

Per aspera sic itur ad astra

Lucio Anneo Seneca

Hercules furens, atto II, v. 437

INTRODUZIONE

Il Glucagon-like peptide 1 (GLP-1), un ormone secreto dal tratto gastrointestinale principalmente in risposta all'ingestione di nutrienti (1), è in grado di potenziare la secrezione insulinica in modo glucosio-dipendente, di inibire l'introito di cibo, la secrezione di glucagone e di rallentare lo svuotamento gastrico (2). Questo ormone svolge nell'organismo un ruolo cruciale nel mantenimento dell'omeostasi glicidica. Nei pazienti affetti da diabete tipo 2 è stata riportata una compromissione della secrezione di GLP-1 in risposta a stimoli standardizzati, quali un pasto misto o un carico orale di glucosio (3, 4). Nei soggetti diabetici tipo 2, la somministrazione cronica di GLP-1 risulta efficace nel ridurre la glicemia a digiuno e post-prandiale ed i valori di emoglobina glicata (HbA1c) in associazione ad un modesto, ma significativo calo ponderale (5). La breve emivita dell'ormone è imputabile principalmente alla rapida degradazione ad opera dell'enzima dipeptidilpeptidasi 4 (DPP-4), appartenente alla classe delle ectopeptidasi e con una distribuzione pressoché ubiquitaria a livello tissutale. La sua azione consiste nel clivare la sequenza aminoterminale His⁷-Ala⁸, fondamentale nel determinare l'affinità del legame tra il GLP-1 ed il proprio recettore (6). La DPP-4 è espressa in particolare dalle cellule endoteliali del sistema vascolare, pertanto il GLP-1, una volta riversato nel torrente circolatorio, risulta estremamente vulnerabile con una emivita biologica media stimata tra 1 e 2 minuti. La conseguente limitazione al possibile utilizzo a scopo terapeutico ha spinto la ricerca farmacologica a focalizzare la propria attenzione sullo sviluppo di agonisti recettoriali del GLP-1 resistenti all'azione degradativa della DPP-4 (GLP-1 RA).

Exendin-4 (Ex-4), un agonista naturale del recettore del GLP-1, è stato individuato per la prima volta nelle secrezioni salivari della lucertola Gila monster (*Heloderma suspectum*), che vive negli Stati Uniti, principalmente in New Mexico ed Arizona. Il termine "exendin" intende sottolineare la secrezione mediante meccanismo esocrino da parte delle ghiandole

salivari perimandibolari e la concomitante azione endocrina. Questa molecola costituita da 39 aminoacidi, presenta un'omologia di sequenza con il GLP-1 umano pari al 53% ed oltre a mimarne gli effetti glucoregolatori, risulta resistente all'azione degradativa della DPP-4 con un'emivita biologica media nel torrente circolatorio di circa 2.4 ore (7). Nei pazienti affetti da diabete mellito tipo 2, Exenatide (la forma sintetica di Exendin-4) determina un miglioramento significativo del controllo glicemico associato a calo ponderale, richiedendo una somministrazione per via iniettiva sottocutanea due volte al giorno. Anche Liraglutide, un altro agonista recettoriale del GLP-1 con un'omologia di sequenza pari al 97%, ha mostrato una significativa efficacia nella riduzione della glicemia, dei livelli di HbA1c e del peso corporeo. La sostituzione di un residuo di lisina con arginina in posizione 34 e l'aggiunta di una catena di acidi grassi a 16 atomi di carbonio consentono il legame della molecola all'albumina serica e la formazione di eptameri nel sito di iniezione con un'emivita plasmatica pari a circa 13 ore. Liraglutide viene quindi somministrata sempre per via iniettiva sottocutanea, ma con una frequenza monogiornaliera rispetto ad Exenatide (8).

Exenatide (Byetta) e Liraglutide (Victoza) sono attualmente approvati e disponibili in Italia per il trattamento del diabete tipo 2. L'efficacia antiperiplicemizzante dimostrata da questi farmaci, sia in monoterapia sia in associazione con altri antidiabetici, non risulta associata ad un aumento del rischio di ipoglicemia, in considerazione della azione glucosio-dipendente di queste molecole. I GLP-1 RA sono in grado di determinare un significativo calo ponderale sia nei pazienti diabetici tipo 2 sia nei soggetti obesi non affetti da diabete. In una metanalisi, condotta dal nostro gruppo di ricerca su tutti gli studi clinici randomizzati di durata superiore o uguale a 24 settimane, il trattamento con GLP-1 RA si associa ad una significativa riduzione del BMI pari a -1.0 kg/m^2 $[-1.3; -0.6]$ (9). Questo effetto sembra contribuire al miglioramento del profilo lipidico, almeno negli studi a medio termine. La riduzione dei livelli circolanti postprandiali di trigliceridi sembra essere determinata anche dal

rallentamento, indotto dai GLP-1 RA, dello svuotamento gastrico e dell'assorbimento dei nutrienti.

Questi farmaci hanno riportato anche un'azione di miglioramento sul profilo pressorio, che avvenendo entro i primi giorni dall'inizio del trattamento, non è ascrivibile alla riduzione del peso corporeo, ma probabilmente ad un'azione natriuretica e di stimolo sulla vasodilatazione endotelio-mediata. Recettori per il GLP-1 sono infatti espressi nel sistema nervoso centrale e nelle cellule endoteliali di diversi distretti tissutali. Le attuali evidenze *in vivo* ed *in vitro* ipotizzano per i GLP-1 RA un'azione diretta sulla vitalità delle cellule endoteliali ed un effetto inibitorio sul processo di adesione monocitaria. Recettori per il GLP-1 sono stati identificati nei cardiomiociti, nell'endocardio, nell'endotelio e nelle cellule muscolari lisce a livello coronarico. Allo stato attuale si ipotizza che, alcune delle azioni del GLP-1 a livello cardiaco, in particolare sul recupero funzionale post-ischemico e sui processi di vasodilatazione, possano essere svolte anche dai suoi metaboliti, quali il GLP-1 [7-36] ed il GLP-1 [9-36]. Queste azioni sono state confermate in larga parte anche per i GLP-1 RA (10).

Il miglioramento del controllo metabolico senza un aumento del rischio di ipoglicemia, unitamente agli effetti sui diversi fattori di rischio cardiovascolare, sull'endotelio e sul sistema cardiovascolare *in toto*, suggeriscono potenziali benefici dei GLP-1 RA sul profilo di rischio cardiovascolare. I risultati degli studi clinici attualmente in corso saranno disponibili a partire dal 2016, a meno che non vengano prematuramente interrotti per manifestata superiorità o inferiorità del trattamento. Nel frattempo, l'unica fonte di evidenza scientifica è rappresentata da trial clinici in genere di fase III con obiettivi metabolici, che riportino gli eventi cardiovascolari maggiori come eventi avversi severi. Una metanalisi, recentemente condotta dal nostro gruppo di ricerca, ha evidenziato come il trattamento con GLP-1 RA negli studi placebo-controllati, si associ ad una riduzione significativa degli eventi cardiovascolari maggiori nel breve e medio termine (11).

Tra gli effetti extraglicemici sono recentemente emerse alcune evidenze *in vivo* ed *in vitro* relative ad una possibile azione dei GLP-1 RA sul tessuto osseo. L'esposizione a lungo termine dei pazienti diabetici al trattamento con Exenatide non si associa ad alcun aumento del rischio di frattura, nonostante il progressivo e significativo calo ponderale, calo ponderale che di per sé comporta una riduzione della densità minerale ossea ed un aumento dei processi di riassorbimento osseo (12).

Il costo e la necessità di iniezioni sottocutanee mono- o bi-giornaliere limitano l'utilizzo di questi farmaci nella terapia del diabete tipo 2. La Food and Drug Administration (FDA) e la European Medicines Agency (EMA) hanno recentemente approvato l'utilizzo di una formulazione a lento rilascio di Exenatide (Exenatide LAR), da somministrarsi una volta alla settimana per via iniettiva sottocutanea, previa ri-sospensione del principio attivo. La FDA aveva precedentemente negato l'autorizzazione all'immissione nel mercato del farmaco, a causa di possibili effetti proaritmogeni, richiedendo ulteriori approfondimenti per quanto riguarda anche, i possibili effetti sull'incidenza di carcinoma midollare della tiroide e di pancreatite acuta. Studi clinici di fase III hanno mostrato un'efficacia antiperglicemica superiore per Exenatide LAR (Bydureon) rispetto a Exenatide (Byetta), a parità di effetti sul peso corporeo e con un buon profilo di tollerabilità (13). Taspoglutide, un altro GLP-1 RA a lunga durata di azione a somministrazione settimanale, ha recentemente dimostrato un'efficacia superiore a quella di Exenatide (Byetta) in termini di riduzione dei valori di HbA1c, a parità di effetti sul peso. Tuttavia questa formulazione a lento rilascio di Taspoglutide ha mostrato, in questo come in altri studi clinici di fase III, un inaccettabile profilo di tollerabilità, caratterizzato da un significativo aumento dell'incidenza di nausea/vomito e di reazioni allergiche locali e sistemiche (14). Proprio il profilo di tollerabilità delle formulazioni dovrà essere attentamente considerato anche per gli altri GLP-1 RA a lunga durata di azione attualmente in fase di sviluppo (Albiglutide e Dulaglutide).

La terapia genica mediante l'inserimento e l'espressione di sequenze geniche terapeutiche in specifici organi bersaglio attraverso dei vettori principalmente virali, rappresenta un promettente approccio terapeutico a diverse patologie croniche, tra le quali anche il diabete mellito tipo 2 (15). In modelli animali di diabete mellito tipo 2, la somministrazione endovena di vettori adenovirali ha consentito di ottenere l'espressione di GLP-1 RA nel tessuto epatico (16). Tuttavia l'utilizzo di vettori appartenenti alle famiglie degli Adenovirus e dei Retrovirus ha sollevato problemi relativi al profilo di sicurezza, oltre che alla limitata efficacia nel tempo. In particolare, l'utilizzo di vettori adenovirali nel trattamento della fibrosi cistica è risultato associato al decesso di un paziente, mentre studi clinici condotti su vettori retrovirali hanno evidenziato lo sviluppo di linfoma a cellule T nei primati non umani e di tre casi di leucemia a cellule T in bambini affetti da forme gravi di sindrome da immunodeficienza combinata legata al cromosoma X (17).

Più recentemente è stata individuata una terza classe di virus, denominati Parvovirus, non associati ad alcuna patologia maligna nella specie umana. Questi virus sembrano esercitare proprietà antitumorali (18). Gli Adeno-associated virus (AAV), appartenenti alla specie dei Dependovirus ed alla famiglia dei Parvoviridae, sono attualmente tra i vettori virali maggiormente utilizzati negli esperimenti di terapia genica a causa del buon profilo di sicurezza, caratterizzato da un ridotto potere immunogeno associato alla capacità di determinare una espressione transgenica persistente nel lungo periodo (19-22). L'infezione ad opera di AAV di primati non umani ed umani non risulta associata né ad alcuna patologia né ad alcun effetto collaterale severo. Gli AAV possono essere definiti dei virus deficitari, la loro replicazione richiede infatti la co-infezione da parte di un Adenovirus o Herpesvirus (helper virus). In assenza di questi ultimi, il DNA virale viene integrato nel genoma dell'ospite stabilendo una infezione latente (23). Diversi studi clinici di fase I/II hanno confermato il buon profilo di sicurezza, la stabilità e l'efficacia di questi vettori nel potenziale approccio terapeutico a diverse patologie retiniche (24) e neurodegenerative, come ad esempio il

morbo di Alzheimer e di Parkinson (25,26). L'interesse scientifico suscitato da questi vettori è confermato dal numero di trial clinici attualmente in corso, circa 20, aventi come scopo quello di verificare l'efficacia dell'espressione transgenica di diverse sequenze terapeutiche in pazienti affetti da malattie neurodegenerative (inclusa anche la malattia di Batten), neuromuscolari (come la distrofia muscolare di Duchenne e la distrofia muscolare dei cingoli tipo 2C), emofilia B, artrite reumatoide e scompenso cardiaco severo (27). Attualmente sono stati isolati 14 diversi serotipi di AAV. L'ulteriore caratterizzazione molecolare e biochimica ha consentito di individuarne più di 100 sottovarianti caratterizzate da un differente tropismo tissutale, diversa persistenza e efficacia nella trasfezione genica (28). Il genoma degli AAV risulta costituito da un singolo filamento di DNA di circa 4.5 Kb con tre diversi domini funzionali. Alle estremità della sequenza genomica sono presenti due sequenze terminali invertite (o inverted terminal repeats, ITR) con adiacenti due quadri di lettura aperta (o open reading frames, ORF). Le sequenze ITR hanno un ruolo chiave nel ciclo vitale della particella virale, mentre le regioni ORF contengono le sequenze geniche Rep e Cap per la produzione di proteine indispensabili rispettivamente, per la replicazione/espressione del genoma virale e la struttura del capsido. Nei vettori ricombinanti AAV più frequentemente utilizzati, le sequenze Rep e Cap dei domini ORF vengono completamente sostituite dalla cassetta di espressione costituita dal gene di interesse terapeutico e dalla sequenza che ne promuove la trascrizione. Le sequenze ITR sono pertanto gli unici elementi virali persistenti nei vettori AAV ricombinanti e questi ultimi non risultano in grado di replicarsi o integrarsi autonomamente in modo tessuto-specifico (27). Tra i diversi serotipi, nei roditori gli AAV-5 hanno dimostrato una selettiva capacità di trasfezione nei confronti di alcuni organi quali polmone, occhio, sistema nervoso centrale e ghiandole salivari. Gli AAV-5 si distinguono particolarmente come struttura dagli altri serotipi. Le proteine che costituiscono il capsido, in particolare, sono molto diverse e questa caratteristica sembra giustificarne il diverso tropismo tissutale (29). Le ghiandole salivari sono attualmente riconosciute come uno degli organi bersaglio più

promettenti per la terapia genica. In primo luogo, questi organi a differenza del fegato e del polmone, sono facilmente accessibili e non indispensabili per la vita. In caso di eventuale reazione avversa possono essere rimossi con un impatto limitato sullo stato di salute del paziente. Le ghiandole salivari presentano importanti caratteristiche a comune con le ghiandole endocrine. In primo luogo, sono organi capsulati e pertanto in grado di limitare al massimo la diffusione sistemica del vettore e le conseguenti potenziali reazioni avverse sistemiche. In secondo luogo, le ghiandole salivari sono in grado di sintetizzare e secernere elevate quantità di proteine, vedi la capacità di produrre e rilasciare nella saliva enzimi digestivi, proteine antibatteriche, fosfoproteine leganti il calcio, fattori di crescita e mucoproteine. Infine presentano un meccanismo di secrezione endocrina (30). Le ghiandole salivari hanno infatti almeno due diversi meccanismi di secrezione degli enzimi digestivi. Il più importante è quello *regolato* che determina la secrezione esocrina delle proteine nella saliva mediante granuli zimogeni. Esiste anche un meccanismo *costitutivo* che ne regola la secrezione endocrina nel torrente circolatorio. Attraverso il meccanismo costitutivo le cellule secernono continuamente le proteine sintetizzate, mentre attraverso il sistema regolato le proteine accumulate in vescicole secretorie speciali verranno secrete solo in risposta ad uno specifico segnale extracellulare. Il meccanismo regolato di secrezione è specifico delle cellule specializzate nella secrezione rapida, su richiesta, di ormoni, neurotrasmettitori o enzimi digestivi. Le cellule epiteliali delle ghiandole salivari sono organizzate in monostrato e per l'80% risultano costituite da cellule *acinari*, poste all'estremità distale dei dotti salivari e cellule *duttali*, che formando i dotti a loro volta confluiscono nel dotto escretore ed infine nella cavità orale. Il meccanismo predominante di secrezione è quello regolato attraverso la membrana apicale. Il sistema costitutivo avviene invece attraverso la membrana basolaterale assicurando la secrezione nell'interstizio e quindi nel torrente circolatorio. Le cellule epiteliali salivari hanno una emivita stimata di 125-200 giorni. Esperimenti condotti su modelli murini hanno dimostrato che le cellule trasfettate mediante AAV non vanno generalmente incontro a

processi di divisione cellulare durante le 54 settimane di osservazione e se questo avviene, le cellule figlie risultano a loro volta trasfettate (31). Soltanto le cellule duttali sembrano essere suscettibili alla terapia genica mediata da AAV. Le cellule acinari sembrano aver perso le strutture recettoriali necessarie o componenti intracellulari con un ruolo chiave nei processi di trasduzione. Gli Adenovirus, a differenza degli AAV, trasfettano sia le cellule duttali sia quelle acinari determinando un ricco infiltrato infiammatorio e l'alterazione della normale morfologia delle ghiandole salivari. L'espressione transgenica limitata nel tempo, ottenuta mediante vettori adenovirali, sembra imputabile proprio alla distruzione immunomediata delle cellule trasfettate. Mediante i vettori AAV, vengono interessate soltanto le cellule duttali senza alcun processo infiammatorio e senza il coinvolgimento della ghiandola salivare controlaterale a quella trasfettata.

Queste caratteristiche rendono le ghiandole salivari un bersaglio ottimale per la terapia genica di patologie caratterizzate dal deficit di una singola proteina. Proprio le ghiandole salivari sono state recentemente trasfettate per il trattamento, mediante terapia genica mediata da vettori AAV, della malattia di Fabry, caratterizzata dal deficit dell'enzima lisosomiale alfa-galattosidasi A (32).

SCOPO DELLO STUDIO

Nel presente esperimento, utilizzando due modelli animali murini di obesità/diabete tipo 2, abbiamo caratterizzato il profilo di efficacia metabolica e di sicurezza dell'espressione persistente di Exendin-4, ottenuta mediante trasfezione delle ghiandole salivari con vettore AAV-5. In particolare sono stati valutati gli effetti su omeostasi glicidica, incremento ponderale e profilo di espressione genica delle adipochine da parte del tessuto adiposo viscerale.

MATERIALI E METODI

COSTRUZIONE, PREPARAZIONE E QUANTIFICAZIONE DEL VETTORE AAV-5 CONTENENTE LA SEQUENZA GENICA DI EXENDIN-4

Il vettore ricombinante AAV5 contenente il minigene di Exendin-4 è stato realizzato da Di Pasquale G presso la sezione di Fisiologia Molecolare e Terapeutica, Istituto nazionale di Ricerca Dentale e Craniofaciale, Istituto Nazionale della Salute (NIH, Bethesda, Maryland). La cassetta di espressione è stata disegnata in modo da contenere, oltre al minigene di Exendin-4, il promotore del citomegalovirus ed il peptide segnale del fattore di crescita murino del nervo (NGF) (33). Queste ultime due sequenze hanno mostrato in esperimenti *in vitro* ed *in vivo* la capacità di regolare l'espressione e la secrezione peptidica. Il vettore AAV-5 ricombinante è stato realizzato mediante una procedura a 4 plasmidi precedentemente descritta (34), trasfettando colture semiconfluenti di cellule embrionali di rene umano 293T, ottenute dall'American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA), con 4 plasmidi: un plasmide adenovirale helper (pAd12) per l'espressione delle proteine E2 ed E4, due plasmidi AAV helper per la codifica rispettivamente della sequenza Rep del serotipo 2 e del capsido del serotipo 5 e un plasmide contenente la sequenza terminale invertita (ITR) dell'AAV ed il minigene di Exendin-4. I vettori ricombinanti sono stati purificati mediante centrifugazione in gradiente di densità con cloruro di cesio. Per la titolazione virale è stata eseguita una real-time polymerase chain reaction (PCR) quantitativa.

TRASFEZIONE IN VITRO

Il vettore ricombinante AAV-5 ottenuto mediante questa procedura, è stato testato *in vitro* su colture di cellule 293T mantenute in terreno di coltura di Dulbecco modificato secondo Eagle

(DMEM), arricchito con il 10% di siero bovino fetale (FBS), 100 U di penicillina/ml, 0.1 mg di streptomina/ml e 2 mM di L-glutamina a 37 °C in atmosfera al 5% di CO₂. La trasfezione è stata eseguita utilizzando il vettore ricombinante ad una concentrazione pari a 10³ particelle resistenti alla DNAsi (DRP)/ml. I livelli di Exendin-4 nel terreno di coltura sono stati dosati mediante dosaggio immunoenzimatico specifico (Phoenix Europe GmbH, Germania).

Il sovranatante, raccolto 96 ore dopo l'incubazione dalle cellule 293T trasfettate con il vettore ricombinante AAV-5, è stato quindi testato su una linea cellulare ovarica di criceto cinese esprime il recettore per il GLP-1 (CHO-GLP1R) per la valutazione dell'attività biologica *in vitro*, in accordo con la procedura precedentemente descritta e pubblicata da Egan JM (35), che ha contribuito alla realizzazione di questo esperimento.

MODELLI ANIMALI

Tutte le procedure per la sistemazione, mantenimento, trattamento ed eutanasia degli animali sono state condotte in stretta osservanza delle direttive del Consiglio della Comunità Europea del 24 novembre 1986 (86/609/EEC) e dell'Università degli Studi di Firenze. Gli animali sono stati allocati nei locali del Centro per i servizi di stabulazione degli animali da Laboratorio "CE.S.A.L.", Università degli Studi di Firenze, Viale Pieraccini 6, Firenze. Il protocollo di studio è stato approvato dalla Direzione Generale della Sanità Animale e del Farmaco Veterinario (Ufficio VI), Dipartimento per la Sanità Pubblica Veterinaria, la Nutrizione e la Sicurezza degli Alimenti, Ministero della Salute.

In questo studio sono stati utilizzati due modelli animali di obesità/diabete tipo 2:

- topi sottoposti a dieta ad elevato contenuto di grassi (HFD). I topi HFD sono attualmente riconosciuti come un valido e robusto modello animale poligenico per lo studio dell'obesità,

risultando caratterizzati da un elevato rischio di sviluppare precocemente alterata tolleranza glicidica e diabete tipo 2 (36).

20 topi maschi CD1 di 4 settimane sono stati allocati in numero di 5 esemplari per apposita gabbia ed alimentati con un mangime (Laboratorio Dottori Piccioni, Milano, Italia) ad elevato contenuto di grassi (60% del contenuto energetico complessivo) con 300 mg di colesterolo/kg ed un apporto energetico pari a 21.10 kJ/g. L'apporto lipidico attraverso questo regime HFD ha previsto, in accordo ai dati presenti in letteratura, l'introduzione di un 42% di grassi saturi (acido stearico e palmitico), di un 43% di grassi monoinsaturi (acido oleico) e di un 15% di grassi polinsaturi (acido linoleico e linolenico). I carboidrati rappresentavano il 20% del contenuto energetico totale. Tale regime è stato mantenuto per tutta la durata dell'esperimento.

- ratti Zucker fa/fa, come modelli spontanei monogenici di obesità, in quanto portatori di una mutazione *missense* omozigote del gene che codifica il recettore per la leptina, una adipochina coinvolta principalmente nel controllo dell'appetito e nella regolazione della funzione endocrina ipotalamica. Questi topi sviluppano precocemente un fenotipo obeso caratterizzato da: iperfagia, compromissione del senso della sazietà, ipercolesterolemia, insulinoresistenza, processo di crescita non lineare, ipotermia, ridotto metabolismo energetico basale, aumento della concentrazione di glucocorticoidi, sterilità, anomalie nella funzionalità immunitaria ed elevato rischio di sviluppare diabete tipo 2 (37).

10 ratti Zucker fa/fa, acquistati dai Laboratori Charles River (Lecco, Italia) ed allocati singolarmente in apposite gabbie, sono stati alimentati con mangime standard (mangime per animali da laboratorio Purina) per tutta la durata dell'esperimento.

Mediante singola iniezione transcutanea di 50 µl di vettore ricombinante AAV-5 contenente la sequenza genica di Exendin-4 (5×10^{12} DRP/ml) sono state trasfettate le ghiandole sottomandibolari di n=10 topi HFD di 8 settimane e di n=5 ratti Zucker fa/fa di 9 settimane. Gli animali di controllo (n=10 topi HFD di 8 settimane e n=5 ratti Zucker fa/fa di 9 settimane)

hanno ricevuto, sempre mediante singola somministrazione transcutanea 50 µl di vettore ricombinante AAV-5 privo della sequenza di Exendin-4 (vettore vuoto). Peso, introito di cibo, di acqua, volume urinario, glicemia sono stati monitorizzati con una frequenza settimanale durante l'intera durata dello studio. Per valutare gli effetti del trattamento sul consumo di cibo a breve termine nei ratti è stato eseguito, in seguito a digiuno notturno, un test di valutazione dell'introito alimentare della durata di 120'. Nelle singole gabbie è stata posta una quantità determinata di mangime standard valutando il consumo di cibo in grammi come differenza tra la quantità iniziale e quella residua ogni 15 minuti.

Nei topi HFD, 6 settimane dopo la loro trasfezione, è stato invece condotto un test intraperitoneale di tolleranza all'insulina (ITT). Ciascun animale è stato mantenuto a digiuno per un periodo di 4 ore. In seguito all'iniezione intraperitoneale di insulina (Humulin R, Lilly) alla dose di 1.0 UI/kg sono stati eseguiti prelievi ematici dalla vena laterale della coda ai tempi 0, 15, 30, 60, 90 e 120'. L'area sotto la curva per l'andamento della glicemia durante il test ITT (AUC, mM per minuto) è stata calcolata in base alla seguente equazione: $AUC_{0-120 \text{ min}} = (G_0 + G_{15}) \times 15/2 + (G_{15} + G_{30}) \times 15/2 + (G_{30} + G_{60}) \times 30/2 + (G_{60} + G_{120}) \times 60/2$.

Nei topi HFD, al basale e dopo 6 settimane, sono stati raccolti dei campioni ematici venosi mediante accesso dalla vena giugulare, previa anestesia dell'animale con isofluorano. Questi campioni adeguatamente trattati e conservati sono stati utilizzati per il dosaggio dei livelli circolanti di Exendin-4, insulina, HbA1c, leptina ed adiponectina. Nei ratti Zucker fa/fa, i prelievi ematici sono stati eseguiti al basale, dopo 4 e 8 settimane dall'inizio dello studio, per dosare Exendin-4, leptina ed adiponectina. I livelli di HbA1c ed insulinemia sono stati dosati al tempo 0 e 8 settimane dopo la trasfezione.

Tutti gli animali utilizzati sono stati sacrificati alla fine dell'esperimento mediante inalazione CO₂ (80%).

Ghiandole salivari, fegato, milza e pancreas sono stati asportati, adeguatamente trattati e conservati per l'analisi di distribuzione tissutale del vettore mediante estrazione del DNA e per l'analisi immunohistochimica (solo per le ghiandole salivari).

DOSAGGIO DEI LIVELLI CIRCOLANTI DI EXENDIN-4

Exendin-4 presenta un'omologia di sequenza pari al 53% con il GLP-1 nativo. I livelli circolanti di Exendin-4 sono stati determinati mediante specifico kit di dosaggio immunoenzimatico (Phoenix Europe GmbH, Germania), in base alle istruzioni fornite dal produttore.

ANALISI DI BIODISTRIBUZIONE DEL VETTORE

Per valutare la biodistribuzione tissutale del vettore AAV-5 contenente la sequenza genica di Exendin-4, al termine dell'esperimento si è proceduto all'estrazione del DNA genomico (Kit di purificazione del DNA Wizard, Promega Corporation, Madison, WI, USA) da ghiandole salivari, fegato, milza e pancreas dei topi HFD. L'amplificazione con PCR quantitativa (20 µl di volume finale) del DNA genomico (100 ng) è stata realizzata mediante Sistema di rilevamento della sequenza ABI PRISM 7700 (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) utilizzando il SYBR Green Master Mix e primer 5' e 3' specifici per il promotore CMV (0.3 µM; CMV 5'-CATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCAT- 3' e CMV 3'-TGGAAATCCCCGTGAGTCA-5'). Il DNA virale è stato quantificato in ciascun campione confrontando i profili di amplificazione con un set di DNA standard ottenuti, per ciascun tessuto, mediante vettore AAV5 e 100 ng di DNA genomico di animali non trattati.

ANALISI IMMUNOISTOCHIMICA DELLE GHIANDOLE SALIVARI

Nei topi HFD al termine dell'esperimento, sono state rimosse le ghiandole salivari sia dai controlli (n=5) sia dagli animali trattati con AAV5 Ex-4 (n=5). I tessuti sono stati fissati in formaldeide al 4% per 24 ore a temperatura ambiente, successivamente trattati per 12 ore a 4°C con sucrosio al 30% in soluzione salina tamponata con fosfato (PBS) e quindi incorporati in apposito mezzo di inclusione per criostato (Killik, Bio-Optica, Milano, Italia). Mediante criostato sono state ottenute delle sezioni di 10 µm di spessore successivamente allocate in vetrini rivestiti con polilisina. I vetrini sono stati quindi incubati in PBS con 0.5% di surfattante Triton (Sigma Aldrich, Milano, Italia) per 15' a temperatura ambiente. Successivamente le sezioni sono state incubate per 24 ore a 4°C con l'anticorpo primario contro Exendin-4 (Phoenix Europe, GmbH, Germania), diluizione finale di 1:50.

L'incubazione dei preparati per due ore a temperatura ambiente con anticorpo secondario Donkey anti Rabbit Alexa Fluor 488 (Invitrogen, San Diego, CA, USA) alla diluizione finale di 1:333 ha determinato la formazione di prodotti di immunoreazione che sono stati rilevati e documentati mediante microscopio ad epifluorescenza Axioskop Zeiss (Zeiss, Germania) ad un ingrandimento pari a 40X.

DOSAGGIO DEI LIVELLI CIRCOLANTI DI ADIPOCHINE

I livelli circolanti di leptina e adiponectina sono stati determinati soltanto nel modello poligenico di obesità/diabete tipo 2, quale il topo HFD. Mediante metodo sandwich di dosaggio immunoenzimatico (ELISA) si è realizzata la misura quantitativa delle proteine murine (per leptina e adiponectina rispettivamente Biovendor, Heidelberg, Germania e B-Bridge International Inc., CA, USA). I coefficienti di variabilità intra- e inter-assay sono risultati inferiori al 5%.

PROFILO DI ESPRESSIONE DELLE ADIPOCHINE DA PARTE DEL TESSUTO ADIPOSO VISCERALE: ESTRAZIONE DELL'RNA E DETERMINAZIONE MEDIANTE PCR QUANTITATIVA REAL TIME.

L'estrazione totale di RNA è stata eseguita su 50 mg di tessuto adiposo viscerale. In seguito all'isolamento dei campioni, questi sono stati conservati in azoto liquido e sottoposti ad omogeneizzazione mediante apposito kit, in accordo con le istruzioni fornite dal produttore (QIAGEN GmbH, Hilden, Germania). In seguito a trattamento di 1 µg di RNA con il kit DNasi TURBO DNA-free (Ambion, Inc, Austin, TX, USA) e trascrizione inversa in cDNA per 1 ora a 37°C in una soluzione di 50 µl contenente buffer RT 1X, 150 ng di esameri random, 0.5 mmol/l dNTPs, 20 unità di inibitore della Ribonucleasi RNAsin (Promega Corporation, Madison, WI, USA) e 200 unità di M-MLV RT (Promega Corporation, Madison, WI, USA).

La PCR real time quantitativa è stata condotta mediante sistema di rilevamento continuo a fluorescenza della sequenza DNA Engine Opticon 2 (MJ Research, MA, USA) utilizzando il Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen Corporation, CA, USA) e 300 nM di specifico primer per ciascun gene: 18s 5'-CGG CTA CCA CAT CCA AGG AA-3' e 5'-GCT GGA ATT ACC GCG GCT-3'; per leptina 5'-TCC AGA AAG TCC AGG ATG ACA C-3' e 5'-CAC ATT TTG GGA AGG CAG G-3'; per adiponectina 5'-ACA ATG GCA CAC CAG GCC GTG A-3' e 5'-AGC GGC TTC TCC AGG CTC TCC TTT-3'. Ciascun campione di cDNA è stato analizzato in duplicato ed i valori di espressione genica sono stati normalizzati utilizzando i valori ottenuti con l'RNA ribosomiale 18S ed espressi come AU ratio.

ANALISI DEI CAMPIONI EMATICI ED URINARI E VALUTAZIONE DELLA INSULINORESISTENZA

I valori glicemici sono stati determinati al mattino, in condizioni di digiuno. I campioni ematici, ottenuti attraverso la vena della coda, sono stati dosati mediante glucometro Accu-Chek Aviva Nano (Roche). I valori di HbA1c sono stati determinati utilizzando 5 µl di sangue intero mediante il kit A1CNow⁺ (Bayer). Infine è stato condotto anche un esame colorimetrico delle urine per valutare e quantificare la presenza di glicosuria (AUTION Sticks 10TA; Arkray, Inc, Kyoto, Giappone). L'insulinoreistenza è stata valutata mediante l'indice HOMA-IR sulla base del modello matematico HOMA (HOMeostasis Model Assessment of Insulin Resistance) in base alla seguente equazione: (glicemia a digiuno, mmol/L x insulinemia a digiuno, pmol/L/135) (38).

ANALISI STATISTICA

Le differenze statisticamente significative tra casi e controlli sono state valutate mediante Test t di Student. Valori di $p < 0.05$ sono stati considerati statisticamente significativi. I valori, dove non altrimenti specificato, si intendono espressi come media \pm errore standard (SE).

RISULTATI

ESPRESSIONE IN VITRO E IN VIVO DI EXENDIN-4

Mediante una procedura a 4 plasmidi è stato generato un vettore ricombinante AAV5 CMV NGF contenente la sequenza genica di Exendin-4 (AAV5 Ex-4). Allo scopo di facilitarne la sintesi e secrezione, il minigene di Exendin-4 è stato inserito in posizione adiacente al peptide segnale del fattore di crescita murino del nervo (NGF), che è stato a sua volta modificato in modo da consentirne il clivaggio da parte della proteasi furina. La titolazione virale è risultata

pari a 5×10^{12} DRP/ml. L'efficacia del vettore AAV5 Ex-4 nella trasduzione, espressione, secrezione e l'attività biologica di Exendin-4 è stata valutata *in vitro* ed in esperimenti pilota *in vivo*. Esperimenti preliminari *in vitro* avevano suggerito una possibile secrezione, da parte di cellule in coltura, della proteina chimerica.

Culture semiconfluenti di cellule embrionali di rene umano 293T, ottenute dall'American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA), sono state incubate con il vettore AAV5 Ex-4 e 96 ore dopo, il terreno di coltura cellulare è stato testato su una linea cellulare ovarica di criceto cinese esprimente il recettore per il GLP-1 (CHO-GLP1R) per la valutazione dell'attività biologica *in vitro*, in accordo con la procedura precedentemente descritta e pubblicata da Egan JM (35), che ha contribuito alla realizzazione di questo esperimento. Nel medium delle cellule 293T trasfettate è stata riscontrata una concentrazione media di Exendin-4 pari a 38.3 ± 10.4 pmol/L. Con l'espressione della proteasi furina, ottenuta mediante trasfezione plasmidica, il livelli medi di Exendin-4 nel terreno di coltura sono significativamente incrementati fino a 75.6 ± 11.0 pmol/L. Questi risultati *in vitro* hanno dimostrato che il vettore ricombinante AAV5 Ex-4 è in grado di determinare l'espressione di Exendin-4 nelle colture cellulari e che la proteina espressa viene ad essere rilasciata a livello extracellulare. I livelli di Exendin-4 riscontrati nel terreno di coltura sono a valori terapeutici, inoltre l'espressione transgenica della proteasi furina è risultata in grado di incrementare ulteriormente la concentrazione di Exendin-4 nel medium di coltura. Questa osservazione suggerisce che le cellule 293T presentino un'attività della proteasi a livelli non ottimali per la maturazione della sequenza peptidica di Exendin-4. Studi pilota *in vivo*, eseguiti su topi Balb/cJ (n=4) e su ratti Wistar (n=2), trasfettando le ghiandole salivari con una dose (50 μ l) di vettore ricombinante AAV5 Ex-4 ad una concentrazione rispettivamente di 10^{11} e 5×10^{11} DRP/ml, hanno confermato a distanza di 6 settimane dal trattamento la presenza di Exendin-4. L'efficacia del vettore AAV-5 è stata quindi testata *in vivo* su due diversi modelli di obesità/diabete tipo 2, quali i topi HFD (n=20) e ratti Zucker fa/fa (n=10).

Mediante singola iniezione transcutanea di 50 µl di vettore ricombinante AAV-5 contenente la sequenza genica di Exendin-4 (5×10^{12} DRP/ml) sono state trasfettate le ghiandole sottomandibolari di n=10 topi HFD di 8 settimane e di n=5 ratti Zucker fa/fa di 9 settimane. Gli animali di controllo (n=10 topi HFD di 8 settimane e n=5 ratti Zucker fa/fa di 9 settimane) hanno ricevuto, sempre mediante singola somministrazione transcutanea 50 µl di vettore ricombinante AAV-5, privo della sequenza di Exendin-4 (vettore vuoto). Nei topi HFD sottoposti a trasfezione con AAV5 Ex-4, Exendin-4 ha raggiunto, 6 settimane dopo il trattamento, una concentrazione media circolante pari a 138.9 ± 42.3 pmol/L. Nei ratti Zucker fa/fa trasfettati i livelli di Exendin-4 sono risultati pari a 238.2 ± 72 pmol/L alla settimana 4 ed a 3.25 nmol/L a 8 settimane dalla trasfezione. Negli animali di controllo, le concentrazioni medie circolanti di Exendin-4 sono risultate inferiori a 2.6 pmol/L, sotto il limite di rilevabilità del kit di dosaggio (**Figura 1**).

L'attività biologica di Exendin-4 è stata quindi verificata su cellule CHO/GLP-1R (dati non mostrati).

ANALISI DI BIODISTRIBUZIONE TISSUTALE DEL VETTORE ED ESPRESSIONE IN VIVO DI EXENDIN-4

Allo scopo di valutare la biodistribuzione tissutale del vettore ricombinante AAV5 CMV NGF contenente la sequenza genica di Exendin-4 (AAV5 Ex-4), da campioni tissutali di ghiandole salivari, fegato, milza e pancreas dei topi HFD (n=5 casi e n=5 animali naïve) sono stati estratti campioni di DNA. Questi campioni sono stati analizzati mediante amplificazione con PCR quantitativa utilizzando primer specifici per la sequenza promoter del CMV contenuta nel vettore utilizzato.

In animali naïve sono stati riscontrati livelli di background pari 55 ± 29 copie/100 ng di DNA estratto dalle ghiandole salivari. Nelle ghiandole salivari dei topi trattati il numero di copie

virali è risultato 60 volte superiore (3551 ± 1618 copie/100 ng di DNA). Il numero di copie virali in altri tessuti come il fegato (rispettivamente negli animali naïve e trattati, 89 ± 46 vs 154 ± 56 copie/100 ng di DNA), milza (29 ± 3 vs 65 ± 23 copie/100 ng di DNA) e pancreas (78 ± 39 vs 104 ± 47 copie/100 ng di DNA) sono risultate vicino ai livelli di background.

L'espressione di Exendin-4 da parte del tessuto ghiandolare salivare è stata inoltre confermata tramite immunoistochimica. Su sezioni di ghiandole salivari di topi HFD trattati con AAV5 Ex-4 ($n = 5$) ed rispettivi controlli ($n = 5$), sacrificati 6 settimane dopo il trattamento, è stato possibile rilevare l'espressione di Exendin-4 solo nei preparati degli animali sottoposti a trasfezione con il vettore AAV-5 contenente la sequenza di Exendin-4. In particolare, l'espressione della proteina transgenica è stata determinata soltanto nelle cellule salivari duttali, in accordo con lo specifico tropismo tissutale del vettore AAV-5 (**Figura 2**).

EFFETTI SULL'INCREMENTO PONDERALE DI TOPI HFD E RATTI ZUCKER fa/fa TRATTATI CON IL VETTORE AAV5 CONTENENTE LA SEQUENZA DI EXENDIN-4

Mediante singola iniezione transcutanea di 50 μ l di vettore ricombinante AAV-5 contenente la sequenza genica di Exendin-4 (5×10^{12} DRP/ml) sono state trasfettate le ghiandole sottomandibolari di $n=10$ topi HFD di 8 settimane e di $n=5$ ratti Zucker fa/fa di 9 settimane. Gli animali di controllo ($n=10$ topi HFD di 8 settimane e $n=5$ ratti Zucker fa/fa di 9 settimane) hanno ricevuto, sempre mediante singola somministrazione transcutanea, 50 μ l di vettore ricombinante AAV-5 privo della sequenza di Exendin-4 (vettore vuoto). Le caratteristiche basali degli animali (casi e controlli) sono riportati in **Tabella 1**.

Al basale non sono state riscontrate differenze significative tra i topi HFD trattati con vettore AAV5 Ex-4 ed i rispettivi controlli, per quanto riguarda peso, glicemia a digiuno, HbA1c, insulinemia, indice HOMA-IR, presenza di glicosuria ed introito giornaliero di cibo. Sia gli animali trattati sia i controlli, sottoposti a dieta a elevato contenuto di grassi (HFD), hanno

mostrato un progressivo incremento ponderale per tutta la durata dello studio. Alla fine dell'esperimento, 6 settimane dopo la trasfezione, i topi AAV-5 Ex-4 hanno dimostrato un aumento ponderale significativamente inferiore rispetto a quello degli animali di controllo (**Figura 3A**).

Al basale non sono state riscontrate differenze significative tra i ratti Zucker fa/fa trattati con vettore AAV5 Ex-4 ed i rispettivi controlli, per quanto riguarda peso, glicemia a digiuno, HbA1c, insulinemia, indice HOMA-IR, presenza di glicosuria ed introito giornaliero di cibo (**Tabella 1**). Questi animali hanno ricevuto un mangime standard per tutta la durata dell'esperimento che si è concluso 8 settimane dopo la trasfezione. Alla settimana 5 dal trattamento, i ratti Zucker fa/fa sottoposti a trasfezione con vettore AAV5 Ex-4 hanno mostrato un aumento ponderale significativamente inferiore rispetto a quello degli animali di controllo. Questa differenza, statisticamente significativa, si è mantenuta per tutta la durata dello studio (**Figura 3B**).

Nel corso dello studio sono state riportate differenze statisticamente significative nell'introito alimentare giornaliero soltanto transitoriamente nei ratti Zucker fa/fa (**Figura 4B**), ma non nei topi HFD (**Figura 4A**). Alla settimana 4, l'introito alimentare giornaliero medio dei ratti Zucker fa/fa sottoposti a trattamento con vettore AAV-5 Ex-4 è risultato statisticamente inferiore a quello degli animali di controllo. Questa osservazione è stata confermata anche dai risultati del test di valutazione a breve termine dell'introito alimentare, a partire dai 75' negli animali trattati si osserva un consumo significativamente inferiore di cibo rispetto a quanto osservato nei controlli (**Figura 5**).

EFFETTI SUI LIVELLI CIRCOLANTI E SULL'ESPRESSIONE DA PARTE DEL TESSUTO ADIPOSO VISCERALE DI LEPTINA E ADIPONECTINA

Il trattamento con il vettore ricombinante AAV5 Ex-4 ha determinato, 6 settimane dopo la trasfezione, oltre ad un ridotto incremento ponderale, anche dei livelli circolanti di leptina significativamente minori nei topi HFD trattati rispetto ai controlli (2.24 ± 0.39 versus 5.89 ± 1.07 ng/ml; $p < 0.01$). Non sono state invece rilevate differenze significative per quanto riguarda i livelli circolanti di adiponectina (9.75 ± 0.69 versus 10.57 ± 0.97 mg/l; $P = \text{NS}$). I ridotti livelli circolanti di leptina documentati nei topi HFD trattati con AAV5 Ex-4 sono risultati correlati ad una significativa riduzione dell'espressione di RNA messaggero dell'adipochina nel tessuto viscerale adiposo rispetto ai controlli (3.43 ± 0.48 versus 8.28 ± 0.72 Arbitrary Unit, AU; $p < 0.01$). Non sono state invece documentate differenze nell'espressione di RNA messaggero da parte del tessuto adiposo viscerale per quanto riguarda l'adiponectina (8.28 ± 0.72 versus 8.95 ± 1.8 AU; $P = \text{NS}$).

EFFETTI SULL'OMEOSTASI GLICEMICA DI TOPI HFD E RATTI ZUCKER fa/fa TRATTATI CON IL VETTORE AAV5 CONTENENTE LA SEQUENZA DI EXENDIN-4

Topi CD1 sottoposti ad una dieta ad elevato consumo di grassi, sviluppano diabete tipo 2 a partire dalla 12[°] settimana. Allo scopo di rilevare effetti precoci del trattamento con vettore ricombinante AAV5 Ex-4 sullo sviluppo di insulinoresistenza, si è deciso pertanto di eseguire un test intraperitoneale di tolleranza all'insulina (ITT). Ciascun animale è stato mantenuto a digiuno per un periodo di 4 ore. Non sono state riscontrate differenze significative nei valori di glicemia a digiuno, glicosuria e HbA1c. Dopo 6 settimane dal trattamento, in seguito all'iniezione intraperitoneale di insulina (Humulin R, Lilly) alla dose di 1.0 UI/kg, i topi HFD trattati con AAV-5 Ex-4 hanno mostrato una maggiore riduzione della glicemia a 15,30 e 60 minuti rispetto a quanto osservato negli animali di controllo (**Figura 6**).

I corrispondenti valori di area sotto la curva per andamento della glicemia (AUC per glicemia) durante il test ITT hanno confermato questa osservazione (rispettivamente nei

trattati rispetto ai controlli, 333.7 ± 14.2 vs. 378 ± 12.3 mM per minuto; $p < 0.05$). Non sono state documentate nel corso dello studio variazioni significative dei valori di glicemia a digiuno, glicosuria e HbA1c, mentre i livelli circolanti di insulina e i valori di HOMA-IR index sono risultati significativamente minori nei casi rispetto ai controlli (**Tabella 2**).

Per quanto riguarda i ratti Zucker fa/fa, nel corso dello studio sono state rilevate differenze significative per quanto riguarda i valori di HbA1c e glicosuria tra casi e controlli. A 8 settimane dalla trasfezione i ratti trattati con vettore AAV5 Ex-4 hanno presentato valori significativamente minori di HbA1C (4.7 ± 0.1 versus $5.0 \pm 0.1\%$; $p < 0.05$) e la presenza di glicosuria è stata documentata in 4 ratti di controlli ed in nessun ratto Zucker fa/fa trattato con vettore AAV5 Ex-4.

In accordo con il basso profilo di rischio ipoglicemico di Exendin-4, non sono state rilevate differenze significative nei valori di glicemia a digiuno durante la durata dello studio. Si sottolinea, inoltre, come alla fine dell'esperimento i livelli di insulinemia a digiuno e di indice HOMA-IR siano risultati significativamente minori nei ratti trattati rispetto ai controlli (**Tabella 2**).

DISCUSSIONE

I meccanismi fisiopatologici alla base dell'azione di Exendin-4 sul peso corporeo non sono stati ancora pienamente delucidati. Un effetto periferico sul rallentamento dello svuotamento gastrico e/o un'azione centrale sulla regione ipotalamica deputata al controllo del comportamento alimentare potrebbero spiegare il modesto, ma significativo calo ponderale osservato durante il trattamento con Exendin-4.

In questo esperimento la persistente secrezione a livelli farmacologici, ottenuta mediante trasfezione con vettore ricombinante AAV-5, si è dimostrata significativamente efficace nel determinare un minor aumento ponderale ed un miglioramento dell'omeostasi glicidica di due

diversi modelli murini di obesità e diabete tipo 2. I livelli circolanti ottenuti sono risultati superiori a quanto riportato per il GLP-1 endogeno in seguito all'ingestione di un pasto (40 pmol/l) (39) e a quanto riportato per Exendin-4 durante gli studi clinici con una dose di 10µg (50 pmol/l) (40). L'azione di riduzione dell'incremento del peso corporeo potrebbe spiegare il miglioramento della sensibilità insulinica evidenziato a fine studio nei topi sottoposti a trattamento con AAV5 Ex-4. Tuttavia un'azione insulinosensibilizzante diretta di Exendin-4 non può essere esclusa. In alternativa, il miglioramento del grado di insulinoresistenza potrebbe essere ascrivibile all'azione inibitoria della molecola sulla secrezione di glucagone. Gli effetti di riduzione dell'introito alimentare medio giornaliero, documentati soltanto in modo transitorio nei ratti, 4 settimane dopo il trattamento e confermati dall'evidenza di una maggiore sazietà durante il test di valutazione dell'introito alimentare a breve termine, richiedono ulteriori conferme. Le oggettive limitazioni nell'accuratezza nelle misurazioni del consumo medio giornaliero di cibo potrebbero, infatti, aver limitato la capacità di rilevare una differenza nell'introito alimentare sufficiente a determinare degli effetti sul peso corporeo a lungo termine. Infine, anche se l'espressione tessuto-specifica persistente di Exendin-4, ha determinato effetti metabolici in assenza di severi effetti collaterali, dobbiamo sottolineare alcune limitazioni relative al profilo di sicurezza a lungo termine di questo farmaco nei roditori, strettamente correlate alla possibile induzione di tumori tiroidei a cellule C. Questa osservazione, pur non essendo stata confermata nell'uomo, dove l'espressione del recettore per il GLP-1 da parte delle cellule C è significativamente minore rispetto a quanto riscontrato nei roditori, richiede tuttavia un'attenta valutazione degli effetti a lungo termine di un'esposizione cronica (41).

CONCLUSIONI

I GLP-1 RA rappresentano allo stato attuale uno tra i più promettenti approcci terapeutici per il trattamento del diabete tipo 2. L'efficacia sul controllo glicemico e gli effetti positivi sul peso corporeo sono stati ampiamente e robustamente documentati (42-44). Uno studio clinico in fase II ha mostrato la potenziale efficacia e sicurezza dell'uso di GLP-1 RA nel trattamento dell'obesità, anche se, attualmente tale patologia non è tra le indicazioni terapeutiche approvate (45).

I GLP-1 RA hanno mostrato anche numerosi effetti extraglicemici sul profilo lipidico, pressorio, sulla funzione endoteliale e sul sistema cardiovascolare in generale, effetti in parte determinati dal miglioramento del controllo glicometabolico/ponderale ed in parte sostenuti da un'azione diretta del farmaco e/o dei suoi metaboliti (10).

Il miglioramento del controllo metabolico senza un aumento del rischio di ipoglicemia, unitamente alle sempre maggiori evidenze circa le azioni extraglicemiche suggeriscono potenziali benefici dei GLP-1 RA sul profilo di rischio cardiovascolare. I risultati degli studi clinici attualmente in corso saranno disponibili a partire dal 2016, a meno che non vengano prematuramente interrotti per manifestata superiorità o inferiorità del trattamento. Nel frattempo, l'unica fonte di evidenza scientifica è rappresentata da trial clinici in genere di fase III, con obiettivi metabolici, che riportino gli eventi cardiovascolari maggiori come eventi avversi severi. Una metanalisi condotta dal nostro gruppo di ricerca ha evidenziato come il trattamento con GLP-1 RA, negli studi placebo-controllati, si associ ad una riduzione significativa degli eventi cardiovascolari maggiori nel breve e medio termine (11).

Il costo e la necessità di iniezioni sottocutanee mono- o bi-giornaliere limitano l'utilizzo terapeutico di questi farmaci nella terapia del diabete tipo 2. Per tale motivo, la ricerca si è concentrata nello sviluppo di GLP-1 RA a lunga durata di azione. La Food and Drug Administration (FDA) e la European Medicines Agency (EMA) hanno recentemente

approvato una formulazione a lento rilascio di Exenatide (Exenatide LAR), da somministrarsi una volta alla settimana per via iniettiva sottocutanea, previa ri-sospensione del principio attivo. La FDA aveva precedentemente negato, per ben due volte nel 2010, l'autorizzazione all'immissione del farmaco nel mercato, a causa di possibili effetti proaritmogeni, richiedendo ulteriori approfondimenti per quanto riguarda anche i possibili effetti sull'incidenza di carcinoma midollare della tiroide e pancreatite acuta. Studi clinici di fase III hanno mostrato un'efficacia antiperglicemica superiore per Exenatide LAR (Bydureon) rispetto a Exenatide (Byetta), a parità di effetti sul peso corporeo e con un buon profilo di tollerabilità (13).

Taspoglutide, un altro GLP-1 RA a lunga durata di azione a somministrazione settimanale, ha recentemente dimostrato un'efficacia superiore a quella di Exenatide (Byetta) in termini di riduzione dei valori di HbA1c, a parità di effetti sul peso. Tuttavia questa formulazione a lento rilascio di Taspoglutide ha mostrato, in questo come in altri studi clinici di fase III, un inaccettabile profilo di tollerabilità, caratterizzato da un significativo aumento dell'incidenza di nausea/vomito e di reazioni allergiche locali e sistemiche (14). Proprio il profilo di tollerabilità delle formulazioni dovrà essere attentamente considerato anche per gli altri GLP-1 RA a lunga durata di azione attualmente in fase di sviluppo (Albiglutide e Dulaglutide).

La terapia genica, mediante l'inserimento di materiale genetico nelle cellule, è in grado di garantire una espressione persistente del gene terapeutico. Mediante vettori plasmidici ed adenovirali si è indotta finora, una secrezione di GLP-1 RA in tessuti fisiologicamente non deputati alla secrezione (46-48) e/o indispensabili per la sopravvivenza (16,48-50). Tuttavia entrambi questi sistemi hanno dimostrato efficacia nel breve termine, con un limitato profilo di sicurezza dovuto alla necessità di utilizzare elevate dosi di vettore. Recentemente Voutekakis A (51) ha dimostrato che la trasduzione delle ghiandole salivari di un modello murino di diabete mediante vettore adenovirale contenente la sequenza genica del GLP-1, è in grado di determinare una moderata riduzione a breve termine della glicemia, senza effetti significativi sui livelli circolanti di HbA1c. Questa osservazione conferma che l'efficacia

terapeutica dei sistemi basati su vettori adenovirali non è sostenuta nel medio e lungo termine. L'utilizzo nel vettore della sequenza di Exendin-4 al posto del GLP-1 presenta alcuni vantaggi, proprio in considerazione della sua maggiore emivita plasmatica (16).

Il presente studio ha documentato, per la prima volta, una persistente secrezione di livelli farmacologici di Exendin-4 da parte delle ghiandole salivari di due diversi modelli murini di obesità e diabete tipo 2 mediante l'utilizzo di vettori AAV-5. Questi vettori, rispetto a quelli adenovirali e retrovirali, oltre a garantire una espressione transgenica persistente nel lungo periodo, hanno mostrato anche un maggior profilo di sicurezza e tollerabilità, tanto essere attualmente in fase avanzata di sperimentazione per il trattamento di diverse patologie retiniche, neurodegenerative, neuromuscolari, emofilia B, artrite reumatoide e scompenso cardiaco severo (27).

In questo esperimento, i persistenti livelli farmacologici di Exendin-4, si sono dimostrati efficaci nel determinare un minor incremento ponderale ed un miglioramento dell'omeostasi glicidica di due diversi modelli murini di obesità e diabete tipo 2. Ulteriori studi sono necessari per valutare se questo innovativo approccio terapeutico per il trattamento dell'obesità e del diabete tipo 2, scarsamente invasivo, senza rilevanti effetti collaterali e senza il coinvolgimento di organi indispensabili per la vita, possa essere applicato alla specie umana. In attesa di un consolidamento delle attuali conoscenze, questo sistema offre la possibilità di ottenere, in modo semplice (una singola iniezione transcutanea) e relativamente non costoso, dei modelli animali esposti in cronico a dosi terapeutiche di Exendin-4, modelli particolarmente interessanti per lo studio, ad esempio, degli effetti extra-glicemici del farmaco sui diversi organi ed apparati.

Tabella 1. Caratteristiche basali dei topi High-Fat Diet (HFD) (n=20) e dei ratti Zucker fa/fa (n=10).

	Controlli Topi HFD	AAV5 Ex-4 Topi HFD	p*	Controlli Ratti Zucker fa/fa	AAV5 Ex-4 Ratti Zucker fa/fa	p*
n	10	10		5	5	
Peso(g)	23.3±1.9	23.1±1.6	p>0.05	290.6±26.2	294.2±28.5	p>0.05
Glicemia a digiuno (mmol/L)	4.6±0.8	4.7±0.6	p>0.05	5.1±0.8	5.3±0.8	p>0.05
Insulinemia (pmol/L)	82.1±5.3	86.1±7.2	p>0.05	1456.3±182.2	1528.5±168	p>0.05
HOMA-IR index (units)	2.8±0.3	3.0±0.4	p>0.05	55.1±5.6	60.0±7.2	p>0.05
HbA1c (%)	<4	<4	p>0.05	4.2±0.1	4.1±0.2	p>0.05
Glicosuria (n° positivi)	0	0	-	0	0	-
Introito di cibo (g/die)	2.9±0.8	3.1±0.5	p>0.05	27.8±2.8	29.0±3.0	p>0.05

* Controlli versus trattati.

Tabella 2. Caratteristiche finali dei topi High-Fat Diet, HFD (6 settimane dopo la trasfezione) e dei ratti Zucker fa/fa (8 settimane dopo la trasfezione).

	Controlli Topi HFD	AAV5 Ex-4 Topi HFD	p*	Controlli Ratti Zucker fa/fa	AAV5 Ex-4 Ratti Zucker fa/fa	p*
n	10	10		5	5	
Peso (g)	19.5±1.9	16.5±2.7	p<0.01	241.4±22.5	222±23.4	p<0.05
Glicemia a digiuno (mmol/L)	4.9±0.9	4.8±0.7	p>0.05	5.7±0.4	5.6±0.5	p>0.05
Insulinemia (pmol/L)	150.6±6.1	126.3±4.0	p<0.01	3862.9±320.3	3164.8±265	p<0.05
HOMA-IR index (units)	5.5±0.4	4.5±0.4	p<0.05	163.1±15.0	131.2±11.2	p<0.05
HbA1c (%)	4.2±0.2	4.1±0.2	p>0.05	5.0±0.1	4.7±0.1	p<0.05
Glicosuria (n° positivi)	0	0	-	4	0	p<0.05
Introito di cibo (g/die)	4.3±0.3	4.6±0.3	p>0.05	21.2±2.1	21.3±1.9	p>0.05

* Controlli versus trattati.

Figure 1. Concentrazioni circolanti di Exendin-4 nei topi High-Fat Diet (n=20) e nei ratti Zucker fa/fa (n=10). Valori espressi su scala logaritmica (pmol/L \pm Errore Standard).

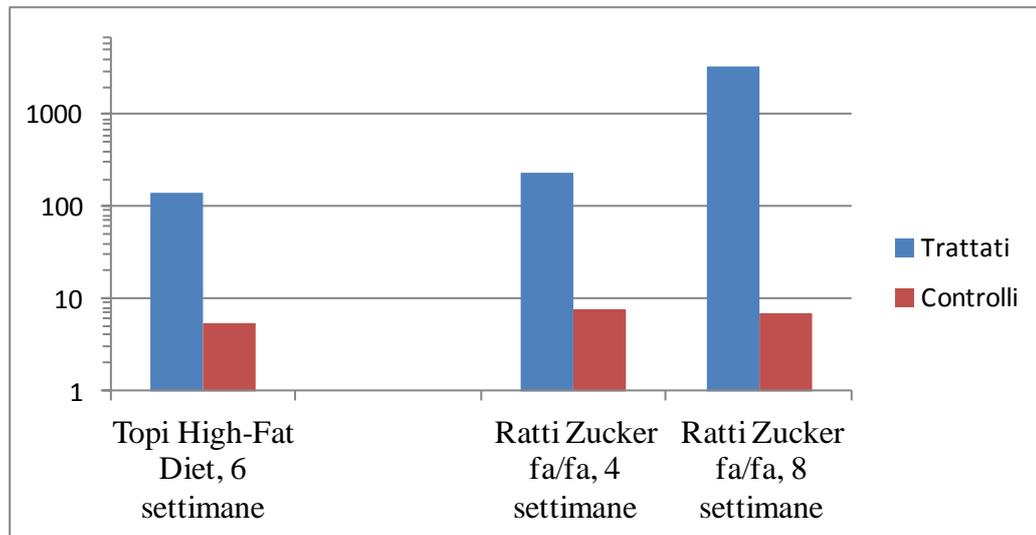


Figure 2. Immagine al microscopio a epifluorescenza delle ghiandole salivari in seguito ad immunistochemica contro Exendin-4 in topi High-Fat Diet sottoposti a trattamento con vettore AAV5 Ex-4 (Fig. A) e nei rispettivi controlli (Fig. B); barra = 20 μ m.

L'immagine è stata acquisita mediante microscopio a epifluorescenza Zeiss Axioskop ad un ingrandimento x40.

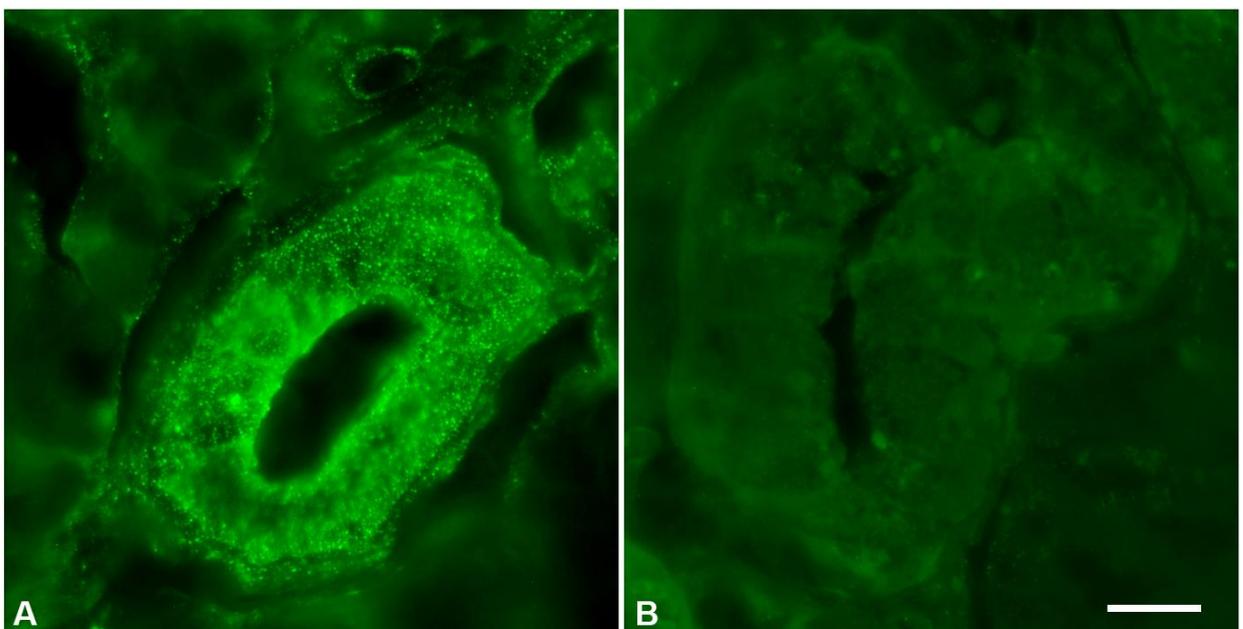
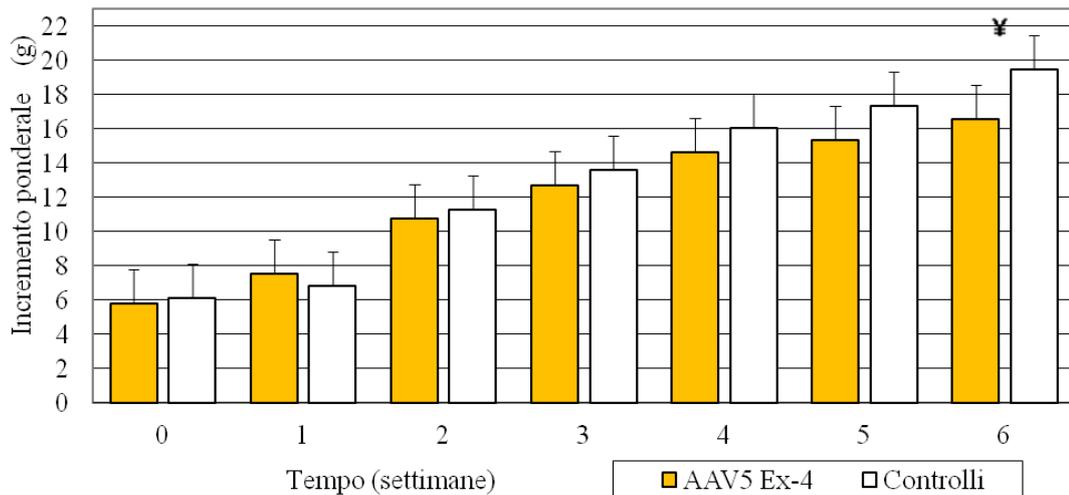


Figura 3. Incremento ponderale dei topi High-Fat Diet (n=20) e dei ratti Zucker fa/fa (n=10) nelle settimane successive alla trasfezione.

Il grafico rappresenta il valore medio (g) \pm Errore Standard. L'incremento ponderale è espresso dalla differenza (g) tra il peso medio in ciascun tempo dell'esperimento e il valore medio al basale

(A) Incremento ponderale nei topi High-Fat Diet nelle settimane successive alla trasfezione. Ciascun gruppo risulta costituito da n=10 animali. $\text{¥} = p < 0.01$.



(B) Incremento ponderale nei ratti Zucker fa/fa nelle settimane successive alla trasfezione. Ciascun gruppo risulta costituito da n=5 animali. $* = p < 0.05$.

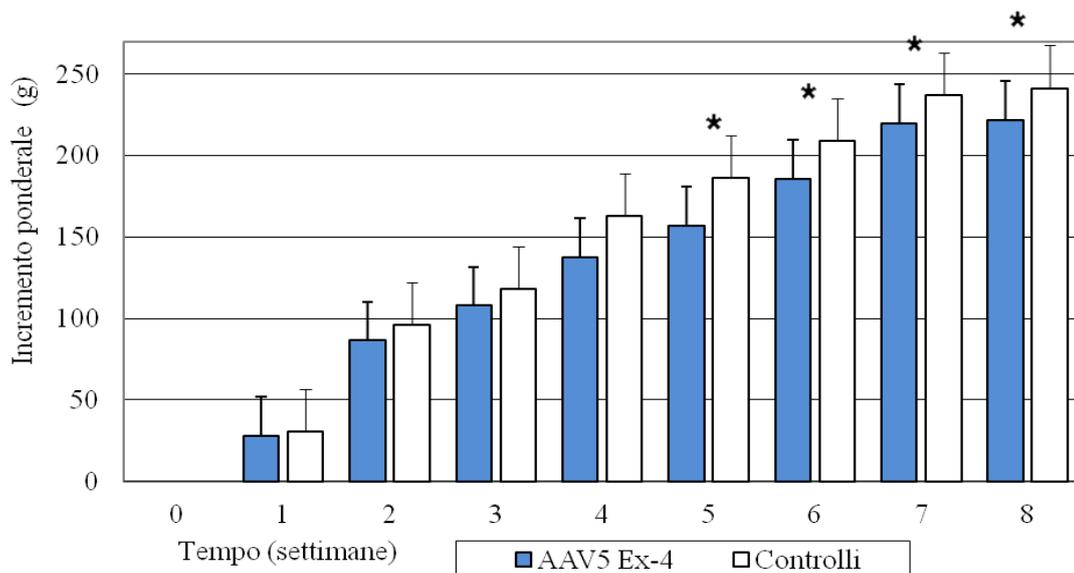
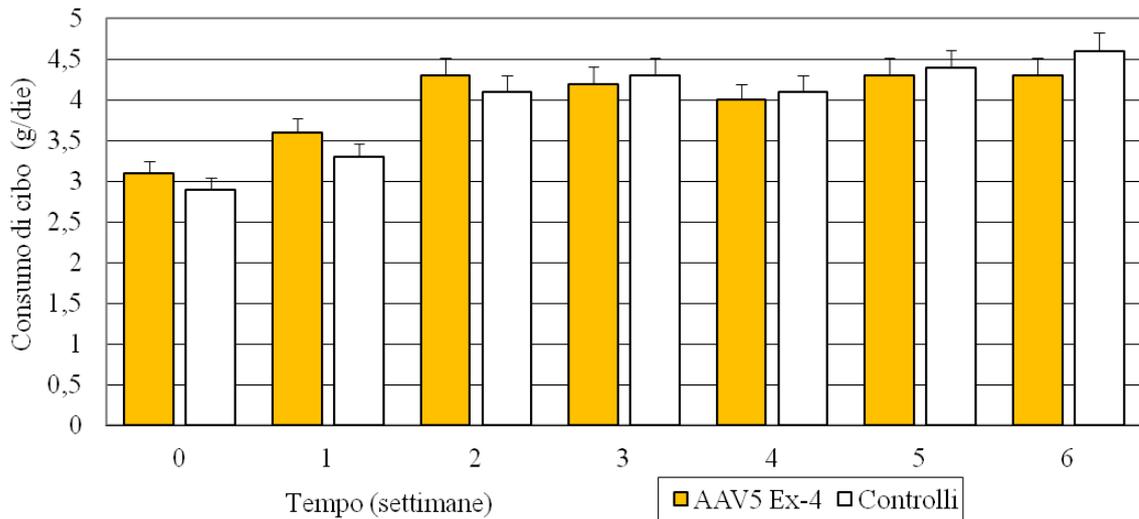


Figure 4. Consumo giornaliero medio di cibo nei topi High-Fat Diet (n=20) e nei ratti Zucker fa/fa (n=10) nelle settimane successive alla trasfezione.

I grafici rappresentano i valori medi (g/die) \pm Errore Standard.

(A) Consumo giornaliero medio di cibo nei topi High-Fat Diet nelle settimane successive alla trasfezione. Ciascun gruppo risulta costituito da n=10 animali.



(B) Consumo giornaliero medio di cibo nei ratti Zucker fa/fa nelle settimane successive alla trasfezione. Ciascun gruppo risulta costituito da n=5 animali. * $p < 0.05$.

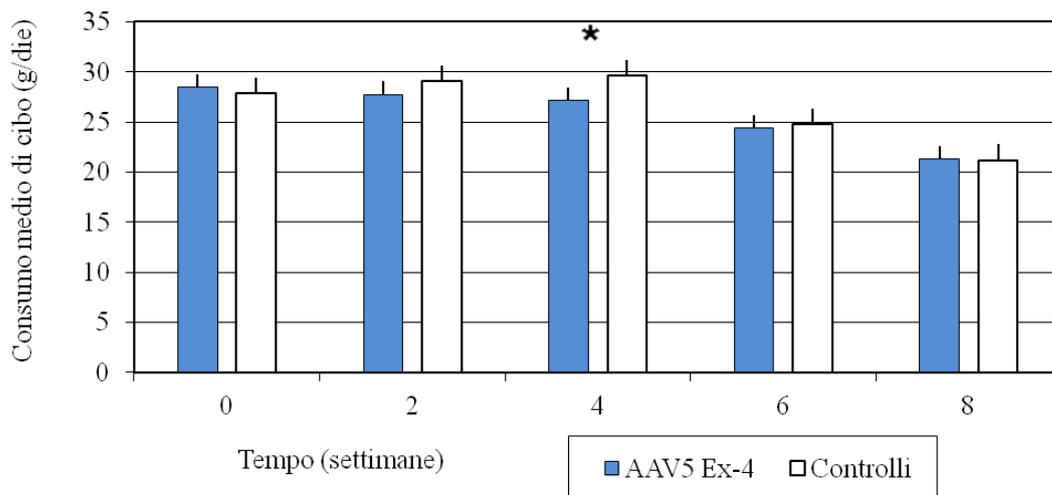


Figure 5. Test di valutazione dell'introito alimentare a breve termine, eseguito a 4 settimane dalla trasfezione, nei ratti Zucker fa/fa (n=10). Ciascun gruppo risulta costituito da n=5 animali.

Il grafico rappresenta i valori medi del consumo di cibo come differenza tra la quantità iniziale e quella residua durante ciascun punto del Test (g) ± Errore Standard. ¥ = p<0.01

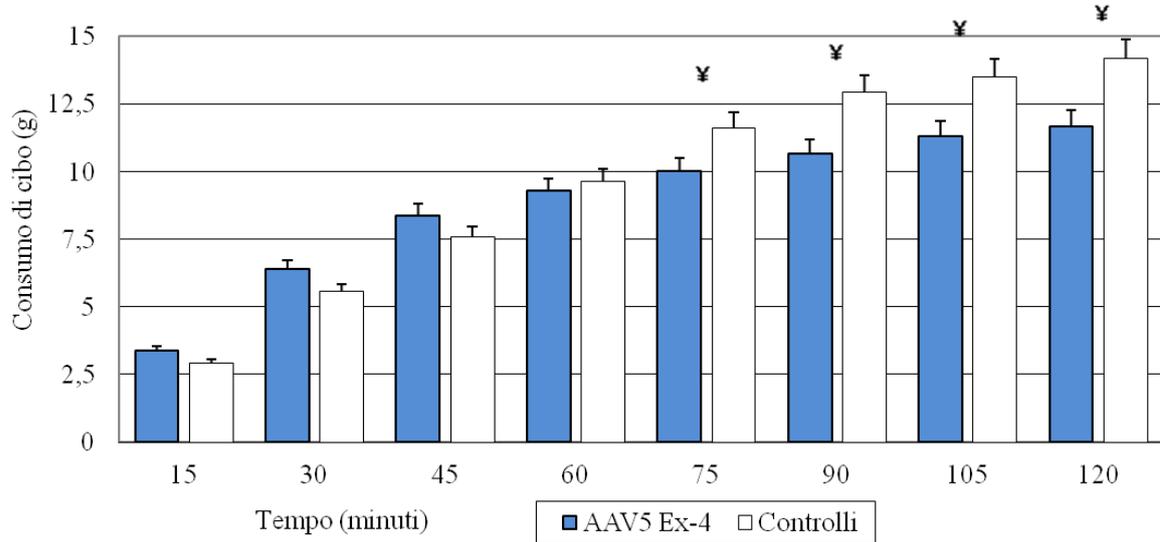
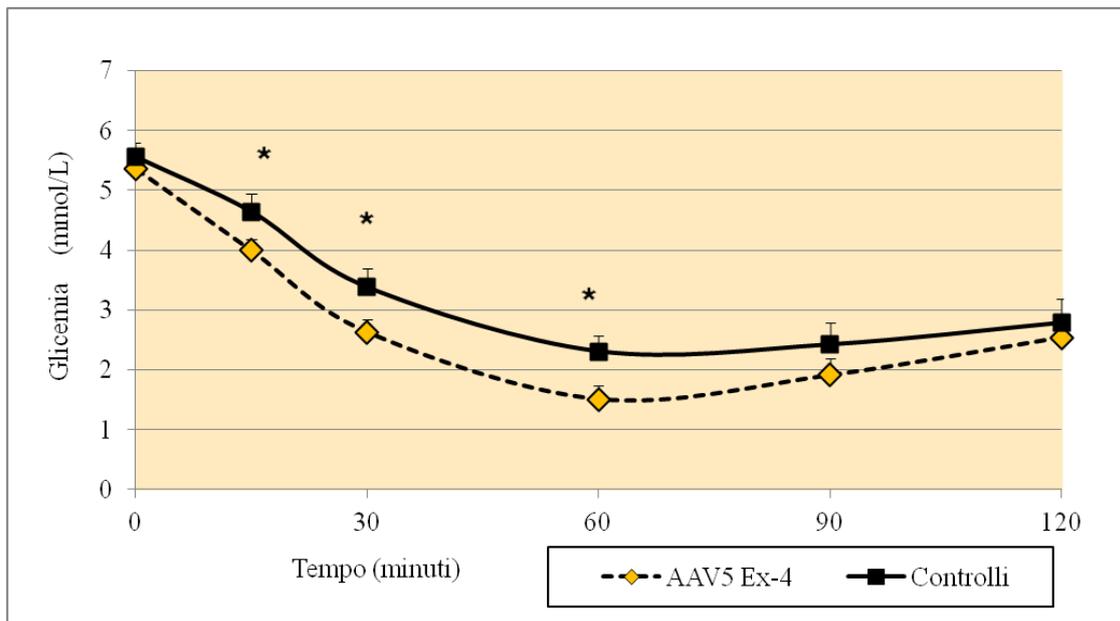


Figure 6. Test intraperitoneale di tolleranza all'insulina (ITT), eseguito a 6 settimane dalla trasfezione, nei topi High Fat-Diet (n=20).

Ciascun gruppo risulta composto da n=10 animali.

Il grafico rappresenta il valore glicemico medio (mmol/L) ± Errore standard durante ciascun punto del Test, in seguito all'iniezione intraperitoneale di insulina (Humulin R, Lilly) alla dose di 1.0 UI/kg. * = p<0.05.



Bibliografia

1. Parker HE, Reimann F, and Gribble FM. Molecular mechanisms underlying nutrient-stimulated incretin secretion. *Expert Rev Mol Med*. 2010;12:e1.
2. Gribble FM, RD Lawrence Lecture 2008: Targeting GLP-1 release as a potential strategy for the therapy of Type 2 diabetes. *Diabet Med*. 2008;25(8):889-94.
3. Mannucci E, Ognibene A, Cremasco F, Bardini G, Mencucci A, Pierazzuoli E, Ciani S, Fanelli A, Messeri G, and Rotella CM. Glucagon-like peptide (GLP)-1 and leptin concentrations in obese patients with Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med*. 2000;17(10):713-9.
4. Vilsbøll T, Krarup T, Deacon CF, Madsbad S, and Holst JJ. Reduced postprandial concentrations of intact biologically active glucagon-like peptide 1 in type 2 diabetic patients. *Diabetes*. 2001;50(3):609-13.
5. Zander M, Madsbad S, Madsen JL, and Holst JJ. Effect of 6-week course of glucagon-like peptide 1 on glycaemic control, insulin sensitivity, and beta-cell function in type 2 diabetes: a parallel-group study. *Lancet*. 2002;359(9309):824-30.
6. Deacon CF, Johnsen AH, Holst JJ. Degradation of glucagon-like peptide-1 by human plasma in vitro yields an N-terminally truncated peptide that is a major endogenous metabolite in vivo. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1995;80(3):952-957.
7. Eng J, Kleinman WA, Singh L, Singh G, Raufman JP. Isolation and characterization of exendin-4, an exendin-3 analogue, from *Heloderma suspectum* venom. Further evidence for an exendin receptor on dispersed acini from guinea pig pancreas. *The Journal of Biological Chemistry*. 1992;267(11):7402-7405.
8. Dicembrini I, Pala L, Rotella CM. From Theory to Clinical Practice in the Use of GLP-1 Receptor Agonists and DPP-4 Inhibitors. *Exp Diab Res*. 2011; 2011:898913.
9. Monami M, Dicembrini I, Marchionni N, Rotella CM, Mannucci E. Effects of glucagon-like peptide-1 receptor agonists on body weight: a meta-analysis. *Exp Diabetes Res*. 2012;2012:672658.
10. Mannucci E, Dicembrini I. Incretin-based therapies and cardiovascular risk. *Curr Med Res Opin*. 2012;28(5):715-21.
11. Monami M, Cremasco F, Lamanna C, Colombi C, Desideri CM, Iacomelli I, Marchionni N, Mannucci E. Glucagon-like peptide-1 receptor agonists and

- cardiovascular events: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Exp Diabetes Res.* 2011;2011:215764.
12. Dicembrini I, Mannucci E, Rotella CM. Bone: incretin hormones perceiver or receiver? *Exp Diabetes Res.* 2012;2012:519784.
 13. Drucker DJ, Buse JB, Taylor K, Kendall DM, Trautmann M, Zhuang D, Porter L; DURATION-1 Study Group. Exenatide once weekly versus twice daily for the treatment of type 2 diabetes: a randomised, open-label, non-inferiority study. *Lancet.* 2008 Oct 4;372(9645):1240-50.
 14. Rosenstock J, Balas B, Charbonnel B, Bolli GB, Boldrin M, Ratner R, Balena R; for the T-Emerge 2 Study Group. The Fate of Taspoglutide, a Weekly GLP-1 Receptor Agonist, Versus Twice-Daily Exenatide for Type 2 Diabetes: The T-Emerge 2 Trial. *Diabetes Care.* 2012 Nov 8.
 15. Rowzee AM, Cawley NX, Chiorini JA, Di Pasquale G. Glucagon-like peptide-1 gene therapy. *Exp Diabetes Res.* 2011;2011:601047. doi: 10.1155/2011/601047.
 16. Lee Y, Kwon MK, Kang ES, Park YM, Choi SH, Ahn CW, Kim KS, Park CW, Cha BS, Kim SW, Sung JK, Lee EJ, and Lee HC. Adenoviral vector-mediated glucagon-like peptide 1 gene therapy improves glucose homeostasis in Zucker diabetic fatty rats. *J Gene Med.* 2008;10(3):260-8
 17. Samson SL, Gonzalez EV, Yechoor V, Bajaj M, Oka K, and Chan L. Gene therapy for diabetes: metabolic effects of helper-dependent adenoviral exendin 4 expression in a diet-induced obesity mouse model. *Mol Ther.* 2008;16(11):1805-12. Erratum in: *Mol Ther.* 2009;17(10):1831
 18. Srivastava A. Adeno-associated virus-mediated gene transfer. *J Cell Biochem.* 2008;105(1):17-24.
 19. Asokan A, Samulski RJ. From crystal structure to clinic: highlights of the Tenth International Parvovirus Workshop. *Mol Ther.* 2005;11:656–60.
 20. Sumner-Jones SG, Davies LA, Varathalingam A, Gill DR, and Hyde SC. Long-term persistence of gene expression from adeno-associated virus serotype 5 in the mouse airways. *Gene Ther.* 2006;13(24):1703-13.
 21. Stieger K, Le Meur G, Lasne F, Weber M, Deschamps JY, Nivard D, Mendes-Madeira A, Provost N, Martin L, Moullier P, and Rolling F. Long-term doxycycline-regulated transgene expression in the retina of nonhuman primates following subretinal injection of recombinant AAV vectors. *Mol Ther.* 2006;13(5):967-75.

22. Niemeyer GP, Herzog RW, Mount J, Arruda VR, Tillson DM, Hathcock J, van Ginkel FW, High KA, and Lothrop Jr CD. Long-term correction of inhibitor-prone hemophilia B dogs treated with liver-directed AAV2-mediated factor IX gene therapy. *Blood*. 2009;113(4):797-806.
23. Daya S, and Berns KI. Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clin Microbiol Rev*. 2008;21(4):583-93.
24. Kerr JR, Linden RM. Human dependovirus infection, in Kerr JR, Cotmore SF, Bloom ME, Linden RM, Parrish CR, editors Parvoviruses, Hodder Arnold, London, UK, 2006; 381-5.
25. Simonelli F, Maguire AM, Testa F, Pierce EA, Mingozzi F, Bennicelli JL, Rossi S, Marshall K, Banfi S, Surace EM, Sun J, Redmond TM, Zhu X, Shindler KS, Ying GS, Ziviello C, Acerra C, Wright JF, McDonnell JW, High KA, Bennett J, and Auricchio A. Gene therapy for Leber's congenital amaurosis is safe and effective through 1.5 years after vector administration. *Mol Ther*. 2010;18(3):643-50.
26. Mandel R.J. CERE-110, an adeno-associated virus-based gene delivery vector expressing human nerve growth factor for the treatment of Alzheimer's disease. *Curr Opin Mol Ther*. 2010;12(2):240-7.
27. Diaz-Nido J. NLX-P101, an adeno-associated virus gene therapy encoding glutamic acid decarboxylase, for the potential treatment of Parkinson's disease. *Curr Opin Investig Drugs*. 2010;11(7):813-22.
28. Ortolano S, Spuch C, Navarro C. Present and future of adeno associated virus based gene therapy approaches. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov*. 2012 Jan;6(1):47-66.
29. Kwon I and Schaffer DV. Designer gene delivery vectors: molecular engineering and evolution of adeno-associated viral vectors for enhanced gene transfer. *Pharm Res*. 2008;25(3):489-99.
30. Katano H, Kok MR, Cotrim AP, Yamano S, Schmidt M, Afione S, Baum BJ, and Chiorini JA. Enhanced transduction of mouse salivary glands with AAV5-based vectors. *Gene Ther*. 2006;13(7):594-601
31. Voutetakis A, Bossis I, Kok MR, Zhang W, Wang J, Cotrim AP, Zheng C, Chiorini JA, Nieman LK, and Baum BJ. Salivary glands as a potential gene transfer target for gene therapeutics of some monogenetic endocrine disorders. *J Endocrinol*. 2005;185(3):363-72.

32. Baum BJ, Voutetakis A, Wang J. Salivary glands: novel target sites for gene therapeutics. *Trends Mol Med*. 2004; 10(12):585-90.
33. Passineau MJ, Fahrenholz T, Machen L, Zourelis L, Nega K, Paul R, MacDougall MJ, Mamaeva O, Steet R, Barnes J, Kingston HM, Benza RL. α -Galactosidase A expressed in the salivary glands partially corrects organ biochemical deficits in the fabry mouse through endocrine trafficking. *Hum Gene Ther*. 2011; 22(3):293-301.
34. Beutler AS, Banck MS, Bach FW, Gage FH, Porreca F, Bilsky EJ, and Yaksh TL. Retrovirus-mediated expression of an artificial beta-endorphin precursor in primary fibroblasts. *J Neurochem*. 1995;64(2):475-81.
35. Di Pasquale G, Rzadzinska A, Schneider ME, Bossis I, Chiorini JA, and Kachar B. A novel bovine virus efficiently transduces inner ear neuroepithelial cells. *Mol Ther*. 2005;11(6):849-55.
36. Doyle ME, Greig NH, Holloway HW, Betkey JA, Bernier M, and Egan JM. Insertion of an N-terminal 6-aminohexanoic acid after the 7 amino acid position of glucagon-like peptide-1 produces a long-acting hypoglycemic agent. *Endocrinology*. 2001;142(10):4462-8.
37. Breslin WL, Strohacker K, Carpenter KC, Esposito L, McFarlin BK. Weight gain in response to high-fat feeding in CD-1 male mice. *Lab Anim*. 2010;44(3):231-7.
38. Oana F, Takeda H, Hayakawa K, Matsuzawa A, Akahane S, Isaji M, Akahane M. Physiological difference between obese (fa/fa) Zucker rats and lean Zucker rats concerning adiponectin. *Metabolism*. 2005;54(8):995-1001.
39. Zhao J, Gillam ME, Taylor C, Weiler HA. Deposition of docohexaenoic acid (DHA) is limited in forebrain of young obese fa/fa Zucker rats fed a diet high in α -linoleic acid but devoid of DHA. *Journal of Nutritional Chemistry*. 2011;22:835–42.
40. Orskov C, Rabenhøj L, Wettergren A, Kofod H, Holst JJ. Tissue and plasma concentrations of amidated and glycine-extended glucagon-like peptide 1 in humans. *Diabetes* 1994; 43(4): 535–9
41. Kim D, MacConell L, Zhuang D, Kothare PA, Trautmann M, et al. Effects of once-weekly dosing of a long-acting release formulation of exenatide on glucose control and body weight in subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2007; 30(6): 1487–93.
42. Knudsen LB, Madsen LW, Andersen S, Almholt K, de Boer AS, Drucker DJ, et al. (2010). Glucagon-like Peptide-1 receptor agonists activate rodent thyroid C-cells causing calcitonin release and C-cell proliferation. *Endocrinology*. 151(4):1473-86.

43. Rotella CM, Pala L, and Mannucci E. Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) and metabolic diseases. *J Endocrinol Invest.* 2005;28(8):746-58.
44. Monami M, Marchionni N, and Mannucci E. Glucagon-like peptide-1 receptor agonists in type 2 diabetes: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Eur J Endocrinol.* 2009;160(6):909-17.
45. Deacon CF, Mannucci E, Ahren B. Glycaemic efficacy of glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors as add-on therapy to metformin in subjects with type 2 diabetes—a review and meta analysis. *Diabetes Obesity and Metabolism.* 2012;14 (8): 762-7
46. Astrup A, Rössner S, Van Gaal L, Rissanen A, Niskanen L, Al Hakim M, Madsen J, Rasmussen MF, and Lean ME; NN8022-1807 Study Group. Effects of liraglutide in the treatment of obesity: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Lancet.* 2009;374(9701):1606-16.
47. Kumar M, Hunag Y, Glinka Y, Prud'homme GJ, Wang Q. Gene therapy of diabetes using a novel GLP-1/IgG1-Fc fusion construct normalizes glucose levels in db/db mice. *Gene Ther.* 2007;14(2):162–72.
48. Liu R, Li Y, Hu R, Jin T, Deng S, et al. A site-specific genomic integration strategy for sustained expression of glucagon-like peptide-1 in mouse muscle for controlling energy homeostasis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;403(2):172–7.
49. Choi S, Oh S, Lee M, Kim SW. Glucagon-like peptide-1 plasmid construction and delivery for the treatment of type 2 diabetes. *Mol Ther.* 2005;12(5):885–91.
50. Lee YS, Shin S, Shigihara T, Hahm E, Liu MJ, et al. Glucagon-like peptide-1 gene therapy in obese diabetic mice results in long-term cure of diabetes by improving insulin sensitivity and reducing hepatic gluconeogenesis. *Diabetes.* 2007;56(6):1671–9.
51. Lee Y, Kwon MK, Kang ES, Park YM, Choi SH, et al. Adenoviral vector-mediated glucagon-like peptide 1 gene therapy improves glucose homeostasis in Zucker diabetic fatty rats. *J Gene Med.* 2008;10(3):260–8.
52. Voutetakis A, Cotrim AP, Rowzee A, Zheng C, Rathod T, Yanik T, Loh YP, Baum BJ, Cawley NX. Systemic delivery of bioactive glucagon-like peptide 1 after adenoviral-mediated gene transfer in the murine salivary gland. *Endocrinology.* 2010;151(9):4566-72.