
68. Elso CM, Scott NA, Mariana L, Masterman EI, Sutherland APR, Thomas HE, et al. Replacing murine insulin 1 with human insulin protects NOD mice from diabetes. *PLoS One.* 2019;14(12):e0225021.
69. Mao R, Chen Y, Wu Q, Zhang T, Diao E, Wu D, et al. Oral delivery of single-chain insulin (SCI-59) analog by bacterium-like particles (BLPs) induces oral tolerance and prevents autoimmune diabetes in NOD mice. *Immunol Lett.* 2019;214:37-44.
70. Shehadeh N, Weis R, Teninboum G, Benderly A, Etzioni A, Shamir R. The influence of oral insulin on the development of autoimmune diabetes in NOD mice fed a hypoallergenic diet. *Diabetes Nutr Metab.* 2004;17(1):1-5.
71. Peppia M, He C, Hattori M, McEvoy R, Zheng F, Vlassara H. Fetal or neonatal low-glycotoxin environment prevents autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes.* 2003;52(6):1441-8.
72. Brezar V, Culina S, Gagnerault MC, Mallone R. Short-term subcutaneous insulin treatment delays but does not prevent diabetes in NOD mice. *Eur J Immunol.* 2012;42(6):1553-61.
73. Atkinson MA, Maclaren NK, Luchetta R. Insulinitis and diabetes in NOD mice reduced by prophylactic insulin therapy. *Diabetes.* 1990;39(8):933-7.

7. STUDY OBJECTIVE(S)

7.1. Primary objective

Prevention of the development of T1D in high-risk young individuals..

7.2. Secondary objective

Evaluation of the long-term efficacy and safety of oral insulin formula in young individuals with increased risk for the development of T1D..

7.3. Primary endpoint

- The difference in the newly appearing T1D in the active ingredient and placebo treated groups.

7.4. Secondary endpoints

- Change in c-peptide level.
- Change in insulin autoantibody level.
- Insulin demand at the end of the treatment period.

8. STUDY POPULATION

8.1. Sample size

50 eligible young adults (18-25 years of age) will be enrolled into the study. (Drop-outs will not be replaced.)

8.2. Selection of study population

There will be three subject populations defined for the study:

- The full analysis set is defined to be as close to the idea of including all randomized subjects (by intention-to-treat principle, ITT). Subjects will be excluded from the full analysis set for the following reasons:
 - Failing to satisfy major entry criteria
 - Failing to take at least one dose of the study medication
 - Lack of any data post randomization
- The per-protocol (PP) population will include all randomized subjects who were included in the ITT and who completed the 3 treatment periods according to the protocol. Subjects will be excluded from the PP set for the following reasons:
 - Failing to satisfy full analysis set criteria
 - Presence of a major protocol violation
 - Pharmacokinetic target parameters not available for any of the periods.
- The safety population will include all randomized subjects who received at least one dose of study medication.

8.3. Subject recruitment procedures

Subjects will be recruited from the patient population of the study sites. Study sites may also receive referrals from other departments/physicians.

Potential male and female subjects will be screened for eligibility within 14 days after given written informed consent. Screening will consist of demographic data, medical and medication histories,

Phase 2, double-blind, parallel assignment, randomized, placebo-controlled study to evaluate the preventive effect of oral insulin formula on the development of T1D in high-risk young individuals through the induction of immunological tolerance

physical examination, body measurements (height, weight, BMI, body temperature), vital signs, 12 lead ECG, clinical laboratory safety tests (haematology, biochemistry, urinalysis, HBsAg, anti-HCV and HIV I & II), efficacy tests (se insulin, C-peptide, islet antibodies), GTT.

A person is considered eligible if the results of the screening test meet all the inclusion and none of the exclusion criteria

Any laboratory value outside the normal range could generally not be regarded as an exclusion criterion provided that:

- they were not accompanied by clinical symptoms, and
- the context of related laboratory values gave no indication of pathological process, and
- the Investigator classified them as clinically irrelevant in written form in the CRF.

8.4. Subject inclusion criteria

Subjects enrolled in this study will be patients identified by and/or referred to the clinical study sites. They must meet all of the following criteria in order to be included in the study:

- 18-25 years of age
- Presence of two anti-islet antibodies
- Impaired glucose tolerance, GTT 60 min PG > 8 mmol/l
- Ability to comprehend and willingness to sign statements of the Informed Consent Form
- Agree to use medically acceptable and effective birth control throughout the study

8.5. Subject exclusion criteria

Subjects to whom any of the following applies will be excluded from the study:

- Pre-existing T1D
- Any disease if the investigator considers that it can significantly influence the development of T1D.
- Long-term steroid treatment.
- Ongoing immunosuppressive or immunomodulator treatment
- Cytostatic therapy
- Positive urine pregnancy test
- Any disease that can be negatively influenced by insulin treatment.

8.6. Subject compliance

The study will be run on outpatient base. Subject compliance will be checked by the study team during study visits.

8.7. Subject withdrawal criteria

In accordance with the Declaration of Helsinki and the applicable regulatory requirements, the subject involved in the study can withdraw his consent at any time without giving any reason, and it should not be announced in written form. It is sufficient to inform the investigator about his decision orally.

Subjects may be withdrawn for the following reason:

- at their own request with or without giving reasons,
- at the discretion of the Investigator for reason of medical prudence,
- at the proposal of the Sponsor.

Phase 2, double-blind, parallel assignment, randomized, placebo-controlled study to evaluate the preventive effect of oral insulin formula on the development of T1D in high-risk young individuals through the induction of immunological tolerance

The principal investigator or the institutional ethics committee should initiate the withdrawal in the following cases:

- If circumstances defined as exclusion criteria are registered.
- Onset of any disease demanding any medicinal treatment during the study period, which can influence the validation of the results, even if any relationship between the illness and the study treatment seems not to be likely.
- In cases of adverse events that are dangerous to the health of the subject.
- If the subject does not cooperate with the investigator, and does not comply with the regulations prescribed in Subjects' Information Sheet.
- If personal circumstances suggest that the visits required by the protocol cannot be guaranteed any longer.
- In case of serious protocol deviation.

Each subject being withdrawn should undergo a complete final examination within one week after the withdrawal with regard to the subject's health conditions and for safety aspects.

In case of any withdrawal from the study (whether voluntary or not) the Sponsor should be immediately notified. The date and reason of withdrawal should be clearly stated in the subject's CRF.

The Sponsor should also be immediately consulted / notified in the following cases:

- Vomiting within $2 \times t_{\max}$ of the active ingredients (namely within 2 hours after drug administration).
- Protocol violations which are potentially serious, and thus being potential reasons to withdraw the subjects from the trial.
- Concomitant medication or other events which can influence the authenticity of data collected throughout the study.
- Serious adverse events, whether expected or unexpected.

8.8. Replacement of Drop-outs

Subjects being withdrawn will not be replaced

8.9. Premature Termination of the Study

If the study sponsor or the Principal Investigator discovers conditions arising during the study which indicate that the clinical investigation should be stopped, the study can be terminated after appropriate consultation among the study sponsor and the Principal Investigator.

In addition, conditions which may warrant study termination include, but not limited to the following:

- Unexpected and significant or unacceptable risks for the subjects are revealed during the study.
- The sponsor's decision to suspend or discontinue the trial for administrative or other reason.

If a trial is prematurely terminated or suspended, the sponsor has to inform promptly the investigators, the authorities and the EC of the termination or suspension and the reason(s) for the termination or suspension.

If premature termination of the study is unavoidable, investigators must take measures to safeguard the interests of the included subjects.

Premature termination does not affect the documentation responsibilities of the investigator and the sponsor.

9. Study design

Phase 2, double-blind, parallel assignment, randomized, placebo-controlled study on young individuals (18-25 years of age) with high-risk T1D defined by the presence of autoantibodies and impaired glucose tolerance.

Subjects will be enrolled in 1:1 ratio into the active ingredient and placebo groups.

9.1. Assignment to treatments and randomization procedures

The randomization scheme will be prepared by the study statistician. Subject codes will be made available to the investigators in individual closed envelopes, showing only the treatment number on the outside. Following admission to the study, subjects will be assigned the next available treatment number. Instructions for code breaking will be provided to the Investigators.

9.2. Blinding

In the event of a medical emergency when management of a subject's condition requires knowledge of the trial medication, the sealed "code-break" envelope provided may be opened to determine the nature of the trial medication dispensed. If possible, such emergencies should be discussed with Sponsor's representative prior to disclosure of the treatment allocation.

Reasons for breaking a code must be clearly explained and justified in the CRF. The date on which the code was broken together with the identity of the person responsible must also be documented.

9.3. Protocol adherence

The protocol must be read thoroughly and the instructions followed exactly. Any intentional change should be agreed by both the Sponsor and the Investigator, with the appropriate written and approved protocol amendments made to reflect the changes agreed upon. Where the change occurs for the wellbeing of the subject, the Sponsor must be informed of the action.

9.4. Statistical analysis

The statistical analysis methods will be described in a separate Statistical Analysis Plan

Individual and summary blood pressures, heart rate, ECG parameters, and clinical laboratory data will be presented in tabular form with mean, median, standard deviation and range (min and max) as appropriate.

For the laboratory safety data, out of range values will be flagged in the data listings and a list of clinically significantly abnormal values will be presented.

Adverse events will be tabulated and summarised according to the current version of Medical Dictionary for Regulatory Activities (MedDRA).

10. STUDY MEDICATION, DOSAGES AND DURATION OF TREATMENT

10.1. Supply, packaging and labelling

The study medications will be produced and packaged by an appropriate GMP-compliant facility selected by the Sponsor.

Phase 2, double-blind, parallel assignment, randomized, placebo-controlled study to evaluate the preventive effect of oral insulin formula on the development of T1D in high-risk young individuals through the induction of immunological tolerance

Individual subject study medications will be packaged in bottles for each subject and each study period separately according to the randomization list.

Analytical certificates with the batch numbers will be attached to the study medications. Study medications should be released before transport to the clinical study site by a Qualified Person.

Labelling instructions (in Hungarian):

- Name, address of the sponsor;
- The batch and/or code number to identify the contents and packaging operation,
- Dosage and administration as detailed in Section 10.4
- Investigator's name, phone,
- Study code number,
- Expiry date,
- Storage conditions,
- "For clinical trial use only",
- Subject identification number,
- Name and formula of the study medication,
- Name and strength of the active ingredient,
- Study period number,

10.2. Storage, handling procedures, accountability

All study medication will be stored as stated in the Certificate of Analysis.

No special procedures for the safe handling of the medication are required.

The Investigator will dispense the study medication only to subjects included in the study, by following the procedure set in this protocol. It is forbidden to use the study medication for any other purpose.

The sponsor will be permitted upon request to audit the supply storage and dispensing procedures and records.

All unused supplies of study medication will be returned to SPONSOR., at the end of the study. Copies of the study drug accountability record will be provided to the sponsor.

10.3. Detailed description of study medications

Name:	IMP capsule 20 NE
Formulation:	Capsule
Manufacturer:	TBD
Active ingredient:	Insulin humanum
Unit dose:	20 NE
Mode of administration:	Oral
Regimen:	See Section 10.4
Batch number:	See the Certificate of Analysis
Expiry date:	See the Certificate of Analysis
Storage conditions:	As stated in the Certificate of Analysis

Name:	Placebo capsule
Formulation:	Capsule
Manufacturer:	TBD
Active ingredient:	No active ingredient
Unit dose:	N/A
Mode of administration:	Oral
Regimen:	See Section 10.4
Batch number:	See the Certificate of Analysis
Expiry date:	See the Certificate of Analysis
Storage conditions:	As stated in the Certificate of Analysis

10.4. Dosage and administration

During the study patients are expected to take one capsule (containing oral insulin preparation or placebo) once daily with approx. 200 ml tap water. Subjects are encouraged to take their daily medication preferably at the same time each day.

In case the subject forgets taking a daily dose, he/she may take it within 4 hours to nominal intake time. If the elapsed time is longer than 4 hours, the dose should not be taken, and routine administration should resume the next day.

10.5. Duration of treatment

Treatment will last up to 24 months

10.6. Concomitant therapy

Any drugs taken routinely prior to the study may be continued with the approval of the Investigator. Any new drug treatments (including over-the-counter preparations, vitamins and dietary supplements) may only be started with the prior approval of the Investigator.

11. STUDY PROCEDURES

Prior to participation in the trial, each subject should give his/her consent to participate by signing and dating the informed consent form. The investigator should not undertake any investigations specifically required only for the clinical study until valid consent had been obtained.

The screening examination will be carried out not more than 1 week prior to the study drug administration.

Following evaluation of the screening results, in/exclusion criteria those subjects who are eligible will be included.

The study treatment period will be carried out on outpatient basis, with regular scheduled visits to the study site.

For each subject being withdrawn from the study due to any reason, a complete final examination has to be performed within one week after the withdrawal with regard to the subject's safety.

11.1. Screening

Within three weeks prior to beginning of the study:

- Signature of Informed Consent Form.
- Demography data (age, race), body weight and height, body temperature, BMI.
- Medical history.
- Physical examination (including measurements of blood pressure and heart rate after 5 minutes supine rest, and body temperature), standard 12 lead ECG.
- Laboratory tests (after 10 hours fasting): haematology, blood chemistry and urinalysis.
- Lab tests for efficacy parameters (se insulin, C-peptide, islet antibodies, GTT)
- Viral serology (HBsAg, Anti HCV, HIV 1+2, COVID PCR).

All laboratory tests will be carried out in the local laboratories of clinical study sites.

Single laboratory values other than those relevant to the study efficacy analysis outside the normal range will generally not be regarded as an exclusion criterion provided that:

- they are not accompanied by clinical symptoms,
- the context of related laboratory values gives no indication of a pathological process,
- the investigator regards them as clinically irrelevant.

11.2. Study procedures in the treatment period

During the treatment period there will be 8 scheduled visits and an End-of-Treatment Visit i.e. in Month 1, Month 3, Month 6, Month 9, Month 12, Month 15, Month 18, Month 21 and Month 24. In case of early withdrawal an Early Discontinuation Visit should be performed within 1 week following withdrawal. The Early Discontinuation Visit is identical to the End-of-Treatment Visit. 30 (± 3) days after the End-of-Treatment Visit or the Early Discontinuation Visit (whichever is applicable) a safety follow-up visit has to be performed.

At the regular visits (Month 1, Month 3, Month 6, Month 9, Month 12, Month 15, Month 18, Month 21) the following tests/procedures should be performed:

- Physical examination, including body height and weight measurement.
- Vital signs
- 12-lead ECG (Month 12 only)
- Blood and urine sampling for routine labs (Months 6, 12 and 18 only)
- Blood sampling for efficacy parameters
- Pregnancy test for female patients only
- Oral glucose tolerance test (Months 3, 6, 12 and 18 only)
- Recording adverse events and concomitant medication
- Compliance check

At the End-of-Treatment Visit or the Early Discontinuation Visit (whichever is applicable) the following tests/procedures should be performed:

- Physical examination, including body height and weight measurement.
- Vital signs
- 12-lead ECG
- Blood and urine sampling for routine labs
- Blood sampling for efficacy parameters
- Pregnancy test for female patients only
- Oral glucose tolerance test
- Recording adverse events and concomitant medication
- Compliance check

At the Safety Follow-up visit the following tests/procedures should be performed:

- Physical examination, including body height and weight measurement.
- Recording adverse events and concomitant medication
- Compliance check

11.3. Post-Study Procedure

After 4-10 days after the fourth treatment period.

- Questioning for and registration of adverse events.
- Medical history update (focusing to any changes since the screening examination and the last drug administration).
- Physical examination update (including blood pressure and heart rate after 5 minutes supine rest, ECG and body temperature measuring).
- Laboratory tests: haematology, blood chemistry and urinalysis (after 10 hours of fasting condition).

Phase 2, double-blind, parallel assignment, randomized, placebo-controlled study to evaluate the preventive effect of oral insulin formula on the development of T1D in high-risk young individuals through the induction of immunological tolerance

Clinically relevant deviations of laboratory parameters should be regarded as adverse events. Laboratory values outside the normal range repeatedly found as while screening, unaccompanied by symptoms and giving no indication of any pathological process, and therefore judged as clinically non-significant by the Principal Investigator will not be recorded as adverse events.

11.4. Safety assessments

Complete medical history will be obtained at screening and will include evaluation for past or present cardiovascular, respiratory, gastrointestinal, renal, hepatic, neurological, endocrine, lymphatic, haematologic, immunologic, dermatologic, psychiatric, genitourinary, drug, and surgical history or any other diseases or disorders.

All adverse events will be monitored and recorded throughout the whole study period.

12-lead ECGs (with measurement RR, PQ, QRS, QT and QTc), blood pressure (supine systolic and diastolic) and heart rate and body temperature will be monitored at screening, during the treatment period and at follow up.

Routine lab tests will be performed screening, during the treatment period and at follow up.

12. Determination of Safety

12.1. Definition

Adverse event (AE): any untoward medical occurrence in a patient or clinical trial subject administered a medicinal product and which does not necessarily have a causal relationship with this treatment.

Adverse reaction of an investigational medicinal product (AR): all untoward and unintended responses to an investigational medicinal product related to any dose administered.

Serious adverse event or adverse reaction (SAE, SAR): any untoward medical occurrence or effect that at any dose results in death, is life-threatening, requires hospitalisation or prolongation of existing hospitalisation, results in persistent or significant disability or incapacity, or is a congenital anomaly or birth defect. Additionally, based upon appropriate medical judgement, the adverse event can be regarded as serious if it may jeopardize the subject and may require medical or surgical intervention to prevent one of the other outcomes listed in the definition of serious.

Suspected Unexpected Serious Adverse Reaction (SUSAR): a serious adverse event judged by either the investigator or the sponsor as having reasonable causal relationship to the investigational medicinal product, with the nature or severity of which is not consistent with the investigators brochure. They are subject to expedited reporting.

12.2. Documentation and Reporting of adverse events

Reporting requirements from a clinical trial are described in 35/2005. Hungarian Ministerial decree and the 20/2001 EU Clinical Trial Directive.

12.2.1. Reporting procedure

12.2.1.1. The Investigator is responsible for:

Independently from the time of the next visit in case of adverse event the subject can revisit the investigator.

The starting point for the collection of AEs will be the time the subject signs the Informed Consent. All adverse events must be entered into the Case Report Form (CRF), whether or not they are considered to be drug-related. Signs and symptoms of each AE should be described in detail in the AE report form.

The investigator shall report any serious adverse events immediately (within 24 hours of the investigator's awareness) to the sponsor's representative and the Local Ethics Committee (IKEB). The immediate report shall be followed by detailed, written reports. The immediate and follow-up reports shall identify subjects by unique code numbers assigned to the latter. For reported deaths of a subject, the investigator shall supply the sponsor and the Ethics Committee with any additional information requested.

The Investigator will be requested to complete a separate SAE (Serious Adverse Event) Report Form form in addition to the information on the CRF.

In the event of unexplained or unexpected laboratory values abnormalities encountered during or after the study, the tests have to be repeated as soon as possible and followed up until the results turn to normal range and/or adequate explanation for abnormality is found.

Adverse events which are related or possibly related to the Investigational Medicinal Product(s) should be followed until recovery or a trend towards recovery becomes evident. All specialized medical interventions needed in case of such adverse events should be documented.

The investigator will clearly mark in the Case Report Form all laboratory findings outside the normal range and will indicate which of these deviations are clinically significant.

Only clinically significant laboratory findings should be recorded on the AE Registration Form.

12.2.1.2. The Sponsor is responsible for:

Serious adverse events

The sponsor shall report any serious, unexpected, suspected adverse reactions (SUSAR) to the competent authority (OGYÉI) and the Central Ethics Committee (ETT KFEB).

The sponsor ensures that all relevant information about suspected serious unexpected adverse reactions (SUSAR) that are fatal or life-threatening is reported to the OGYÉI and to the ETT KFEB, as soon as possible but no later than seven days after knowledge by the sponsor of such a case, and that relevant follow-up information is subsequently communicated within an additional eight days.

All other suspected serious unexpected adverse reactions shall be reported to the OGYÉI and to the ETT KFEB as soon as possible but within a maximum of fifteen days of first knowledge by the sponsor.

Once a year throughout the clinical trial, the sponsor shall provide OGYÉI and ETT KFEB with a listing of all suspected serious adverse reactions which have occurred over this period and a report of the subjects' safety.

Phase 2, double-blind, parallel assignment, randomized, placebo-controlled study to evaluate the preventive effect of oral insulin formula on the development of T1D in high-risk young individuals through the induction of immunological tolerance

The sponsor will keep detailed records about all serious adverse events reported by the Investigators at any time during the whole clinical period of the study. All records are to be submitted on request of the competent authority.

Non-serious adverse events

Non-serious adverse events will be recorded in the CRF and will be entered into clinical database after closing the clinical phase of the study.

The following table shows the reporting responsibility of the **Investigators**.

What	Reporting to	Timelines	Means
Serious adverse event /reaction (SAE / SAR)	<ul style="list-style-type: none"> ○ Sponsor ○ Local Ethics Committee 	Within 24 hours	Phone , fax, e-mail (following by a written confirmation on SAE report form)
Non-serious AE / AR	<ul style="list-style-type: none"> ○ Sponsor 	On the occasion of monitor visit	Detection in CRF

The following table shows the reporting responsibility of the **Sponsor**.

What	Reporting to	Timelines	Means
Serious suspected and unexpected adverse reaction (SUSAR) resulting in death or being life-threatening	<ul style="list-style-type: none"> ○ OGYÉI ○ ETT KFEB 	Within 7 calendar days Follow up report within 8 calendar day after 1 st report.	Fax or e-mail SAE form, to EMEA electronically.
Serious suspected and unexpected adverse reaction (SUSAR) which are not resulting in death or being life-threatening.	<ul style="list-style-type: none"> ○ OGYÉI ○ ETT KFEB 	Within 15 calendar days	Fax or e-mail SAE form, to EMEA electronically.
All serious suspected adverse reactions	<ul style="list-style-type: none"> ○ OGYÉI ○ ETT KFEB 	Once a year, or according to the authority's request	Written form in Line listing
Non-serious AE / AR	<ul style="list-style-type: none"> ○ OGYÉI 	At the end of the study	Final Report

12.2.2.

Documentation of adverse events

AE report form:

1. Date of AE reporting
2. Type of report:
 - Initial
 - Follow up
3. Verbatim of the event
4. Description of event.

Phase 2, double-blind, parallel assignment, randomized, placebo-controlled study to evaluate the preventive effect of oral insulin formula on the development of T1D in high-risk young individuals through the induction of immunological tolerance

5. Severity:
 - Mild: It does not affect the daily activity of the subject.
 - Moderate: Interfere with the daily activity of the subject.
 - Severe: Severely interfere with the daily activity of the subject or there is a need of complex treatment or hospitalization.
6. Onset time and date of AE,
7. Outcome:
 - Recovered without sequelae
 - Recovered with sequelae
 - Ongoing
 - Lost for follow up
 - Death
8. Offset time and date of AE,
9. Last date of administration of investigational product,
10. Dates of treatment
11. Criteria of seriousness:
 - Death
 - Life threatening
 - Involved or prolonged subject hospitalisation
 - Involved persistence of significant disability or incapacity
 - Congenital anomaly
 - Medically important
12. Seriousness:
 - Serious
 - Non serious
13. Relationship to investigational product:
 - Related: Reasonable temporal relation to study medication administration, AND cannot be reasonably explained by other factors (such as the subject's clinical state, concomitant therapy, and/or other interventions).
 - Possibly related: Relationship to study medication could not be ruled out.
 - Not related: Data are available to identify a clear alternative cause for the reaction.
14. Action taken to the investigational product:
 - there is no need to stop administration
 - there is a need to stop administration
 - protocol specific (tapering, reduction...)
15. Action taken due to AE:
 - 1 = None
 - 2 = Medication
 - 3 = Intervention
 - 4 = Medication and intervention
16. Need to follow-up:
 - no
 - yes
17. Comments

The criteria of seriousness are listed above (see section "Definition"). Additionally, based upon appropriate medical judgement, the adverse event can be regarded as serious if it may jeopardize the subject and may require medical or surgical intervention to prevent one of the other outcomes listed in the definition of serious.

Phase 2, double-blind, parallel assignment, randomized, placebo-controlled study to evaluate the preventive effect of oral insulin formula on the development of T1D in high-risk young individuals through the induction of immunological tolerance

Adverse events which are definitely or possibly related to the investigational medicinal product(s) should be followed until recovery or a trend towards recovery becomes evident. All specialized medical interventions needed in case of such adverse events should be documented.

12.3. *Validation, evaluation of adverse event reports*

Validation and evaluation of adverse event reports are pursued according to regulations and standard operating procedures of the sponsor.

12.4. *Coding dictionary*

Medical Dictionary for Regulatory Activities (MedDRA) will be used as coding dictionary. Serious AE(s) / AR(s) will be coded as soon as they will be recorded in safety database by sponsor. Non-serious AE(s) /AR(s) will be coded after ending the clinical phase of the study.

12.5. *Analysis of safety data*

Safety data from the clinical trial will be regularly overviewed by the sponsor during the clinical phase of the study.

All subjects who received at least one dose of study medication will be included in the final safety data analysis (including those who did not complete the study).

12.6. *Emergency Procedures*

Emergency equipment and drugs should be available within the clinical unit. In that case if emergency treatment would be necessary, the treatment, and the drugs used during the emergency should be documented.

12.7. *Clinical laboratory tests*

All clinical laboratory (safety) tests will be performed at the lab of study site. Sample volumes and sampling conditions are according to the local lab requirements. Details of reference ranges are provided in the Trial Master File. Any clinically relevant deviation of laboratory parameters should be regarded as adverse events and should be handled accordingly.

13. Quality Control and Quality Assurance

13.1. *Monitoring*

The purposes of trial monitoring are to verify the following:

- The rights and well-being of human subjects are protected.
- The reported trial data are accurate, complete and verifiable from source documents.
- The conduct of the trial is in compliance with the currently approved protocol/amendments, with GCP, and with the applicable regulatory requirements.

The Sponsor should ensure that the trial be adequately monitored. The Sponsor should determine the appropriate extent and nature of monitoring. Sponsor has to be informed about the state of the trial. Representatives of Sponsor may conduct visits also at suitable intervals throughout the trial.

It is the responsibility of the Investigator to assure that the study will be conducted in accordance with the protocol and the valid data are entered into the CRF. The Investigator will permit the representatives of the Sponsor to monitor the study as frequently as necessary to determine that data recording and protocol adherence are satisfactory. The CRFs and related documents will be reviewed in detail in accordance with Good Clinical Practice regulations.

The monitor in accordance with the Sponsor's requirements should ensure that the trial is conducted and documented properly by carrying out the following activities, when relevant and necessary:

- Verifying that the investigator has adequate qualification and resource and remain adequate throughout the trial period.
- Verifying if the study is conducted properly and complied with the Good Clinical Practice guidelines, the Helsinki Declaration and the applicable regulatory requirements.
- Verifying the compliance with the protocol
- Verifying if the CRFs are completed continuously and accurately and stored in accordance with the requirements.
- Verifying the registration of the investigational drug.
- Verifying the signed Informed Consent.
- Checking the source data with the data in the CRF.
- Verifying if the necessary documents are available.
- Verifying if the works described in protocol are accurately done.
- Inform the principal investigator and Sponsor about the perceptions.

13.2. Auditing

The purpose of Sponsor's audit, which is independent of and separate from routine monitoring or quality control functions, should be to evaluate trial conduct and compliance with the protocol, SOPs, GCP and applicable regulatory requirements.

14. REGULATORY AND ETHICAL ISSUES

14.1. Declaration of Helsinki

The study should be performed in accordance with the spirit and principles of the current revision of the Declaration of Helsinki (Fortaleza, Brazil, 2013).

14.2. Ethics Committee and Regulatory Authorities

Before the start of the study, the protocol and other appropriate documents must be submitted to the Medical Research Council Ethics Committee for Clinical Pharmacology (ETT-KFEB), as Independent Ethics Committee and the National Institute of Pharmacy (OGYÉI) as Regulatory Authority, for review and approval.

The trial should be conducted in compliance with the protocol.

If significant changes require a protocol amendment, the amendment has to be also submitted to the Regulatory Authority and Ethics Committee for review and approval. Non-significant changes that do not affect the conduct of the study or do not have a significant effect on the safety of the subjects or do not significantly reduce the scientific value of the trial, have to be submitted to the Ethics Committee and the Regulatory Authority for notification only.

It is the Principal Investigator's responsibility to get the approval of the leader of the institute. The leader of the institute declares that the investigational site is in possession of personal and material conditions for the study. The Principal Investigator informs the Local Ethics Committee about the study.

14.3. Information for Subjects and Informed Consent

Before the subject being admitted to the trial, she/he has consent to participate in the study, after that he has been given written and verbal information about the clinical study. These information forms, both the written and verbal should be clear to all. Neither the written, nor the verbal information should contain technical terms, and any formulation that causes the subject to waive or to appear to

Phase 2, double-blind, parallel assignment, randomized, placebo-controlled study to evaluate the preventive effect of oral insulin formula on the development of T1D in high-risk young individuals through the induction of immunological tolerance

waive any legal rights or that releases or appears to release the investigators, institute, the Sponsor or their agents from liability for negligence.

Information Sheets and Informed Consent can be used to confirm the subjects' consents to participate in the trial. After the subject have read the Information Sheet and got oral information about the trial, they confirm their participation in the study by signing and dating the Informed Consent. The Investigator has to sign and date the Information for Subjects and the Informed Consent too. By signing and dating the Case Report Form the Investigator states that the Informed Consent has been obtained. The original signed and dated Consent Forms will be kept and archived by the Principal Investigator. All subjects will receive both the signed Informed Consent Form and the Subjects Information Sheet.

To ensure the medical confidentiality and data protection the signed Informed Consent Forms remain with the Principal Investigator and must be archived in accordance with the current legislation after the study has been completed. The Investigator who is responsible for archiving of the Informed Consent Forms will allow inspection of these documents by the competent authority, the ethics committee and the sponsor's representatives.

14.4. Confidentiality

Subjects' identity data (name, date, and place of birth) should be handled strictly confidential. The Principal Investigator is responsible for preserve the identity data in Subject Identification Forms and takes care of that the data will not be available to any unauthorized person. Each subject gets a randomization number. For further protection of the identity data, only the subjects' initials and randomization numbers will appear on the Case Report Form (data sheet).

Laboratory findings and other source documents made at the investigational site will contain the full name of the subjects; these should be reached only by the investigator staff, the monitor and auditor on behalf of Sponsor, the inspector of the Regulatory Authorities and the ethics committee.

Other person can gain access to only the data written in the CRFs or originated form these documents. Rules related to the handling of the identity data are stated in the Subjects Information Sheet too.

15. DATA MANAGEMENT

15.1. Investigator's File

Investigator's File will be set up according to the latest guideline (ICH Topic E6 Note for Guidance on Good Clinical Practice CPMP/ICH/135/95).

15.2. Case Report Forms

These forms are used to transmit the information collected during the clinical trial to the Sponsor. Case Report Forms must be completed for each subject enrolled in this study. All Case Report Form must be legible and completed in black or blue ball point pen. The Investigators may enter corrections on original CRFs. Data should not be obliterated by blacking out, correction fluid or an eraser.

The examination findings should be written into the Case Report Form as soon as possible, at least on the day of the examination or on that day, when the investigator receives the findings. At all times the investigator has final responsibility for the accuracy and authenticity of all clinical and laboratory data entered in the CRFs.

The Principal Investigator has to review the Case Report Form for completeness and accuracy and has to sign and date it on the first page at the end of the study. Selected pages should be signed by an

Phase 2, double-blind, parallel assignment, randomized, placebo-controlled study to evaluate the preventive effect of oral insulin formula on the development of T1D in high-risk young individuals through the induction of immunological tolerance

investigator after filling in. These signatures serve to attest that data contained on the CRFs are true and have not been falsified.

The monitor and auditor will review the complete Case Report Forms against the subjects' medical records and verify that all data are complete and accurate.

Major corrections have to be justified.

Assurance of the completion, review and approval of all CRFs is the investigator's responsibility.

15.3. Archiving

The Screening LOG, the Subject Identification LOG, all Information for Subjects, Informed Consents, source documents (laboratory findings, case history), and copies of the CRFs, whether these CRFs are completed or not, should be archived in accordance with the current legislation at the investigational site.

The Sponsor archives all other documents (except Informed Consent Forms, and source documents) related to the study in accordance with the requirements of GCP guidelines and applicable regulatory requirements.

Any transfer of responsibilities for archiving should be documented.

15.4. Disclosure of information

Information concerning the study, patent applications, processes, scientific data or other pertinent information is confidential and remains the property of the sponsor. The investigator may use this information for the purposes of the study only.

It is understood by the investigator that the sponsor will use information developed in this clinical study in connection with the development of IMP, and therefore may disclose it as required to other clinical investigators and to regulatory agencies. In order to allow the use of the information derived from this clinical study, the investigator understands that he/she has an obligation to provide complete test results and all data developed during this study to the sponsor.

Verbal or written discussion of results prior to study completion and full reporting should only be undertaken with written consent from the sponsor.

16. Protocol Amendments and deviations

Anytime after the approval of the protocol (before, during, and after the start of the study) any amendment turns out to be necessary it should be done in written form by the completion of the form "Amendment of Approved Protocol".

If significant changes require a protocol amendment, the amendment has to be submitted to the Regulatory Authority for approval. Except for shifts regarding the quality of the investigational medicinal products and changes of administrative nature, the Regulatory Authority also should transmit the planned protocol amendments to the CEC for review and approval.

Minor changes, that do not affect the conduct of the study or do not have a significant effect on the safety of the subject's, do not imply changes of the Subject Information Leaflet, or do not significantly reduce the scientific value of the trial, do not need a re-submit to the Regulatory Authority for approval. These amendments will be sent to the Regulatory Authority only for information.

The approved amendment should be sent to everybody, who signed the original protocol; and they have to enclose it to the original protocol.

The Investigator should not implement any deviation from or changes of the protocol without agreement by the Sponsor and prior review and documented approval of the CEC and/or Regulatory Authority, except when necessary to eliminate an immediate hazard to trial subjects or when the changes involve only logistical or administrative aspects (e.g. changes of addresses).

Any deviation from the approved protocol should be regarded as protocol deviation. Any deviation will be recorded in the raw data of the study and covered in the final report.

As soon as possible, the implemented deviation or change, the reason for it and if appropriate, the proposed protocol amendment should be submitted to the

- Ethics Committee
- Sponsor for agreement and approval
- Competent Authorities.

17. Financial Aspects

Agreement on the amount and the methods of payment will be stated in a separate document signed and dated by the Sponsor and the study site.

The study is financed from Government grant No. TBD

18. Insurance

Subjects participating in the study will be duly insured for any study-related health deterioration for which the Sponsor is held legally liable.

The Sponsor will submit a copy of the certificate of insurance for the Trial Master File and the Investigator Site File of the study. This insurance, however, will be waived if the health deterioration is probably connected with the non-compliance of the subject or the professional misconduct of the study site personnel.

The subjects participating in the study can report their claim of damages in written form, directly to the Insurance Company mentioned above, or to the Principal Investigator, or to the Sponsor as soon as possible, but not later than 7 days after notice.

19. Clinical study report

The integrated study report will be prepared by Sponsor according to CPMP/ICH/137/95 (ICH Topic E 3) Structure and Content of Clinical Study Report. This report should include the results of efficacy and safety statistical reports.

20. Publication Policy

By signing this protocol the Principal Investigator agrees that the results of this study may be used for submission to national and/or international registration and supervisor authorities.

Inasmuch the principal investigator wants to write publication about the study, the manuscript of this publication should be handed over the Sponsor for approval. In this way the Sponsor can state whether the publication does or does not infringe patent or trade secret brake.

If the Sponsor initiates the publication or the expose of study results, he/she should notify the Principal Investigator and consider his/her professional opinion.

21. GENERAL REFERENCES

1. Declaration of Helsinki Adopted by the 18th WMA General Assembly, Helsinki, Finland, June 1964 and amended by the: 29th WMA General Assembly, Tokyo, Japan, October 1975, 35th WMA General Assembly, Venice, Italy, October 1983, 41st WMA General Assembly, Hong Kong, September 1989, 48th WMA General Assembly, Somerset West, Republic of South Africa, October 1996, 52nd WMA General Assembly, Edinburgh, Scotland, October 2000, 53rd WMA General Assembly, Washington DC, USA, October 2002 (Note of Clarification added), 55th WMA General Assembly, Tokyo, Japan, October 2004 (Note of Clarification added), 59th WMA General Assembly, Seoul, Republic of Korea, October 2008 and 64th WMA General Assembly, Fortaleza, Brazil, October 2013
2. ICH Topic E6R2. Guideline for Good Clinical Practice.
https://database.ich.org/sites/default/files/E6_R2_Addendum.pdf
3. 1997. évi XLVII tv. Az egészségügyről és a hozzájuk kapcsolódó személyes adatok kezeléséről és védelméről
4. 1997. évi CLIV. tv. Az egészségügyről
5. 35/2005 EüM rendelet Az emberi felhasználásra kerülő vizsgálati készítmények klinikai vizsgálatáról és a helyes klinikai gyakorlat alkalmazásáról
6. 2005. évi XCV. törvény Az emberi alkalmazásra kerülő gyógyszerekről és egyéb, a gyógyszerpiacot szabályozó törvények módosításáról
7. 235/2009. (X. 20.) Korm. rendelet az emberen végzett orvostudományi kutatások, az emberi felhasználásra kerülő vizsgálati készítmények klinikai vizsgálata, valamint az emberen történő alkalmazásra szolgáló, klinikai vizsgálatra szánt orvostechnikai eszközök klinikai vizsgálata engedélyezési eljárásának szabályairól
8. AZ EURÓPAI PARLAMENT ÉS A TANÁCS 2001/20/EK IRÁNYELVE az emberi felhasználásra szánt gyógyszerekkel végzett klinikai vizsgálatok során alkalmazandó helyes klinikai gyakorlat bevezetésére vonatkozó tagállami törvényi, rendeleti és közigazgatási rendelkezések közelítéséről
9. AZ EURÓPAI PARLAMENT ÉS A TANÁCS 536/2014/EU RENDELETE emberi felhasználásra szánt gyógyszerek klinikai vizsgálatairól és a 2001/20/EK irányelv hatályaon kívül helyezéséről
10. ICH Topic E3 Structure And Content Of Clinical Study Reports
https://database.ich.org/sites/default/files/E3_Guideline.pdf



Orális inzulin vakcina fejlesztése az I-es típusú diabétesz kialakulásának megelőzésére gyermekekben

Fázis II klinikai vizsgálati protokoll tervezet - gyermek

Debreceni Egyetem

GINOP-2.3.4-15-2016-00002

Trial Protocol

Protocol No: TBD
EudraCT Number: TBD
Phase: phase 2

Phase 2, double-blind, parallel assignment, randomized, placebo-controlled study to evaluate the preventive effect of oral insulin formula on the development of T1D in high-risk children and adolescents through the induction of immunological tolerance

This clinical trial protocol belongs to the University of Debrecen. The protocol is confidential and it can be applied in connection with this trial only. Application and reproduction of any part of this protocol anywhere is not allowed without written contribution of SPONSOR. Informing anybody, who is not involved in this trial, about the content of this protocol, is not allowed.

Sponsor: University of Debrecen
Address: H-4032 Debrecen, Egyetem tér 1., Hungary

Clinical Study Sites: 3-5 Departments of Diabetology in Hungary

Investigational medical products:
Oral insulin capsules
Matching placebo

State of protocol: Draft

Date: 20 November 2020

CONFIDENTIAL

Declaration and Signature of Persons Responsible for the Study

The Sponsor and investigator agree with the protocol and declare that they will carry out the study according to the protocol, current legislations, GCP guidelines as well as requirements of authorities. If any intentional change from the protocol turns out to be necessary the Sponsor and the Investigator should make an agreement on amendment of protocol in a written form.

Sponsor:

University of Debrecen
H-4032 Debrecen, Egyetem tér 1.,
Hungary

Responsible study supervisor:

Name/Signature

Date /dd.mmm.yyyy./

Clinical Study Sites:

3-5 Departments of Diabetology in
Hungary

Principal (coordinating)
investigator:

Name/Signature

Date /dd.mmm.yyyy./

Table of Contents

1. SYNOPSIS	5
2. STUDY FLOW CHART	8
3. ABBREVIATIONS AND ACRONYMS	9
4. GENERAL INFORMATION	10
5. RESPONSIBILITIES AND ADDRESSES	10
6. BACKGROUND AND RATIONALE	12
6.1. DESCRIPTION OF THE INVESTIGATIONAL DRUG: IMP	12
6.1.1. <i>Mode of action of IMP</i>	12
6.1.2. <i>Indications of (IMP):</i>	12
6.1.3. <i>Side effect profile of IMP</i>	12
6.1.4. <i>Pharmacokinetic profile of IMP</i>	12
6.2. RATIONALE FOR STUDY	13
6.3. REFERENCES RELEVANT TO THE BACKGROUND AND RATIONALE FOR THE STUDY	14
7. STUDY OBJECTIVE(S)	18
7.1. PRIMARY OBJECTIVE	18
7.2. SECONDARY OBJECTIVE	18
7.3. PRIMARY ENDPOINT	18
7.4. SECONDARY ENDPOINTS.....	18
8. STUDY POPULATION	18
8.1. SAMPLE SIZE	18
8.2. SELECTION OF STUDY POPULATION	18
8.3. SUBJECT RECRUITMENT PROCEDURES	18
8.4. SUBJECT INCLUSION CRITERIA	19
8.5. SUBJECT EXCLUSION CRITERIA	19
8.6. SUBJECT COMPLIANCE.....	19
8.7. SUBJECT WITHDRAWAL CRITERIA.....	19
8.8. REPLACEMENT OF DROP-OUTS	20
8.9. PREMATURE TERMINATION OF THE STUDY	20
9. STUDY DESIGN	21
9.1. ASSIGNMENT TO TREATMENTS AND RANDOMIZATION PROCEDURES	21
9.2. BLINDING	21
9.3. PROTOCOL ADHERENCE.....	21
9.4. STATISTICAL ANALYSIS.....	21
10. STUDY MEDICATION, DOSAGES AND DURATION OF TREATMENT	21
10.1. SUPPLY, PACKAGING AND LABELLING	21
10.2. STORAGE, HANDLING PROCEDURES, ACCOUNTABILITY	22
10.3. DETAILED DESCRIPTION OF STUDY MEDICATIONS	22
10.4. DOSAGE AND ADMINISTRATION	23
10.5. DURATION OF TREATMENT	23
10.6. CONCOMITANT THERAPY	23
11. STUDY PROCEDURES	23
11.1. SCREENING.....	23
11.2. STUDY PROCEDURES IN THE TREATMENT PERIOD	24
11.3. POST-STUDY PROCEDURE	24
11.4. SAFETY ASSESSMENTS.....	24

Phase 2, double-blind, parallel assignment, randomized, placebo-controlled study to evaluate the preventive effect of oral insulin formula on the development of T1D in high-risk children and adolescents through the induction of immunological tolerance

12. DETERMINATION OF SAFETY	25
12.1. DEFINITION	25
12.2. DOCUMENTATION AND REPORTING OF ADVERSE EVENTS	25
12.2.1. Reporting procedure	25
12.2.2. Documentation of adverse events	27
12.3. VALIDATION, EVALUATION OF ADVERSE EVENT REPORTS	28
12.4. CODING DICTIONARY	28
12.5. ANALYSIS OF SAFETY DATA	29
12.6. EMERGENCY PROCEDURES.....	29
12.7. CLINICAL LABORATORY TESTS.....	29
13. QUALITY CONTROL AND QUALITY ASSURANCE.....	29
13.1. MONITORING.....	29
13.2. AUDITING.....	30
14. REGULATORY AND ETHICAL ISSUES	30
14.1. DECLARATION OF HELSINKI.....	30
14.2. ETHICS COMMITTEE AND REGULATORY AUTHORITIES	30
14.3. INFORMATION FOR SUBJECTS AND INFORMED CONSENT.....	30
14.4. CONFIDENTIALITY.....	31
15. DATA MANAGEMENT	31
15.1. INVESTIGATOR'S FILE	31
15.2. CASE REPORT FORMS.....	31
15.3. ARCHIVING.....	31
15.4. DISCLOSURE OF INFORMATION.....	32
16. PROTOCOL AMENDMENTS AND DEVIATIONS.....	32
17. FINANCIAL ASPECTS	33
18. INSURANCE.....	33
19. CLINICAL STUDY REPORT.....	33
20. PUBLICATION POLICY	33
21. GENERAL REFERENCES	34

1. Synopsis

Name of the Sponsor/Company: University Debrecen	Study Code:
Name of the Investigational Product: Oral insulin formula	EudraCT No:
Development Phase of the Study: Phase II	
TITLE OF THE STUDY: Phase 2, double-blind, parallel assignment, randomized, placebo-controlled study to evaluate the preventive effect of oral insulin formula on the development of T1D in high-risk children and adolescents through the induction of immunological tolerance	
OBJECTIVES: Primary objective: Prevention of the development of T1D in high-risk young individuals. Secondary objective: Evaluation of the long-term efficacy and safety of oral insulin formula in young children with increased risk for the development of T1D.	
ENDPOINTS: Primary endpoint: The difference in the newly appearing T1D in the active ingredient and placebo treated groups. Secondary endpoints: Change in c-peptide level. Change in insulin autoantibody level. Insulin demand at the end of the treatment period.	
STUDY DESIGN: Phase 2, double-blind, parallel assignment, randomized, placebo-controlled study in children (6-18 years of age) with high-risk T1D defined by the presence of autoantibodies and impaired glucose tolerance. Subjects will be enrolled in 1:1 ratio into the active ingredient and placebo groups. Participants will take one capsule of active ingredient or placebo once per day. Fifty young adults with high-risk T1D are planned to be enrolled.	
TREATMENT DURATION: Treatment starts immediately after randomization. Treatment ends (whichever comes first): <ul style="list-style-type: none">• after two years• development of T1D Estimated study period: 2023-2026 The total maximum duration per patient is up to 25 months The study consists of minimum 11 visits: <ul style="list-style-type: none">• A screening and randomization visit on Day 0 and Day 1.	

Phase 2, double-blind, parallel assignment, randomized, placebo-controlled study to evaluate the preventive effect of oral insulin formula on the development of T1D in high-risk children and adolescents through the induction of immunological tolerance

- During the treatment period visits will be at the end of the 1., 3., 6., 9., 12., 15., 18., 21., 24. months.
- The Follow-up Visit will be performed 30 days after the End of Treatment Visit
- For individuals who discontinue the study early, all the assessments listed for the Early Discontinuation Visit as specified in the schedule of visits (End of Treatment) will be performed.

First patient in: Q2 2026

Last patient in: Q2 2028

Last patient out: Q4 2028

INVESTIGATIONAL MEDICINAL PRODUCT:

Name: Oral insulin formula

Active ingredient: insulin, Humulin R

Dose: 20 IU Humulin R + 300 mg Acepramin once daily (May be subject to change if the results of the Phase 1 and adult Phase 2 studies warrant it.)

Administration: oral

Formulation: capsule

Developed by: CeraMed Kft. / University of Debrecen

Manufactured by: Meditop Gyógyszeripari Kft.

Name: **Placebo**

Active ingredient: None

Daily Dose: 1 capsule once daily

Administration: oral

Formulation: capsule

Manufactured by: Meditop Gyógyszeripari Kft.

Investigational Medicinal Products will be taken with 100 ml water.

Storage: According to the Certificate of Analysis

STUDY POPULATIONS:

Fifty children/adolescents with anti-islet antibodies positivity (one of the antibodies is anti-insulin) and decreased glucose tolerance (GTT, 60 min PG:>8 mmol/l) aged 6-18 years.

NUMBER OF STUDY CENTRES:

3-5 study sites are envisaged in Hungary.

MAIN INCLUSION AND EXCLUSION CRITERIA:

Inclusion Criteria:

1. 6-18 years age
2. Presence of two anti-islet antibodies
3. Ability to comprehend and willingness of parents/guardians to sign statements of the Informed Consent Form. Giving informed assent is sought from the subjects themselves.

Exclusion criteria:

1. Pre-existing T1D
2. Any disease if the investigator considers that it can significantly influence the development of T1D.
3. Long-term steroid treatment.
4. Ongoing immunosuppressive or immunomodulator treatment
5. Cytostatic therapy
6. Any disease that can be negatively influenced by insulin treatment.

Study procedures

Screening after signing the ICF.

Personal data, medical history, physical examinations (height, weight, 12-lead ECG), vital signs (blood pressure, heart rate, temperature) and laboratory tests. (including: GTT, c-peptide, anti-islet antibody assay)

Randomization to treatment: 1:1 ratio receiving oral insulin formula or placebo respectively.

Blood samples:

The prescribed blood samples are drawn at the appropriate timepoints.

- Screening: 5 ml
- In every three months: glucose, c-peptide (capillary method)
- End of Treatment: 5 ml
- Total taken blood volume per patient: Up to 60 ml.

SAFETY ASSESSMENTS:

Clinical safety:

- physical examination
- 12 lead ECG
- Pulse rate, body temperature
- Concomitant medication
- Adverse Events

Laboratory Safety:

- Clinical chemistry
- Urinalysis
- Hematology

EFFICACY AND SAFETY VARIABLES:

Efficacy Variables:

- Appearance of T1D
- Blood glucose level
- C-peptide level
- Anti-islet autoantibody level

Safety Variables:

- Adverse Events
- Vital signs: pulse rate, body temperature

Sample size: Using a two-sided alpha level of 0.05, a total of 50 subjects is required to achieve 80% power if the change in the appearance T1D is 30%.

Statistical Analysis:

Statistical analysis will be described in a separate Statistical analysis Plan

This study will be conducted in compliance with GCP guidelines (CPMP/ICH/FDA).

2. Study Flow Chart

Visit	Screening	Rando- mization	Visit 2	Visit 3	Visit 4	Visit 5	Visit 6	Visit 7	Visit 8	Visit 9	End of treatment*	Follow- up
Study Day, Month	Day -1	Day 1	Month 1	Month 3	Month 6	Month 9	Month 12	Month 15	Month 18	Month 21	Month 24	Month 25
<i>Informed consent</i>	X											
<i>Inclusion/exclusion criteria</i>		X										
<i>Randomization</i>		X										
<i>Demography</i>	X											
<i>Medical History</i>	X											
<i>Concomitant Medication</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Physical examination</i>	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Height and Weight</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
<i>Vital signs</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
<i>12 lead ECG</i>	X						X				X	
<i>Blood sampling (routine labs)</i>	X				X		X		X		X	
<i>Urine sampling</i>	X				X		X		X		X	
<i>Blood sampling (Se insulin, C-peptide, islet antibodies)</i>	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	
<i>Pregnancy test (for female subjects only)</i>	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	
<i>IMP dispensation</i>		X		X	X	X	X	X	X	X		
<i>IMP return</i>				X	X	X	X	X	X	X	X	
<i>AE recording</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Subject compliance check</i>			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

- In case of early withdrawal an Early Termination Visit should be performed. The Early Termination Visit will be identical to the End-of-Treatment Visit

3. Abbreviations and Acronyms

AE	Adverse Event
ALP	Alkaline Phosphatase
ALT	Alanine amino transferase
ANOVA	Analysis of Variance
AST	Aspartate amino transferase
CEC	Central Ethics Committee
CK	Creatine phosphokinase
CRF	Case Report Form
ECG	Electrocardiography
FDA	Food and Drug Administration
GCP	Good Clinical Practice
GGT	Gamma glutamyl transpeptidase
GLP	Good Laboratory Practice
GMP	Good Manufacturing Practice
HbsAg	Hepatitis B surface antigen
HCV	Hepatitis C
HIV	Human immunodeficiency virus
ICH	International Council for Harmonization
IMP	Investigational Medical Product
ITT	Intention-to-treat
LDH	Lactate dehydrogenase
Max	Maximum
MCHC	Mean corpuscular haemoglobin concentration
MCV	Mean corpuscular volume
Min	Minimum
mmol/l	millimol(liter
OD	Once daily
PP	Per Protocol
SD	Standard deviation
SOP	Standard Operating Procedure
SAE	Serious Adverse Events
SUSAR	Suspected Unexpected Serious Adverse Reaction
SDV	Source document verification
TBD	To be defined (later)

4. General Information

Name and address of the Sponsor	University of Debrecen H-4032 Debrecen, Egyetem tér 1., Hungary ☎: (+36 1) TBD Fax. (+36 1)
Name and address of the clinical investigational site	TBD
Statistical evaluation	TBD
Safety data analysis	TBD
In case of adverse drug reaction should be informed	TBD
Estimated start of the study	Q1 2023 Q3 2026
Estimated end of the clinical part of the study	
Final report	Q1 2027

5. Responsibilities and Addresses

Sponsor

Study Supervisor: Name and address, phone, mail

Study Manager: Name and address, phone, mail

Monitor: Name and address, phone, mail

Drug Safety: Name and address, phone, mail

Safety analysis and Reporting

Safety data analysis:

Name and address, phone, mail

Author of Integrated Study Report:

Name and address, phone, mail

6. Background and rationale

6.1. Description of the Investigational Drug: IMP

6.1.1. Mode of action of IMP

Oral administration of insulin, i.e. absorption from the intestinal tract, has several benefits. The oral medicine avoids the risk of infection with frequent use of parenteral insulin. Oral drug compliance, as it is not unpleasant, is not painful is also superior to injectable treatment. During enteral absorption, insulin gets closer to the pathway of its physiological action, as first it enters the liver through the portal veins, and the highest insulin levels will not be observed at the periphery as it happens subcutaneous administration.

6.1.2. Indications of (IMP):

Diabetes mellitus (both Type 1 and Type 2) is a common illness affecting more and more people – both adults and children. One of the mainstays of diabetes therapy is insulin, known and used for over 100 years. The insulin, being a protein is not absorbed from the gastrointestinal tract intactly, thus it can be administered only parenterally (subcutaneously or intravenously). While this does not limit its use, an insulin preparation that could be administered orally offer huge advantage and increase patient compliance.

Another potential use of the oral insulin could be the prevention or at least delaying onset of Type 1 diabetes in children.

6.1.3. Side effect profile of IMP

At this stage of development human adverse event profile is unknown yet.

It can be expected that potential blood glucose lowering may occur with its linked side-effects (e.g. hypoglycaemia, weakness, feeling faint, feeling hungry, fainting), but at the doses administered in this study such events are unlikely.

Also, allergic reactions to all components of the preparations may be expected.

6.1.4. Pharmacokinetic profile of IMP

Absorption: IMP is rapidly absorbed. Available data show that 30' after administration of the oral insulin preparation the blood glucose levels are already decreasing.

Distribution: Oral insulin enters the circulation in a near-physiological way, and enters the liver in the portal system. Thus its distribution follows the physiological process.

Elimination: Elimination of the insulin also occurs by a physiological pattern.

Important and favourable feature of IMP is that no dose adjustment is necessary in liver or kidney diseases because due to its metabolism it does not cumulate.

Changes of pharmacokinetic properties under special circumstances (e.g. age, accompanying diseases): This was not examined in depth. Further clinical trials are necessary to define this aspect.

6.2. Rationale for study

Type 1 diabetes mellitus (T1DM) is one of the most common hormonal and metabolic diseases that occur in childhood. The main feature of the disease, i.e. elevated blood sugar levels, is caused by the destruction of insulin-producing β cells in the pancreatic islets of Langerhans (1). In the vast majority of cases, the death and loss of function of β cells is caused by the autoimmune process against β cells. The cause of β -cell death in a small proportion of patients is unknown (2). The incidence of T1DM is increasing by 2-3% per year worldwide, with growth even faster in the under-5 age group (3).

Figure 1 illustrates the incidence and prevalence of childhood T1DM worldwide.

Figure 1. Incidence and prevalence of childhood T1DM worldwide

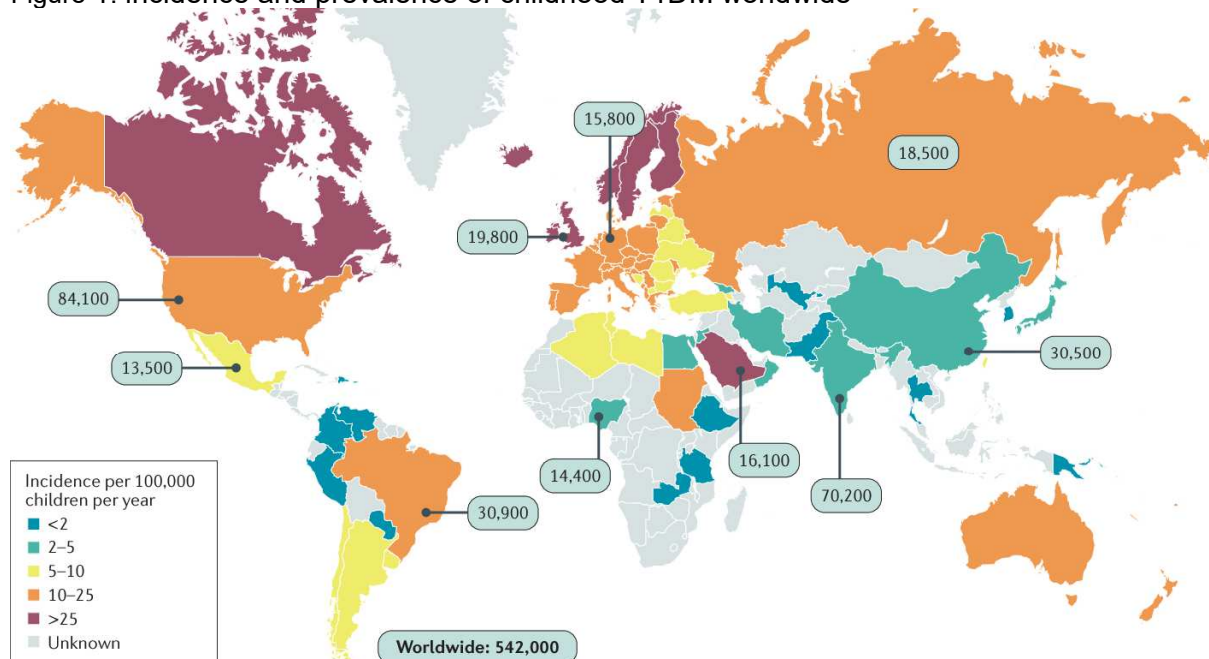


Figure 2 | The incidence and prevalence of T1DM in children. The estimated number of new cases of type 1

The direct cause of autoantibody production is not precisely known, an essential prerequisite is the antigen presentation by dendritic cells and the interaction of B cells with antigen-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells.

Treating T1DM requires an interdisciplinary approach, and collaboration between physician, dietitian, psychologist, patient, parents, and environment is essential to success. The goal of treatment is to maintain a long-term glycemic balance in a healthy lifestyle and to avoid severe hypoglycemic and hyperglycemic ketoacidosis. From the third stage of the disease, continuous insulin treatment is essential due to severe insufficiency of endogenous insulin production.

Since the mid-1970s, a number of open-label, uncontrolled studies have aimed to maintain or increase the amount and insulin-producing capacity of residual insulin-producing β cells through inhibition of the autoimmune process.

A new procedure to prevent the development of the disease has been started in the last few years. In a mouse model the chronic administration of oral insulin significantly decreased the incidence of Type 1 diabetes.

Given the autoimmune origin of the disease, the procedure attempts to desensitize the patient's body by an analogy to allergic diseases, which is also an abnormal immune response. In doing so, different amounts of insulin (oral insulin therapy) were given orally to at-risk children.

The aim of the current drug development is an oral insulin preparation that can be used in the everyday clinical practice.

6.3. References relevant to the background and rationale for the study

1. Eisenbarth GS. Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. *N Engl J Med*. 1986;314(21):1360-8.
2. American Diabetes A. (2) Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes Care*. 2015;38 Suppl:S8-S16.
3. Chobot A, Polanska J, Brandt A, Deja G, Glowinska-Olszewska B, Pilecki O, et al. Updated 24-year trend of Type 1 diabetes incidence in children in Poland reveals a sinusoidal pattern and sustained increase. *Diabet Med*. 2017;34(9):1252-8.
4. Diaz-Valencia PA, Bougneres P, Valleron AJ. Global epidemiology of type 1 diabetes in young adults and adults: a systematic review. *BMC Public Health*. 2015;15:255.
5. Rawshani A, Landin-Olsson M, Svensson AM, Nystrom L, Arnqvist HJ, Bolinder J, et al. The incidence of diabetes among 0-34 year olds in Sweden: new data and better methods. *Diabetologia*. 2014;57(7):1375-81.
6. Thomas NJ, Jones SE, Weedon MN, Shields BM, Oram RA, Hattersley AT. Frequency and phenotype of type 1 diabetes in the first six decades of life: a cross-sectional, genetically stratified survival analysis from UK Biobank. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2018;6(2):122-9.
7. Zhang R, Cai XL, Liu L, Han XY, Ji LN. Type 1 diabetes induced by immune checkpoint inhibitors. *Chin Med J (Engl)*. 2020;133(21):2595-8.
8. Cooper JD, Howson JM, Smyth D, Walker NM, Stevens H, Yang JH, et al. Confirmation of novel type 1 diabetes risk loci in families. *Diabetologia*. 2012;55(4):996-1000.
9. Redondo MJ, Jeffrey J, Fain PR, Eisenbarth GS, Orban T. Concordance for islet autoimmunity among monozygotic twins. *N Engl J Med*. 2008;359(26):2849-50.
10. Redondo MJ, Geyer S, Steck AK, Sharp S, Wentworth JM, Weedon MN, et al. A Type 1 Diabetes Genetic Risk Score Predicts Progression of Islet Autoimmunity and Development of Type 1 Diabetes in Individuals at Risk. *Diabetes Care*. 2018;41(9):1887-94.
11. Erlich HA, Valdes AM, McDevitt SL, Simen BB, Blake LA, McGowan KR, et al. Next generation sequencing reveals the association of DRB3*02:02 with type 1 diabetes. *Diabetes*. 2013;62(7):2618-22.
12. Krischer JP, Lynch KF, Schatz DA, Ilonen J, Lernmark A, Hagopian WA, et al. The 6 year incidence of diabetes-associated autoantibodies in genetically at-risk children: the TEDDY study. *Diabetologia*. 2015;58(5):980-7.
13. Polychronakos C, Li Q. Understanding type 1 diabetes through genetics: advances and prospects. *Nat Rev Genet*. 2011;12(11):781-92.
14. Hayter SM, Cook MC. Updated assessment of the prevalence, spectrum and case definition of autoimmune disease. *Autoimmun Rev*. 2012;11(10):754-65.
15. Hyoty H. Viruses in type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes*. 2016;17 Suppl 22:56-64.
16. Knip M, Virtanen SM, Akerblom HK. Infant feeding and the risk of type 1 diabetes. *Am J Clin Nutr*. 2010;91(5):1506s-13s.
17. Rešić Lindehammer S, Honkanen H, Nix WA, Oikarinen M, Lynch KF, Jönsson I, et al. Seroconversion to islet autoantibodies after enterovirus infection in early pregnancy. *Viral Immunol*. 2012;25(4):254-61.
18. Taplin CE, Barker JM. Autoantibodies in type 1 diabetes. *Autoimmunity*. 2008;41(1):11-8.
19. Savola K, Bonifacio E, Sabbah E, Kulmala P, Vähäsalo P, Karjalainen J, et al. IA-2 antibodies--a sensitive marker of IDDM with clinical onset in childhood and adolescence. *Childhood Diabetes in Finland Study Group*. *Diabetologia*. 1998;41(4):424-9.
20. Ziegler AG, Rewers M, Simell O, Simell T, Lempainen J, Steck A, et al. Seroconversion to multiple islet autoantibodies and risk of progression to diabetes in children. *Jama*. 2013;309(23):2473-9.

Phase 2, double-blind, parallel assignment, randomized, placebo-controlled study to evaluate the preventive effect of oral insulin formula on the development of T1D in high-risk children and adolescents through the induction of immunological tolerance

21. Mao RF, Chen YY, Zhang J, Chang X, Wang YF. Type 1 diabetes mellitus and its oral tolerance therapy. *World J Diabetes*. 2020;11(10):400-15.
22. Katsarou A, Gudbjörnsdottir S, Rawshani A, Dabelea D, Bonifacio E, Anderson BJ, et al. Type 1 diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17016.
23. Oling V, Reijonen H, Simell O, Knip M, Ilonen J. Autoantigen-specific memory CD4+ T cells are prevalent early in progression to Type 1 diabetes. *Cell Immunol*. 2012;273(2):133-9.
24. McLaughlin RJ, Spindler MP, van Lummel M, Roep BO. Where, How, and When: Positioning Posttranslational Modification Within Type 1 Diabetes Pathogenesis. *Curr Diab Rep*. 2016;16(7):63.
25. Babon JA, DeNicola ME, Blodgett DM, Crèvecoeur I, Buttrick TS, Maehr R, et al. Analysis of self-antigen specificity of islet-infiltrating T cells from human donors with type 1 diabetes. *Nat Med*. 2016;22(12):1482-7.
26. Burrack AL, Martinov T, Fife BT. T Cell-Mediated Beta Cell Destruction: Autoimmunity and Alloimmunity in the Context of Type 1 Diabetes. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017;8:343.
27. Lampeter EF, McCann SR, Kolb H. Transfer of diabetes type 1 by bone-marrow transplantation. *Lancet*. 1998;351(9102):568-9.
28. Rodriguez-Calvo T, Richardson SJ, Pugliese A. Pancreas Pathology During the Natural History of Type 1 Diabetes. *Curr Diab Rep*. 2018;18(11):124.
29. 5. Glycemic Targets. *Diabetes Care*. 2016;39 Suppl 1:S39-46.
30. Rewers A, Klingensmith G, Davis C, Petitti DB, Pihoker C, Rodriguez B, et al. Presence of diabetic ketoacidosis at diagnosis of diabetes mellitus in youth: the Search for Diabetes in Youth Study. *Pediatrics*. 2008;121(5):e1258-66.
31. Nathan DM. The diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications study at 30 years: overview. *Diabetes Care*. 2014;37(1):9-16.
32. Skyler JS. Immune intervention for type 1 diabetes mellitus. *Int J Clin Pract Suppl*. 2011(170):61-70.
33. Cyclosporin-induced remission of IDDM after early intervention. Association of 1 yr of cyclosporin treatment with enhanced insulin secretion. The Canadian-European Randomized Control Trial Group. *Diabetes*. 1988;37(11):1574-82.
34. Herold KC, Hagopian W, Auger JA, Poumian-Ruiz E, Taylor L, Donaldson D, et al. Anti-CD3 monoclonal antibody in new-onset type 1 diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 2002;346(22):1692-8.
35. Pescovitz MD, Greenbaum CJ, Krause-Steinrauf H, Becker DJ, Gitelman SE, Goland R, et al. Rituximab, B-lymphocyte depletion, and preservation of beta-cell function. *N Engl J Med*. 2009;361(22):2143-52.
36. Atkinson MA, Roep BO, Posgai A, Wheeler DCS, Peakman M. The challenge of modulating β -cell autoimmunity in type 1 diabetes. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2019;7(1):52-64.
37. Campbell-Thompson M, Fu A, Kaddis JS, Wasserfall C, Schatz DA, Pugliese A, et al. Insulinitis and β -Cell Mass in the Natural History of Type 1 Diabetes. *Diabetes*. 2016;65(3):719-31.
38. Wasserfall C, Nick HS, Campbell-Thompson M, Beachy D, Haataja L, Kusmartseva I, et al. Persistence of Pancreatic Insulin mRNA Expression and Proinsulin Protein in Type 1 Diabetes Pancreata. *Cell Metab*. 2017;26(3):568-75.e3.
39. Bonifacio E, Ziegler AG, Klingensmith G, Schober E, Bingley PJ, Rottenkolber M, et al. 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):1541-9.
40. Rezende RM, Weiner HL. History and mechanisms of oral tolerance. *Semin Immunol*. 2017;30:3-11.
41. Knoop KA, Miller MJ, Newberry RD. Transepithelial antigen delivery in the small intestine: different paths, different outcomes. *Curr Opin Gastroenterol*. 2013;29(2):112-8.
42. Niess JH, Brand S, Gu X, Landsman L, Jung S, McCormick BA, et al. CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science*. 2005;307(5707):254-8.

Phase 2, double-blind, parallel assignment, randomized, placebo-controlled study to evaluate the preventive effect of oral insulin formula on the development of T1D in high-risk children and adolescents through the induction of immunological tolerance

43. Tordesillas L, Berin MC. Mechanisms of Oral Tolerance. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2018;55(2):107-17.
44. Krischer JP, Lynch KF, Schatz DA, Ilonen J, Lernmark Å, Hagopian WA, et al. The 6 year incidence of diabetes-associated autoantibodies in genetically at-risk children: the TEDDY study. *Diabetologia*. 2015;58(5):980-7.
45. Carel JC, Bougnères P, Vardi P. Suppression of diabetes in nonobese diabetic mice by oral administration of porcine insulin. *J Endocrinol Invest*. 1994;17(7):573-80.
46. Bresson D, Togher L, Rodrigo E, Chen Y, Bluestone JA, Herold KC, et al. Anti-CD3 and nasal proinsulin combination therapy enhances remission from recent-onset autoimmune diabetes by inducing Tregs. *J Clin Invest*. 2006;116(5):1371-81.
47. Raab J, Haupt F, Scholz M, Matzke C, Warncke K, Lange K, et al. Capillary blood islet autoantibody screening for identifying pre-type 1 diabetes in the general population: design and initial results of the Fr1da study. *BMJ Open*. 2016;6(5):e011144.
48. Wan X, Unanue ER. Unique features in the presentation of insulin epitopes in autoimmune diabetes: an update. *Curr Opin Immunol*. 2017;46:30-7.
49. Zhang ZJ, Davidson L, Eisenbarth G, Weiner HL. Suppression of diabetes in nonobese diabetic mice by oral administration of porcine insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(22):10252-6.
50. Pham MN, Gibson C, Rydén AK, Perdue N, Boursalian TE, Pagni PP, et al. Oral insulin (human, murine, or porcine) does not prevent diabetes in the non-obese diabetic mouse. *Clin Immunol*. 2016;164:28-33.
51. Pozzilli P, Pitocco D, Visalli N, Cavallo MG, Buzzetti R, Crinò A, et al. No effect of oral insulin on residual beta-cell function in recent-onset type 1 diabetes (the IMDIAB VII). *IMDIAB Group. Diabetologia*. 2000;43(8):1000-4.
52. Chaillous L, Lefèvre H, Thivolet C, Boitard C, Lahlou N, Atlan-Gepner C, et al. Oral insulin administration and residual beta-cell function in recent-onset type 1 diabetes: a multicentre randomised controlled trial. *Diabète Insuline Orale group. Lancet*. 2000;356(9229):545-9.
53. Pozzilli P, Gisella Cavallo M. Oral insulin and the induction of tolerance in man: reality or fantasy? *Diabetes Metab Res Rev*. 2000;16(5):306-7.
54. Skyler JS, Krischer JP, Wolfsdorf J, Cowie C, Palmer JP, Greenbaum C, et al. Effects of oral insulin in relatives of patients with type 1 diabetes: The Diabetes Prevention Trial--Type 1. *Diabetes Care*. 2005;28(5):1068-76.
55. Krischer JP, Schatz DA, Bundy B, Skyler JS, Greenbaum CJ. Effect of Oral Insulin on Prevention of Diabetes in Relatives of Patients With Type 1 Diabetes: A Randomized Clinical Trial. *Jama*. 2017;318(19):1891-902.
56. Makino S, Kunimoto K, Muraoka Y, Mizushima Y, Katagiri K, Tochino Y. Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Jikken Dobutsu*. 1980;29(1):1-13.
57. Racine JJ, Stewart I, Ratiu J, Christianson G, Lowell E, Helm K, et al. Improved Murine MHC-Deficient HLA Transgenic NOD Mouse Models for Type 1 Diabetes Therapy Development. *Diabetes*. 2018;67(5):923-35.
58. Xu H, Wang B, Ono M, Kagita A, Fujii K, Sasakawa N, et al. Targeted Disruption of HLA Genes via CRISPR-Cas9 Generates iPSCs with Enhanced Immune Compatibility. *Cell Stem Cell*. 2019;24(4):566-78.e7.
59. Mordes JP, Bortell R, Blankenhorn EP, Rossini AA, Greiner DL. Rat models of type 1 diabetes: genetics, environment, and autoimmunity. *Ilar j*. 2004;45(3):278-91.
60. Furman BL. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Curr Protoc Pharmacol*. 2015;70:5.47.1-5..20.
61. Nelson RW, Reusch CE. Animal models of disease: classification and etiology of diabetes in dogs and cats. *J Endocrinol*. 2014;222(3):T1-9.

Phase 2, double-blind, parallel assignment, randomized, placebo-controlled study to evaluate the preventive effect of oral insulin formula on the development of T1D in high-risk children and adolescents through the induction of immunological tolerance

62. Wong FS, Visintin I, Wen L, Flavell RA, Janeway CA, Jr. CD8 T cell clones from young nonobese diabetic (NOD) islets can transfer rapid onset of diabetes in NOD mice in the absence of CD4 cells. *J Exp Med.* 1996;183(1):67-76.
63. Serreze DV, Fleming SA, Chapman HD, Richard SD, Leiter EH, Tisch RM. B lymphocytes are critical antigen-presenting cells for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol.* 1998;161(8):3912-8.
64. Abiru N, Yu L, Miao D, Maniatis AK, Liu E, Moriyama H, et al. Transient insulin autoantibody expression independent of development of diabetes: comparison of NOD and NOR strains. *J Autoimmun.* 2001;17(1):1-6.
65. Bowman MA, Leiter EH, Atkinson MA. Prevention of diabetes in the NOD mouse: implications for therapeutic intervention in human disease. *Immunol Today.* 1994;15(3):115-20.
66. Tisch R, McDevitt H. Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell.* 1996;85(3):291-7.
67. Thébault-Baumont K, Dubois-Laforgue D, Krief P, Briand JP, Halbout P, Vallon-Geoffroy K, et al. Acceleration of type 1 diabetes mellitus in proinsulin 2-deficient NOD mice. *J Clin Invest.* 2003;111(6):851-7.
68. Elso CM, Scott NA, Mariana L, Masterman EI, Sutherland APR, Thomas HE, et al. Replacing murine insulin 1 with human insulin protects NOD mice from diabetes. *PLoS One.* 2019;14(12):e0225021.
69. Mao R, Chen Y, Wu Q, Zhang T, Diao E, Wu D, et al. Oral delivery of single-chain insulin (SCI-59) analog by bacterium-like particles (BLPs) induces oral tolerance and prevents autoimmune diabetes in NOD mice. *Immunol Lett.* 2019;214:37-44.
70. Shehadeh N, Weis R, Teninboum G, Benderly A, Etzioni A, Shamir R. The influence of oral insulin on the development of autoimmune diabetes in NOD mice fed a hypoallergenic diet. *Diabetes Nutr Metab.* 2004;17(1):1-5.
71. Peppia M, He C, Hattori M, McEvoy R, Zheng F, Vlassara H. Fetal or neonatal low-glycotoxin environment prevents autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes.* 2003;52(6):1441-8.
72. Brezar V, Culina S, Gagnerault MC, Mallone R. Short-term subcutaneous insulin treatment delays but does not prevent diabetes in NOD mice. *Eur J Immunol.* 2012;42(6):1553-61.
73. Atkinson MA, Maclaren NK, Luchetta R. Insulinitis and diabetes in NOD mice reduced by prophylactic insulin therapy. *Diabetes.* 1990;39(8):933-7.

7. STUDY OBJECTIVE(S)

7.1. Primary objective

Prevention of the development of T1D in high-risk children/adolescents.

7.2. Secondary objective

Evaluation of the long-term efficacy and safety of oral insulin formula in children/adolescents with increased risk for the development of T1D..

7.3. Primary endpoint

- The difference in the newly appearing T1D in the active ingredient and placebo treated groups.

7.4. Secondary endpoints

- Change in c-peptide level.
- Change in insulin autoantibody level.
- Insulin demand at the end of the treatment period.

8. STUDY POPULATION

8.1. Sample size

50 eligible children and adolescents (6-18 years of age) will be enrolled into the study. (Drop-outs will not be replaced.)

8.2. Selection of study population

There will be three subject populations defined for the study:

- The full analysis set is defined to be as close to the idea of including all randomized subjects (by intention-to-treat principle, ITT). Subjects will be excluded from the full analysis set for the following reasons:
 - Failing to satisfy major entry criteria
 - Failing to take at least one dose of the study medication
 - Lack of any data post randomization
- The per-protocol (PP) population will include all randomized subjects who were included in the ITT and who completed the 3 treatment periods according to the protocol. Subjects will be excluded from the PP set for the following reasons:
 - Failing to satisfy full analysis set criteria
 - Presence of a major protocol violation
 - Pharmacokinetic target parameters not available for any of the periods.
- The safety population will include all randomized subjects who received at least one dose of study medication.

8.3. Subject recruitment procedures

Subjects will be recruited from the patient population of the study sites. Study sites may also receive referrals from other departments/physicians.

Potential male and female subjects will be screened for eligibility within 14 days after given written informed consent. Screening will consist of demographic data, medical and medication histories,

Phase 2, double-blind, parallel assignment, randomized, placebo-controlled study to evaluate the preventive effect of oral insulin formula on the development of T1D in high-risk children and adolescents through the induction of immunological tolerance

physical examination, body measurements (height, weight, BMI, body temperature), vital signs, 12 lead ECG, clinical laboratory safety tests (haematology, biochemistry, urinalysis, HBsAg, anti-HCV and HIV I & II), efficacy tests (se insulin, C-peptide, islet antibodies).

A person is considered eligible if the results of the screening test meet all the inclusion and none of the exclusion criteria

Any laboratory value outside the normal range could generally not be regarded as an exclusion criterion provided that:

- they were not accompanied by clinical symptoms, and
- the context of related laboratory values gave no indication of pathological process, and
- the Investigator classified them as clinically irrelevant in written form in the CRF.

8.4. Subject inclusion criteria

Subjects enrolled in this study will be patients identified by and/or referred to the clinical study sites. They must meet all of the following criteria in order to be included in the study:

- 6-18 years age
- Presence of two anti-islet antibodies
- Ability to comprehend and willingness of parents/guardians to sign statements of the Informed Consent Form. Giving informed assent is sought from the subjects themselves.

8.5. Subject exclusion criteria

Subjects to whom any of the following applies will be excluded from the study:

- Pre-existing T1D
- Any disease if the investigator considers that it can significantly influence the development of T1D.
- Long-term steroid treatment.
- Ongoing immunosuppressive or immunomodulator treatment
- Cytostatic therapy
- Any disease that can be negatively influenced by insulin treatment.

8.6. Subject compliance

The study will be run on outpatient base. Subject compliance will be checked by the study team during study visits.

8.7. Subject withdrawal criteria

In accordance with the Declaration of Helsinki and the applicable regulatory requirements, the subject involved in the study can withdraw his consent at any time without giving any reason, and it should not be announced in written form. It is sufficient to inform the investigator about his decision orally.

Subjects may be withdrawn for the following reason:

- at their own request with or without giving reasons,
- at the discretion of the Investigator for reason of medical prudence,
- at the proposal of the Sponsor.

The principal investigator or the institutional ethics committee should initiate the withdrawal in the following cases:

- If circumstances defined as exclusion criteria are registered.

Phase 2, double-blind, parallel assignment, randomized, placebo-controlled study to evaluate the preventive effect of oral insulin formula on the development of T1D in high-risk children and adolescents through the induction of immunological tolerance

- Onset of any disease demanding any medicinal treatment during the study period, which can influence the validation of the results, even if any relationship between the illness and the study treatment seems not to be likely.
- In cases of adverse events that are dangerous to the health of the subject.
- If the subject does not cooperate with the investigator, and does not comply with the regulations prescribed in Subjects' Information Sheet.
- If personal circumstances suggest that the visits required by the protocol cannot be guaranteed any longer.
- In case of serious protocol deviation.

Each subject being withdrawn should undergo a complete final examination within one week after the withdrawal with regard to the subject's health conditions and for safety aspects.

In case of any withdrawal from the study (whether voluntary or not) the Sponsor should be immediately notified. The date and reason of withdrawal should be clearly stated in the subject's CRF.

The Sponsor should also be immediately consulted / notified in the following cases:

- Vomiting within $2 \times t_{\max}$ of the active ingredients (namely within 2 hours after drug administration).
- Protocol violations which are potentially serious, and thus being potential reasons to withdraw the subjects from the trial.
- Concomitant medication or other events which can influence the authenticity of data collected throughout the study.
- Serious adverse events, whether expected or unexpected.

8.8. Replacement of Drop-outs

Subjects being withdrawn will not be replaced

8.9. Premature Termination of the Study

If the study sponsor or the Principal Investigator discovers conditions arising during the study which indicate that the clinical investigation should be stopped, the study can be terminated after appropriate consultation among the study sponsor and the Principal Investigator.

In addition, conditions which may warrant study termination include, but not limited to the following:

- Unexpected and significant or unacceptable risks for the subjects are revealed during the study.
- The sponsor's decision to suspend or discontinue the trial for administrative or other reason.

If a trial is prematurely terminated or suspended, the sponsor has to inform promptly the investigators, the authorities and the EC of the termination or suspension and the reason(s) for the termination or suspension.

If premature termination of the study is unavoidable, investigators must take measures to safeguard the interests of the included subjects.

Premature termination does not affect the documentation responsibilities of the investigator and the sponsor.

9. Study design

Phase 2, double-blind, parallel assignment, randomized, placebo-controlled study on children and adolescents (6-18 years of age) with high-risk T1D defined by the presence of autoantibodies and impaired glucose tolerance.

Subjects will be enrolled in 1:1 ratio into the active ingredient and placebo groups.

9.1. Assignment to treatments and randomization procedures

The randomization scheme will be prepared by the study statistician. Subject codes will be made available to the investigators in individual closed envelopes, showing only the treatment number on the outside. Following admission to the study, subjects will be assigned the next available treatment number. Instructions for code breaking will be provided to the Investigators.

9.2. Blinding

In the event of a medical emergency when management of a subject's condition requires knowledge of the trial medication, the sealed "code-break" envelope provided may be opened to determine the nature of the trial medication dispensed. If possible, such emergencies should be discussed with Sponsor's representative prior to disclosure of the treatment allocation.

Reasons for breaking a code must be clearly explained and justified in the CRF. The date on which the code was broken together with the identity of the person responsible must also be documented.

9.3. Protocol adherence

The protocol must be read thoroughly and the instructions followed exactly. Any intentional change should be agreed by both the Sponsor and the Investigator, with the appropriate written and approved protocol amendments made to reflect the changes agreed upon. Where the change occurs for the wellbeing of the subject, the Sponsor must be informed of the action.

9.4. Statistical analysis

The statistical analysis methods will be described in a separate Statistical Analysis Plan

Individual and summary blood pressures, heart rate, ECG parameters, and clinical laboratory data will be presented in tabular form with mean, median, standard deviation and range (min and max) as appropriate.

For the laboratory safety data, out of range values will be flagged in the data listings and a list of clinically significantly abnormal values will be presented.

Adverse events will be tabulated and summarised according to the current version of Medical Dictionary for Regulatory Activities (MedDRA).

10. STUDY MEDICATION, DOSAGES AND DURATION OF TREATMENT

10.1. Supply, packaging and labelling

The study medications will be produced and packaged by an appropriate GMP-compliant facility selected by the Sponsor.

Phase 2, double-blind, parallel assignment, randomized, placebo-controlled study to evaluate the preventive effect of oral insulin formula on the development of T1D in high-risk children and adolescents through the induction of immunological tolerance

Individual subject study medications will be packaged in bottles for each subject and each study period separately according to the randomization list.

Analytical certificates with the batch numbers will be attached to the study medications. Study medications should be released before transport to the clinical study site by a Qualified Person.

Labelling instructions (in Hungarian):

- Name, address of the sponsor;
- The batch and/or code number to identify the contents and packaging operation,
- Dosage and administration as detailed in Section 10.4
- Investigator's name, phone,
- Study code number,
- Expiry date,
- Storage conditions,
- "For clinical trial use only",
- Subject identification number,
- Name and formula of the study medication,
- Name and strength of the active ingredient,
- Study period number,

10.2. Storage, handling procedures, accountability

All study medication will be stored as stated in the Certificate of Analysis.

No special procedures for the safe handling of the medication are required.

The Investigator will dispense the study medication only to subjects included in the study, by following the procedure set in this protocol. It is forbidden to use the study medication for any other purpose.

The sponsor will be permitted upon request to audit the supply storage and dispensing procedures and records.

All unused supplies of study medication will be returned to SPONSOR., at the end of the study. Copies of the study drug accountability record will be provided to the sponsor.

10.3. Detailed description of study medications

Name:	IMP capsule 20 NE
Formulation:	Capsule (If possible, formulation in small size capsule to suit the subject population)
Manufacturer:	TBD
Active ingredient:	Insulin humanum
Unit dose:	20 NE
Mode of administration:	Oral
Regimen:	See Section 10.4
Batch number:	See the Certificate of Analysis
Expiry date:	See the Certificate of Analysis
Storage conditions:	As stated in the Certificate of Analysis

Name:	Placebo capsule
Formulation:	Capsule
Manufacturer:	TBD
Active ingredient:	No active ingredient
Unit dose:	N/A
Mode of administration:	Oral
Regimen:	See Section 10.4
Batch number:	See the Certificate of Analysis
Expiry date:	See the Certificate of Analysis
Storage conditions:	As stated in the Certificate of Analysis

10.4. Dosage and administration

During the study patients are expected to take one capsule (containing oral insulin preparation or placebo) once daily with approx. 200 ml tap water. Subjects are encouraged to take their daily medication preferably at the same time each day.

In case the subject forgets taking a daily dose, he/she may take it within 4 hours to nominal intake time. If the elapsed time is longer than 4 hours, the dose should not be taken, and routine administration should resume the next day.

10.5. Duration of treatment

Treatment will last up to 24 months

10.6. Concomitant therapy

Any drugs taken routinely prior to the study may be continued with the approval of the Investigator. Any new drug treatments (including over-the-counter preparations, vitamins and dietary supplements) may only be started with the prior approval of the Investigator.

11. STUDY PROCEDURES

Prior to participation in the trial, the parents/guardians of each subject should give his/her consent to participate by signing and dating the informed consent form. Also, the informed assent of the subjects need to be actively asked for. The investigator should not undertake any investigations specifically required only for the clinical study until valid consent had been obtained.

The screening examination will be carried out not more than 1 week prior to the study drug administration.

Following evaluation of the screening results, in/exclusion criteria those subjects who are eligible will be included.

The study treatment period will be carried out on outpatient basis, with regular scheduled visits to the study site.

For each subject being withdrawn from the study due to any reason, a complete final examination has to be performed within one week after the withdrawal with regard to the subject's safety.

11.1. Screening

Within three weeks prior to beginning of the study:

- Signature of Informed Consent Form.
- Demography data (age, race), body weight and height, body temperature, BMI.
- Medical history.
- Physical examination (including measurements of blood pressure and heart rate after 5 minutes supine rest, and body temperature), standard 12 lead ECG.
- Laboratory tests (after 10 hours fasting): haematology, blood chemistry and urinalysis.
- Lab tests for efficacy parameters (se insulin, C-peptide, islet antibodies)
- Viral serology (HBsAg, Anti HCV, HIV 1+2, COVID PCR).

All laboratory tests will be carried out in the local laboratories of clinical study sites.

Single laboratory values other than those relevant to the study efficacy analysis outside the normal range will generally not be regarded as an exclusion criterion provided that:

- they are not accompanied by clinical symptoms,
- the context of related laboratory values gives no indication of a pathological process,

- the investigator regards them as clinically irrelevant.

11.2. Study procedures in the treatment period

During the treatment period there will be 8 scheduled visits and an End-of-Treatment Visit i.e. in Month 1, Month 3, Month 6, Month 9, Month 12, Month 15, Month 18, Month 21 and Month 24. In case of early withdrawal an Early Discontinuation Visit should be performed within 1 week following withdrawal. The Early Discontinuation Visit is identical to the End-of-Treatment Visit. 30 (± 3) days after the End-of-Treatment Visit or the Early Discontinuation Visit (whichever is applicable) a safety follow-up visit has to be performed.

At the regular visits (Month 1, Month 3, Month 6, Month 9, Month 12, Month 15, Month 18, Month 21) the following tests/procedures should be performed:

- Physical examination, including body height and weight measurement.
- Vital signs
- 12-lead ECG (Month 12 only)
- Blood and urine sampling for routine labs (Months 6, 12 and 18 only)
- Blood sampling for efficacy parameters
- Pregnancy test for female patients only
- Recording adverse events and concomitant medication
- Compliance check

At the End-of-Treatment Visit or the Early Discontinuation Visit (whichever is applicable) the following tests/procedures should be performed:

- Physical examination, including body height and weight measurement.
- Vital signs
- 12-lead ECG
- Blood and urine sampling for routine labs
- Blood sampling for efficacy parameters
- Pregnancy test for female patients only
- Recording adverse events and concomitant medication
- Compliance check

11.3. Post-Study Procedure

At the Safety Follow-up visit the following tests/procedures should be performed:

- Physical examination, including body height and weight measurement.
- Recording adverse events and concomitant medication
- Compliance check

11.4. Safety assessments

Complete medical history will be obtained at screening and will include evaluation for past or present cardiovascular, respiratory, gastrointestinal, renal, hepatic, neurological, endocrine, lymphatic, haematologic, immunologic, dermatologic, psychiatric, genitourinary, drug, and surgical history or any other diseases or disorders.

All physical examinations will be performed by a physician and will include body measurements (weight, height, BMI) and examination of the following: general appearance, head, ears, eyes, nose, throat, neck, skin, cardiovascular system, respiratory system, abdominal system, nervous system.

All adverse events will be monitored and recorded throughout the whole study period.

Phase 2, double-blind, parallel assignment, randomized, placebo-controlled study to evaluate the preventive effect of oral insulin formula on the development of T1D in high-risk children and adolescents through the induction of immunological tolerance

12-lead ECGs (with measurement RR, PQ, QRS, QT and QTc), blood pressure (supine systolic and diastolic) and heart rate and body temperature will be monitored at screening, during the treatment periods as described in Section 11.2 and at follow up.

Blood will be sampled for full blood counts and biochemistry during the treatment periods as described in Section 11.2. Routine urinalysis will be performed at the same time-points.

12. Determination of Safety

12.1. Definition

Adverse event (AE): any untoward medical occurrence in a patient or clinical trial subject administered a medicinal product and which does not necessarily have a causal relationship with this treatment.

Adverse reaction of an investigational medicinal product (AR): all untoward and unintended responses to an investigational medicinal product related to any dose administered.

Serious adverse event or adverse reaction (SAE, SAR): any untoward medical occurrence or effect that at any dose results in death, is life-threatening, requires hospitalisation or prolongation of existing hospitalisation, results in persistent or significant disability or incapacity, or is a congenital anomaly or birth defect. Additionally, based upon appropriate medical judgement, the adverse event can be regarded as serious if it may jeopardize the subject and may require medical or surgical intervention to prevent one of the other outcomes listed in the definition of serious.

Suspected Unexpected Serious Adverse Reaction (SUSAR): a serious adverse event judged by either the investigator or the sponsor as having reasonable causal relationship to the investigational medicinal product, with the nature or severity of which is not consistent with the investigators brochure. They are subject to expedited reporting.

12.2. Documentation and Reporting of adverse events

Reporting requirements from a clinical trial are described in 35/2005. Hungarian Ministerial decree and the 20/2001 EU Clinical Trial Directive.

12.2.1. Reporting procedure

12.2.1.1. The Investigator is responsible for:

Independently from the time of the next visit in case of adverse event the subject can revisit the investigator.

The starting point for the collection of AEs will be the time the subject signs the Informed Consent. All adverse events must be entered into the Case Report Form (CRF), whether or not they are considered to be drug-related. Signs and symptoms of each AE should be described in detail in the AE report form.

The investigator shall report any serious adverse events immediately (within 24 hours of the investigator's awareness) to the sponsor's representative and the Local Ethics Committee (IKEB). The immediate report shall be followed by detailed, written reports. The immediate and follow-up reports

Phase 2, double-blind, parallel assignment, randomized, placebo-controlled study to evaluate the preventive effect of oral insulin formula on the development of T1D in high-risk children and adolescents through the induction of immunological tolerance

shall identify subjects by unique code numbers assigned to the latter. For reported deaths of a subject, the investigator shall supply the sponsor and the Ethics Committee with any additional information requested.

The Investigator will be requested to complete a separate SAE (Serious Adverse Event) Report Form form in addition to the information on the CRF.

In the event of unexplained or unexpected laboratory values abnormalities encountered during or after the study, the tests have to be repeated as soon as possible and followed up until the results turn to normal range and/or adequate explanation for abnormality is found.

Adverse events which are related or possibly related to the Investigational Medicinal Product(s) should be followed until recovery or a trend towards recovery becomes evident. All specialized medical interventions needed in case of such adverse events should be documented.

The investigator will clearly mark in the Case Report Form all laboratory findings outside the normal range and will indicate which of these deviations are clinically significant.

Only clinically significant laboratory findings should be recorded on the AE Registration Form.

12.2.1.2. The Sponsor is responsible for:

Serious adverse events

The sponsor shall report any serious, unexpected, suspected adverse reactions (SUSAR) to the competent authority (OGYÉI) and the Central Ethics Committee (ETT KFEB).

The sponsor ensures that all relevant information about suspected serious unexpected adverse reactions (SUSAR) that are fatal or life-threatening is reported to the OGYÉI and to the ETT KFEB, as soon as possible but no later than seven days after knowledge by the sponsor of such a case, and that relevant follow-up information is subsequently communicated within an additional eight days.

All other suspected serious unexpected adverse reactions shall be reported to the OGYÉI and to the ETT KFEB as soon as possible but within a maximum of fifteen days of first knowledge by the sponsor.

Once a year throughout the clinical trial, the sponsor shall provide OGYÉI and ETT KFEB with a listing of all suspected serious adverse reactions which have occurred over this period and a report of the subjects' safety.

The sponsor will keep detailed records about all serious adverse events reported by the Investigators at any time during the whole clinical period of the study. All records are to be submitted on request of the competent authority.

Non-serious adverse events

Non-serious adverse events will be recorded in the CRF and will be entered into clinical database after closing the clinical phase of the study.

The following table shows the reporting responsibility of the **Investigators**.

What	Reporting to	Timelines	Means
Serious adverse event /reaction (SAE / SAR)	<ul style="list-style-type: none"> ○ Sponsor ○ Local Ethics Committee 	Within 24 hours	Phone , fax, e-mail (following by a written confirmation on SAE report form)

Phase 2, double-blind, parallel assignment, randomized, placebo-controlled study to evaluate the preventive effect of oral insulin formula on the development of T1D in high-risk children and adolescents through the induction of immunological tolerance

Non-serious AE / AR	○ Sponsor	On the occasion of monitor visit	Detection in CRF
---------------------	-----------	----------------------------------	------------------

The following table shows the reporting responsibility of the **Sponsor**.

What	Reporting to	Timelines	Means
Serious suspected and unexpected adverse reaction (SUSAR) resulting in death or being life-threatening	○ OGYÉI ○ ETT KFEB	Within 7 calendar days Follow up report within 8 calendar day after 1 st report.	Fax or e-mail SAE form, to EMEA electronically.
Serious suspected and unexpected adverse reaction (SUSAR) which are not resulting in death or being life-threatening.	○ OGYÉI ○ ETT KFEB	Within 15 calendar days	Fax or e-mail SAE form, to EMEA electronically.
All serious suspected adverse reactions	○ OGYÉI ○ ETT KFEB	Once a year, or according to the authority's request	Written form in Line listing
Non-serious AE / AR	○ OGYÉI	At the end of the study	Final Report

12.2.2.

Documentation of adverse events

AE report form:

1. Date of AE reporting
2. Type of report:
 - Initial
 - Follow up
3. Verbatim of the event
4. Description of event,
5. Severity:
 - Mild: It does not affect the daily activity of the subject.
 - Moderate: Interfere with the daily activity of the subject.
 - Severe: Severely interfere with the daily activity of the subject or there is a need of complex treatment or hospitalization.
6. Onset time and date of AE,
7. Outcome:
 - Recovered without sequelae
 - Recovered with sequelae
 - Ongoing
 - Lost for follow up
 - Death
8. Offset time and date of AE,
9. Last date of administration of investigational product,
10. Dates of treatment

11. Criteria of seriousness:

- Death
- Life threatening
- Involved or prolonged subject hospitalisation
- Involved persistence of significant disability or incapacity
- Congenital anomaly
- Medically important

12. Seriousness:

- Serious
- Non serious

13. Relationship to investigational product:

- Related: Reasonable temporal relation to study medication administration, AND cannot be reasonably explained by other factors (such as the subject's clinical state, concomitant therapy, and/or other interventions).
- Possibly related: Relationship to study medication could not be ruled out.
- Not related: Data are available to identify a clear alternative cause for the reaction.

14. Action taken to the investigational product:

- there is no need to stop administration
- there is a need to stop administration
- protocol specific (tapering, reduction...)

15. Action taken due to AE:

- 1 = None
- 2 = Medication
- 3 = Intervention
- 4 = Medication and intervention

16. Need to follow-up:

- no
- yes

17. Comments

The criteria of seriousness are listed above (see section "Definition"). Additionally, based upon appropriate medical judgement, the adverse event can be regarded as serious if it may jeopardize the subject and may require medical or surgical intervention to prevent one of the other outcomes listed in the definition of serious.

Adverse events which are definitely or possibly related to the investigational medicinal product(s) should be followed until recovery or a trend towards recovery becomes evident. All specialized medical interventions needed in case of such adverse events should be documented.

12.3. *Validation, evaluation of adverse event reports*

Validation and evaluation of adverse event reports are pursued according to regulations and standard operating procedures of the sponsor.

12.4. *Coding dictionary*

Medical Dictionary for Regulatory Activities (MedDRA) will be used as coding dictionary. Serious AE(s) / AR(s) will be coded as soon as they will be recorded in safety database by sponsor. Non-serious AE(s) /AR(s) will be coded after ending the clinical phase of the study.

12.5. Analysis of safety data

Safety data from the clinical trial will be regularly overviewed by the sponsor during the clinical phase of the study.

All subjects who received at least one dose of study medication will be included in the final safety data analysis (including those who did not complete the study).

12.6. Emergency Procedures

Emergency equipment and drugs should be available within the clinical unit. In that case if emergency treatment would be necessary, the treatment, and the drugs used during the emergency should be documented.

12.7. Clinical laboratory tests

All clinical laboratory (safety) tests will be performed at the lab of study site. Sample volumes and sampling conditions are according to the local lab requirements. Details of reference ranges are provided in the Trial Master File. Any clinically relevant deviation of laboratory parameters should be regarded as adverse events and should be handled accordingly.

13. Quality Control and Quality Assurance

13.1. Monitoring

The purposes of trial monitoring are to verify the following:

- The rights and well-being of human subjects are protected.
- The reported trial data are accurate, complete and verifiable from source documents.
- The conduct of the trial is in compliance with the currently approved protocol/amendments, with GCP, and with the applicable regulatory requirements.

The Sponsor should ensure that the trial be adequately monitored. The Sponsor should determine the appropriate extent and nature of monitoring. Sponsor has to be informed about the state of the trial. Representatives of Sponsor may conduct visits also at suitable intervals throughout the trial.

It is the responsibility of the Investigator to assure that the study will be conducted in accordance with the protocol and the valid data are entered into the CRF. The Investigator will permit the representatives of the Sponsor to monitor the study as frequently as necessary to determine that data recording and protocol adherence are satisfactory. The CRFs and related documents will be reviewed in detail in accordance with Good Clinical Practice regulations.

The monitor in accordance with the Sponsor's requirements should ensure that the trial is conducted and documented properly by carrying out the following activities, when relevant and necessary:

- Verifying that the investigator has adequate qualification and resource and remain adequate throughout the trial period.
- Verifying if the study is conducted properly and complied with the Good Clinical Practice guidelines, the Helsinki Declaration and the applicable regulatory requirements.
- Verifying the compliance with the protocol
- Verifying if the CRFs are completed continuously and accurately and stored in accordance with the requirements.
- Verifying the registration of the investigational drug.
- Verifying the signed Informed Consent.
- Checking the source data with the data in the CRF.
- Verifying if the necessary documents are available.
- Verifying if the works described in protocol are accurately done.
- Inform the principal investigator and Sponsor about the perceptions.

13.2. Auditing

The purpose of Sponsor's audit, which is independent of and separate from routine monitoring or quality control functions, should be to evaluate trial conduct and compliance with the protocol, SOPs, GCP and applicable regulatory requirements.

14. REGULATORY AND ETHICAL ISSUES

14.1. Declaration of Helsinki

The study should be performed in accordance with the spirit and principles of the current revision of the Declaration of Helsinki (Fortaleza, Brazil, 2013).

14.2. Ethics Committee and Regulatory Authorities

Before the start of the study, the protocol and other appropriate documents must be submitted to the Medical Research Council Ethics Committee for Clinical Pharmacology (ETT-KFEB), as Independent Ethics Committee and the National Institute of Pharmacy (OGYÉI) as Regulatory Authority, for review and approval.

The trial should be conducted in compliance with the protocol.

If significant changes require a protocol amendment, the amendment has to be also submitted to the Regulatory Authority and Ethics Committee for review and approval. Non-significant changes that do not affect the conduct of the study or do not have a significant effect on the safety of the subjects or do not significantly reduce the scientific value of the trial, have to be submitted to the Ethics Committee and the Regulatory Authority for notification only.

It is the Principal Investigator's responsibility to get the approval of the leader of the institute. The leader of the institute declares that the investigational site is in possession of personal and material conditions for the study. The Principal Investigator informs the Local Ethics Committee about the study.

14.3. Information for Subjects and Informed Consent

Before the subject being admitted to the trial, she/he has consent to participate in the study, after that he has been given written and verbal information about the clinical study. These information forms, both the written and verbal should be clear to all. Neither the written, nor the verbal information should contain technical terms, and any formulation that causes the subject to waive or to appear to waive any legal rights or that releases or appears to release the investigators, institute, the Sponsor or their agents from liability for negligence.

Information Sheets and Informed Consent can be used to confirm the subjects' consents to participate in the trial. After the subject have read the Information Sheet and got oral information about the trial, they confirm their participation in the study by signing and dating the Informed Consent. The Investigator has to sign and date the Information for Subjects and the Informed Consent too. By signing and dating the Case Report Form the Investigator states that the Informed Consent has been obtained. The original signed and dated Consent Forms will be kept and archived by the Principal Investigator. All subjects will receive both the signed Informed Consent Form and the Subjects Information Sheet.

To ensure the medical confidentiality and data protection the signed Informed Consent Forms remain with the Principal Investigator and must be archived in accordance with the current legislation after the study has been completed. The Investigator who is responsible for archiving of the Informed Consent Forms will allow inspection of these documents by the competent authority, the ethics committee and the sponsor's representatives.

14.4. Confidentiality

Subjects' identity data (name, date, and place of birth) should be handled strictly confidential. The Principal Investigator is responsible for preserve the identity data in Subject Identification Forms and takes care of that the data will not be available to any unauthorized person. Each subject gets a randomization number. For further protection of the identity data, only the subjects' initials and randomization numbers will appear on the Case Report Form (data sheet).

Laboratory findings and other source documents made at the investigational site will contain the full name of the subjects; these should be reached only by the investigator staff, the monitor and auditor on behalf of Sponsor, the inspector of the Regulatory Authorities and the ethics committee.

Other person can gain access to only the data written in the CRFs or originated form these documents. Rules related to the handling of the identity data are stated in the Subjects Information Sheet too.

15. DATA MANAGEMENT

15.1. Investigator's File

Investigator's File will be set up according to the latest guideline (ICH Topic E6 Note for Guidance on Good Clinical Practice CPMP/ICH/135/95).

15.2. Case Report Forms

These forms are used to transmit the information collected during the clinical trial to the Sponsor. Case Report Forms must be completed for each subject enrolled in this study. All Case Report Form must be legible and completed in black or blue ball point pen. The Investigators may enter corrections on original CRFs. Data should not be obliterated by blacking out, correction fluid or an eraser.

The examination findings should be written into the Case Report Form as soon as possible, at least on the day of the examination or on that day, when the investigator receives the findings. At all times the investigator has final responsibility for the accuracy and authenticity of all clinical and laboratory data entered in the CRFs.

The Principal Investigator has to review the Case Report Form for completeness and accuracy and has to sign and date it on the first page at the end of the study. Selected pages should be signed by an investigator after filling in. These signatures serve to attest that data contained on the CRFs are true and have not been falsified.

The monitor and auditor will review the complete Case Report Forms against the subjects' medical records and verify that all data are complete and accurate.

Major corrections have to be justified.

Assurance of the completion, review and approval of all CRFs is the investigator's responsibility.

15.3. Archiving

The Screening LOG, the Subject Identification LOG, all Information for Subjects, Informed Consents, source documents (laboratory findings, case history), and copies of the CRFs, whether these CRFs are completed or not, should be archived in accordance with the current legislation at the investigational site.

Phase 2, double-blind, parallel assignment, randomized, placebo-controlled study to evaluate the preventive effect of oral insulin formula on the development of T1D in high-risk children and adolescents through the induction of immunological tolerance

The Sponsor archives all other documents (except Informed Consent Forms, and source documents) related to the study in accordance with the requirements of GCP guidelines and applicable regulatory requirements.

Any transfer of responsibilities for archiving should be documented.

15.4. Disclosure of information

Information concerning the study, patent applications, processes, scientific data or other pertinent information is confidential and remains the property of the sponsor. The investigator may use this information for the purposes of the study only.

It is understood by the investigator that the sponsor will use information developed in this clinical study in connection with the development of IMP, and therefore may disclose it as required to other clinical investigators and to regulatory agencies. In order to allow the use of the information derived from this clinical study, the investigator understands that he/she has an obligation to provide complete test results and all data developed during this study to the sponsor.

Verbal or written discussion of results prior to study completion and full reporting should only be undertaken with written consent from the sponsor.

16. Protocol Amendments and deviations

Anytime after the approval of the protocol (before, during, and after the start of the study) any amendment turns out to be necessary it should be done in written form by the completion of the form "Amendment of Approved Protocol".

If significant changes require a protocol amendment, the amendment has to be submitted to the Regulatory Authority for approval. Except for shifts regarding the quality of the investigational medicinal products and changes of administrative nature, the Regulatory Authority also should transmit the planned protocol amendments to the CEC for review and approval.

Minor changes, that do not affect the conduct of the study or do not have a significant effect on the safety of the subject's, do not imply changes of the Subject Information Leaflet, or do not significantly reduce the scientific value of the trial, do not need a re-submit to the Regulatory Authority for approval. These amendments will be sent to the Regulatory Authority only for information.

The approved amendment should be sent to everybody, who signed the original protocol; and they have to enclose it to the original protocol.

The Investigator should not implement any deviation from or changes of the protocol without agreement by the Sponsor and prior review and documented approval of the CEC and/or Regulatory Authority, except when necessary to eliminate an immediate hazard to trial subjects or when the changes involve only logistical or administrative aspects (e.g. changes of addresses).

Any deviation from the approved protocol should be regarded as protocol deviation. Any deviation will be recorded in the raw data of the study and covered in the final report.

As soon as possible, the implemented deviation or change, the reason for it and if appropriate, the proposed protocol amendment should be submitted to the

- Ethics Committee
- Sponsor for agreement and approval
- Competent Authorities.

17. Financial Aspects

Agreement on the amount and the methods of payment will be stated in a separate document signed and dated by the Sponsor and the study site.

The study is financed from Government grant No. TBD

18. Insurance

Subjects participating in the study will be duly insured for any study-related health deterioration for which the Sponsor is held legally liable.

The Sponsor will submit a copy of the certificate of insurance for the Trial Master File and the Investigator Site File of the study. This insurance, however, will be waived if the health deterioration is probably connected with the non-compliance of the subject or the professional misconduct of the study site personnel.

The subjects participating in the study can report their claim of damages in written form, directly to the Insurance Company mentioned above, or to the Principal Investigator, or to the Sponsor as soon as possible, but not later than 7 days after notice.

19. Clinical study report

The integrated study report will be prepared by Sponsor according to CPMP/ICH/137/95 (ICH Topic E 3) Structure and Content of Clinical Study Report. This report should include the results of efficacy and safety statistical reports.

20. Publication Policy

By signing this protocol the Principal Investigator agrees that the results of this study may be used for submission to national and/or international registration and supervisor authorities.

Inasmuch the principal investigator wants to write publication about the study, the manuscript of this publication should be handed over the Sponsor for approval. In this way the Sponsor can state whether the publication does or does not infringe patent or trade secret brake.

If the Sponsor initiates the publication or the expose of study results, he/she should notify the Principal Investigator and consider his/her professional opinion.

21. GENERAL REFERENCES

1. Declaration of Helsinki Adopted by the 18th WMA General Assembly, Helsinki, Finland, June 1964 and amended by the: 29th WMA General Assembly, Tokyo, Japan, October 1975, 35th WMA General Assembly, Venice, Italy, October 1983, 41st WMA General Assembly, Hong Kong, September 1989, 48th WMA General Assembly, Somerset West, Republic of South Africa, October 1996, 52nd WMA General Assembly, Edinburgh, Scotland, October 2000, 53rd WMA General Assembly, Washington DC, USA, October 2002 (Note of Clarification added), 55th WMA General Assembly, Tokyo, Japan, October 2004 (Note of Clarification added), 59th WMA General Assembly, Seoul, Republic of Korea, October 2008 and 64th WMA General Assembly, Fortaleza, Brazil, October 2013
2. ICH Topic E6R2. Guideline for Good Clinical Practice.
https://database.ich.org/sites/default/files/E6_R2_Addendum.pdf
3. 1997. évi XLVII tv. Az egészségügyről és a hozzájuk kapcsolódó személyes adatok kezeléséről és védelméről
4. 1997. évi CLIV. tv. Az egészségügyről
5. 35/2005 EüM rendelet Az emberi felhasználásra kerülő vizsgálati készítmények klinikai vizsgálatáról és a helyes klinikai gyakorlat alkalmazásáról
6. 2005. évi XCV. törvény Az emberi alkalmazásra kerülő gyógyszerekről és egyéb, a gyógyszerpiacot szabályozó törvények módosításáról
7. 235/2009. (X. 20.) Korm. rendelet az emberen végzett orvostudományi kutatások, az emberi felhasználásra kerülő vizsgálati készítmények klinikai vizsgálata, valamint az emberen történő alkalmazásra szolgáló, klinikai vizsgálatra szánt orvostechnikai eszközök klinikai vizsgálata engedélyezési eljárásának szabályairól
8. AZ EURÓPAI PARLAMENT ÉS A TANÁCS 2001/20/EK IRÁNYELVE az emberi felhasználásra szánt gyógyszerekkel végzett klinikai vizsgálatok során alkalmazandó helyes klinikai gyakorlat bevezetésére vonatkozó tagállami törvényi, rendeleti és közigazgatási rendelkezések közelítéséről
9. AZ EURÓPAI PARLAMENT ÉS A TANÁCS 536/2014/EU RENDELETE emberi felhasználásra szánt gyógyszerek klinikai vizsgálatairól és a 2001/20/EK irányelv hatályaon kívül helyezéséről
10. ICH Topic E3 Structure And Content Of Clinical Study Reports
https://database.ich.org/sites/default/files/E3_Guideline.pdf