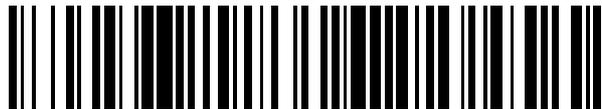


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 472 325**

51 Int. Cl.:

**A01N 37/18** (2006.01)

**A01N 43/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.11.2006 E 06838732 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.04.2014 EP 1954131**

54 Título: **Gen y proteína del adenovirus 36 E4 orf 1 y sus usos**

30 Prioridad:

**30.11.2005 US 741399 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**30.06.2014**

73 Titular/es:

**BOARD OF SUPERVISORS OF LOUISIANA  
STATE UNIVERSITY AND AGRICULTURAL AND  
MECHANICAL COLLEGE (50.0%)  
Pennington Biom. Res. Center 6400 Perkins  
Road, B1035 Pennington  
Baton Rouge, Louisiana 70808-4124, US y  
WAYNE STATE UNIVERSITY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**DHURANDHER, NIKHIL V.;  
HOLLAND, THOMAS C. y  
WANG, ZHONG Q.**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 472 325 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

**[0002]** El desarrollo de esta invención fue financiado parcialmente por el gobierno en virtud de un subsidio de los Institutos Nacionales de la Salud (*National Institutes of Health*) de Estados Unidos de América, subsidio nº R-01 DK066164. El gobierno posee determinados derechos sobre esta invención.

5

## CAMPO TÉCNICO

**[0003]** Esta invención se refiere a una composición y una composición para su uso en el aumento de sensibilidad a la insulina y la mejoría de los síntomas de la diabetes o para ayudar en la lipodistrofia usando la proteína del adenovirus tipo 36 E4 orf 1 o el gen que codifica esta proteína.

## ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

10

### *Infecctooesidad*

**[0004]** Debido a que la epidemia de la obesidad continúa sin detenerse, la infecctooesidad, la obesidad de origen infeccioso, ha recibido una mayor atención en los últimos años (1-3). Aunque hay muchos factores que contribuyen a la etiología de la obesidad, un subconjunto de la obesidad podría estar causada por infecciones. En las últimas dos décadas, se han descrito 10 patógenos que promueven la obesidad (4). Se describió cómo el primer virus humano , el adenovirus tipo 36 (Ad-36), causa la obesidad en animales infectados experimentalmente (5-7) y se demostró su asociación con la obesidad humana (8).

15

**[0005]** Aunque se reconoce que la obesidad es una enfermedad con múltiples etiologías, sólo recientemente la infección microbiana como un factor etiológico ha recibido atención. Se han descrito siete virus y un agente de la tembladera o scrapie que ocasionan obesidad en modelos animales (5-7, 10-20). No se ha determinado aún cuál de estos patógenos puede causar una obesidad en humanos. Se ha descrito cómo el adenovirus aviar SMAM-1 y el adenovirus humano tipo 36 (Ad-36) ocasionan adiposidad en modelos animales (5-7, 15 y 16) y muestran asociación con la obesidad humana (8 y 17). En experimentos *in vitro* se ha demostrado que la infección con Ad-36 de pre-adipocitos en ratas (3T3-L1) y pre-adipocitos humanos promueven su proliferación y

20

25

diferenciación (9). Recientemente se han descrito los efectos de promoción de la obesidad de Ad-5, otro adenovirus humano (20). Hasta la fecha, los adenovirus son el único tipo de virus relacionado con la obesidad humana. Por lo tanto, entre los patógenos adipogénicos constituyen los objetivos principales para la determinación de un papel en la obesidad humana.

## 5 **Adenovirus**

**[0006]** *Adenovirus:* En humanos, las infecciones con adenovirus son comunes (21) y causan infecciones agudas de las vías respiratorias altas, enteritis o conjuntivitis. La presencia de anticuerpos contra los adenovirus es común en la población en general (22). El ADN adenoviral se detecta en linfocitos asintomáticos de humanos adultos, y el número de células positivas aumenta con la edad de la persona (23 y 24). Existen seis subgrupos principales (A-F) entre los 50 adenovirus humanos. Cada subgrupo posee un cierto número de serotipos específicos. El adenovirus tipo 36 (Ad-36) pertenece al subgrupo D, serotipo 36. El Ad-36 es serológicamente diferente al compararse con 48 tipos de adenovirus humanos con excepción de una reacción cruzada débil con Ad-29 (25 y 26). Los adenovirus son virus de ADN no rodeado (27) que se replican en el núcleo de la célula hospedadora. En todos los serotipos, los genes que codifican las funciones específicas están ubicados en la misma posición en el cromosoma viral (28). El genoma comprende una molécula de ADN de doble hélice y linear sencilla, que comprende cinco unidades de transcripción tempranas (E1A, E1B, E2, E3 y E4), dos unidades de transcripción temprana retrasada (IX y IVa2) y una unidad tardía principal que genera cinco familias de mARNs (L1 a L5). Los serotipos de adenovirus muestran diversidad genética que se promueve mediante eventos de recombinación que ocurren comúnmente entre los adenovirus.

**[0007]** *Ciclo de replicación:* La mayoría de los estudios sobre la replicación se han realizado usando Ad-2 o Ad-5, ya que pueden cultivarse fácilmente en el laboratorio, ya sea infectando células HeLa o KB. Convencionalmente, el ciclo de replicación se divide en dos fases. Los eventos tempranos incluyen la adsorción, penetración, transcripción y traducción de un conjunto temprano de genes. Los productos del gen viral temprano actúan como mediadores en la expresión genética

viral, replicación del ADN, inducen la progresión del ciclo celular y bloquean la apoptosis. Una vez que se inicia la replicación del ADN viral, empieza la fase “tardía” con la expresión de los genes tardíos y el ensamblaje de los viriones de la progenie.

**[0008]**      *Adsorción y entrada:* El enlace de los adenovirus a las células está mediado por la proteína fibrosa. El dominio distal del carboxilo terminal de la proteína fibrosa termina en un botón que se piensa se enlaza al receptor celular (28). Se ha demostrado que la proteína del receptor Coxsackievirus-adenovirus (receptor CAR) funciona como una proteína de acoplamiento celular para los serotipos del adenovirus de los subgrupos A, C, D, E y F. Posteriormente, en un proceso que se ha demostrado es independiente de la interacción fibra-CAR, la proteína viral de la base pentona se enlaza a las integrinas celulares  $\alpha_v$  a través de un grupo tripéptido de la base pentona, seguida por la internalización de la partícula del virus. Sin embargo, los virus del grupo D podrían entrar a través de una ruta independiente de CAR, posiblemente por interacción directa de la base pentona e integrinas  $\alpha_v$ .

**[0009]**      *Activación de los genes virales tempranos:* Existen tres funciones principales para la expresión del gen adenoviral temprano: (1) inducir a la célula hospedadora a entrar en la fase “S” del ciclo celular para ofrecer condiciones óptimas para la replicación viral; (2) establecer sistemas virales que protejan la célula infectada de las defensas antivirales del organismo hospedador; y (3) sintetizar productos del gen viral para la replicación del ADN viral (28). A continuación se describe brevemente el papel de las diferentes proteínas adenovirales.

**[0010]**      *Proteínas E1A:* Una vez que el cromosoma viral llega al núcleo, E1A es la primera unidad de transcripción que se expresa. La transcripción E1A está controlada por un promotor constitutivo que también contiene un elemento estimulante duplicado. La unidad E1A codifica dos mARNs durante la fase temprana de infección y posteriormente 3 otras especies cuya función no se entiende completamente. Los dos mARNs tempranos codifican las proteínas 12S y 13S E1A, cuyo nombre se deriva del coeficiente de sedimentación de sus mARNs. Las proteínas E1A se conocen como transactivadores ya que pueden activar otros genes virales en trans. La proteína 13S E1A se

enlaza directamente a la proteína de enlace TATA y activa la transcripción. E1A también puede activar la transcripción enlazándose directamente a varios factores celulares como pRB, p300, ATF-2 y TBP. Los genes adenovirales tempranos se mantienen activos durante el ciclo de replicación viral aunque la velocidad de transcripción declina. E1A puede inducir a las células musculares-esqueléticas terminalmente diferenciadas a sintetizar ADN y dividirse. Esto también ocurre con los miocitos, adipocitos y miocardiocitos.

**[0011]** *Proteínas E1B:* La unidad de transcripción adenoviral E1B codifica dos proteínas diferentes, E1B 55-57 kDa y E1B 19-21 kDa, que bloquean la inhibición del crecimiento inducido por p53 y la apoptosis (28). Las proteínas E1B antagonizan la detención del crecimiento y la apoptosis y cooperan con E1A para transformar oncogénicamente las células cultivadas. Su papel en la transformación oncogénica demuestra la capacidad de estas proteínas de interferir con los reguladores celulares normales.

**[0012]** *Proteínas E2:* La región E2 está subdividida en E2A y E2B y codifica 3 proteínas. Estas proteínas proporcionan la maquinaria para la replicación del ADN viral. La proteína terminal (TP) actúa como un cebador para la iniciación de la síntesis de ADN. El gene DBP (proteína de enlace del ADN adenoviral) codifica la proteína de enlace del ADN y el gen pol codifica el ADN dependiente de la ADN polimerasa.

**[0013]** *Proteínas E3:* La unidad de transcripción del adenovirus E3 codifica siete proteínas, ninguna de las cuales se requiere para la replicación del virus en cultivo. Las proteínas de la unidad de transcripción E3 protegen a las células de la muerte mediada por las células citotóxicas T y las citoquinas inductoras de la muerte como el factor de necrosis tumoral (TNF), ligando FAS y ligando inductor de la apoptosis relacionada con TNF. Los estudios sobre el subgénero adenovirus C han demostrado que la mayoría de las proteínas E3 exhiben funciones inmunomoduladoras. La glicoproteína E3/19K previene la expresión de las moléculas MHC recién sintetizadas mediante la inhibición de la exportación de ER, mientras que los receptores de la proteína E3/10.4-14.5K regulan a la baja los receptores de la apoptosis desviándolos hacia los lisosomas. Se ha sugerido

que E3/49K, otra proteína E3 recién descubierta, posee una actividad inmunomoduladora. Las proteínas de membrana E3 explotan la maquinaria de tráfico intracelular para la evasión inmune. Los adenovirus podrían incluir proteínas E3 no descubiertas que explotan las vías de tráfico intracelular como un medio para manipular las moléculas claves de importancia inmunológica.

5 **[0014]** *Proteínas E4:* La región E4 incluye siete marcos de lectura abiertos (ORF). Algunos de estos codifican las proteínas que contribuyen a la regulación del ciclo celular. Se ha demostrado que los productos de varios E4 ORF participan en la transformación de la célula hospedadora.

**[0015]** *Proteína intermedia IVa2 y IX:* La proteína adenoviral IVa2 participa en el ensamblaje del adenovirus. La proteína IX es una proteína multifuncional que estabiliza la cápsida y posee  
10 actividad transcripcional.

**[0016]** *Transcripción tardía:* La transcripción de fase tardía está controlada principalmente por el promotor tardío principal. La transcripción a partir de este promotor implica una poliadenilación múltiple y división elaborada del ARN. Pueden identificarse cinco agrupamientos de genes (L1-L5) en esta región. Estos genes codifican principalmente las proteínas estructurales de  
15 virión. Al terminarse el ensamblaje del virus, se rompe la pared de la célula hospedadora y se liberan los viriones para nuevas infecciones. El ensamblaje completo del virus ocurre en las células permisivas.

### ***Adenovirus tipo 36 (Ad-36)***

**[0017]** En 1978, se aisló el Ad-36 por primera vez en Alemania, en las heces de una niña de 6  
20 años que padecía diabetes y enteritis (26). El Ad-36 pertenece al subgrupo D y es diferente tanto en neutralización como en la inhibición de la hemaglutinación de todos los demás adenovirus humanos (26). El Ad-36 es el primer adenovirus humano asociado con la obesidad humana (8).

**[0018]** El adenovirus humano tipo 36 aumenta la grasa corporal en animales infectados experimentalmente y muestra una asociación con la obesidad humana (5-8). El Ad-36 estimula los  
25 pre-adipocitos (pre-células grasas) para diferenciarlos en adipocitos (células grasas) y aumentar el

número de células grasas y su contenido de lípidos (9). El Ad-36 puede inducir la diferenciación de los pre-adipocitos aun en ausencia de inductores convencionales de diferenciación tales como el cóctel de metil isobutil xantina, dexametasona e insulina (MDI). Se observa un efecto similar del virus en la adiposa humana derivada de células madre (9). Las ratas infectadas con Ad-36  
 5 demostraron una mayor adiposidad, pero paradójicamente una menor resistencia a la insulina 7 meses después de la infección (50). Más aún, las células grasas de las ratas no infectadas al infectarse con Ad-36 muestran una mayor captación de glucosa, lo que indica una mayor sensibilidad a la insulina (51).

**[0019]** También se observa una mayor sensibilidad a la insulina a pesar del aumento en la  
 10 grasa corporal en los medicamentos antidiabéticos de la clase de las tiazolidindionas (TZD) (52 y 53). Las TZDs aumentan la replicación pre-adipocitos, diferenciación y acumulación de lípidos y aumentan la sensibilidad a la insulina de todo el cuerpo. Se piensa que el efecto de sensibilización a la insulina de las TZDs se debe a su efecto sobre la replicación pre-adipocitos y diferenciación (que genera nuevos adipocitos más pequeños) y sobre PPAR $\gamma$  (un gen importante en la diferenciación  
 15 adipocita y ruta de señalamiento de la insulina) (52 y 53). Se demuestra que la sensibilidad a la insulina en humanos se relaciona inversamente con el tamaño del adipocito (54 y 55).

**[0020]** Los factores que se requieren para una sensibilidad aumentada a la insulina incluyen un mayor número de pre-adipocitos y diferenciación, y activación de AMPc y enzimas de las vías de señalamiento de la insulina (por ejemplo, fosfotidil inositol-3 quinasa (PI3K o PI3 quinasa). A su vez,  
 20 la diferenciación de pre-adipocitos está modulada por la activación de la PI3 quinasa y las vías de señalamiento de AMPc (43-48). Se ha demostrado que Ad-36 aumenta la replicación pre-adipocitos, el número de adipocitos diferenciados y las vías de PI3 quinasa (56).

**[0021]** No todos los adenovirus comparten el potencial adipogénico de Ad-36. El adenovirus aviar CELO (de las siglas en inglés del virus huérfano letal del embrión de pollo) o los adenovirus  
 25 humanos tipo 2 o 31 no promueven la adiposidad en animales (21 y 57). A diferencia de Ad-36, Ad-2 no aumenta la diferenciación de pre-adipocitos (9). La seropositividad de Ad-36 se ha asociado

con la obesidad humana (8). Se observó una distribución casi igual de seropositividad entre los sujetos obesos y no obesos para los adenovirus no adipogénicos Ad-2 y Ad-31 (8 y 49). Esto sugiere que la mayor frecuencia de anticuerpos Ad-36 en sujetos obesos (8) no es simplemente un resultado de la obesidad, y que Ad-2 o Ad-31 no están asociados con la obesidad.

#### 5 ***E4 orf 1 y diferenciación***

[0022] Aunque el grupo D (de Ad-36) contiene el mayor número de serotipos, no se ha estudiado tan bien como el grupo C de adenovirus (por ejemplo, Ad-2 y Ad-5). Sin embargo, se ha caracterizado parcialmente un virus del grupo D, Ad-9. Este virus atrajo inicialmente la atención debido a que produce tumores en ratas (29). La investigación del mecanismo tumorigénico de Ad-9 demostró que era necesario el gen E4 orf 1. Los genes E1A y E1B, que son necesarios y suficientes para la transformación por los adenovirus del grupo A y grupo B, no son necesarios para la transformación de Ad-9 (30-33). Los estudios hechos posteriormente sobre la proteína Ad-9 E4 orf1 identificaron 3 dominios donde las mutaciones ocasionan una pérdida de la actividad de transformación (34). Uno de estos se ubica en la terminal C de la proteína y posteriormente se demostró que es un dominio de enlace PDZ. Los dominios PDZ se reconocieron inicialmente como dominios de interacción de proteínas en PSD/SAP90, Dlg y ZO-1. Estos dominios tienen un tamaño aproximado de 90 aminoácidos y se encuentran en más de 400 proteínas humanas (35). Los dominios PDZ median la interacción proteínica mediante el enlace a dominios de enlace PDZ ubicados típicamente en las terminales C de otras proteínas, como es el caso de Ad-9 E4 orf 1. También pueden enlazarse a los péptidos internos y otros dominios PDZ. Las proteínas PDZ podrían tener sólo un dominio o más de una docena de dominios PDZ y frecuentemente contienen también otros tipos de dominios de interacción proteínica. Las proteínas PDZ se han descrito como proteínas de andamiaje que organizan otras proteínas en grupos funcionales, y se ha demostrado que actúan en la transducción de señales, sinapsis neuronal e intersecciones intercelulares. Se ha demostrado que la proteína Ad-9 E4 orf 1 se asocia con las proteínas PDZ MUPPI, MAGI-1, ZO-2 Y PATJ para reubicar estas proteínas de las intersecciones estrechas de la célula epitelial hasta el citoplasma. La delección del dominio de enlace PDZ Ad-9 E4 orf 1 elimina estas interacciones

proteínicas y destruye la actividad de transformación de E4 orf 1 (36). El Ad-9 E4 orf 1 activa además PI3K (37). Esto requiere el dominio de enlace PDZ E4 orf 1 y se supone que implica una o varias proteína PDZ, que todavía no se han identificado. Ni las subunidades catalíticas ni las reguladoras de PI3K contienen dominios PDZ. Aunque se requiere la activación de PI3K para la transformación inducida por E4 orf 1, no es suficiente. La regulación al alta de la ruta PI3K es una respuesta celular común a varios de los 50 tipos conocidos de adenovirus humanos (71-74). PI3K es una enzima que se requiere en la adipogénesis (38-39). Pero Ad-2, un virus no adipogénico, también regula al alta la actividad de PI3K (71). Por lo tanto, la respuesta adipogénica a la infección con Ad-36 involucra más que la simple regulación al alta de la actividad de PI3K.

#### 10 ***Adiposidad inducida por Ad-36***

**[0023]** El proceso de la diferenciación de adipocitos comprende la detención del crecimiento, seguida por una fase de expansión clonal y terminando con la expresión de los factores clave de transcripción y diferenciación terminal. El proceso de diferenciación en pre-adipocitos de rata (células 3T3-L1) puede iniciarse por la exposición de las células confluentes a metil-isobutilxantina, dexametasona e insulina (MDI). Durante la diferenciación, los genes que son inhibidores de la adipogénesis o innecesarios para la función de las células grasas se reprimen (por ejemplo, disminución de Pref-1, CUP y PRE). Sin embargo, la expresión de los genes tempranos, intermedios y tardíos de diferenciación (por ejemplo, C/EBP $\beta$ , C/EBP $\delta$  y RxR) aumenta, seguida por la expresión de C/EBP $\alpha$  y PPAR $\gamma$ , y finalmente seguidos por la acumulación de lípidos. La expresión de CEBP/ $\beta$  es crítica para la activación de PPAR y otros genes pre-adipogénicos subsiguientes (40). La co-expresión de C/EBP $\beta$  y C/EBP $\delta$  induce la expresión de PPAR $\gamma$ , que es el más adiposo específico de los PPARs ( $\alpha$ ,  $\delta$  y  $\gamma$ ) (41). La expresión de PPAR $\gamma$  conjuntamente con CEBP $\alpha$  lleva a la activación de varios genes, incluyendo aP2, GLUT4, SCD1, PEPCK y leptina (41 y 42) y a la terminación del proceso de diferenciación.

25

**DIVULGACIÓN DE LA INVENCION**

**[0024]** Hemos descubierto que la expresión del gen E4 orf 1 de Ad-36 por sí mismo es responsable del aumento en la sensibilidad a la insulina observada en animales infectados con Ad-36. Para determinar los efectos de Ad-36 E4 orf-1 se prepararon pre-adipocitos 3T3-L1 que expresan establemente el gen Ad-36 E4 orf 1, E4 orf 1 sin su dominio de enlace PDZ (E4 orf 1  $\Delta$ PDZ) o un vector vacío (control). Observamos que las células 3T3-L1 que expresan Ad-36 E4 orf 1 o E4 orf1  $\Delta$ PDZ poseen una activación significativamente mayor de la ruta AMPc en comparación con el control; mientras que solo las células que expresan Ad-36 E4 orf 1 poseen una mayor activación de la ruta PI3 quinasa. La atenuación del efecto de E4 orf 1 sobre la ruta de la PI3 quinasa mediante la delección de la región de enlace PDZ de la proteína (E4 orf 1  $\Delta$ PDZ) sugiere que el dominio de enlace PDZ de la proteína Ad-36 E4 orf 1 contribuye a la activación de la PI3 quinasa. Asimismo, la Ad-36 E4 orf 1 que expresa los pre-adipocitos 3T3-L1 demuestra una capacidad extremadamente alta de diferenciación. Además, la expresión de E4 orf 1 aumenta la replicación de pre-adipocitos. Por lo tanto, hemos descubierto que la proteína Ad-36 E4 orf 1 aumenta la sensibilidad a la insulina y promueve la diferenciación de pre-adipocitos. Puede usarse esta proteína para aumentar la sensibilidad a la insulina y mejorar la diabetes. Además, los fármacos que imitan la acción de la proteína Ad-36 E4 orf 1 pueden usarse para aumentar la sensibilidad a la insulina y mejorar la diabetes. La proteína Ad-36 E4 orf 1 también puede usarse para aumentar la replicación de las células, como las células madre, y usarse para aumentar las células grasas en un paciente con lipodistrofia, cuando el sujeto no tiene la capacidad de desarrollar células grasa maduras. Esta condición puede ocasionar una comorbilidad grave como resultado de la incapacidad de almacenar grasa corporal en los adipocitos.

**[0025]** Además, hemos descubierto que el potencial de sensibilización a la insulina de la infección con Ad-36 probablemente depende del aumento en la proliferación de pre-adipocitos y adipogénesis, activación de PPAR $\gamma$ 2, LPL, FAS y la expresión del gen de glicerol quinasa, y el aumento en la secreción de adiponectina. No se han descrito ninguno de estos cambios para otros

adenovirus humanos. Se ha descrito un aumento en PI3K en otros adenovirus humanos, así como para Ad-36. Sólo se sabe que Ad-36 está asociado con la obesidad humana.

[0026] También hemos descubierto que la infección con Ad-36 en las células musculares esqueléticas aumentan la diferenciación y captación de glucosa independiente de la insulina. De manera similar a los adipocitos, se espera que la proteína Ad-36 E4 orf 1 cause estos efectos.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0027] La Figura 1A ilustra el mRNA Ad-2 aislado de células madre adiposas humanas (hASC) 1 día después de la infección con el virus Ad-2 (multiplicidad de infección (MOI) de 3,8).

[0028] La Figura 1B ilustra el mRNA Ad-36 aislado de células hASC 1 día después de la infección con el virus Ad-36 (3,8 MOI).

[0029] Las Figuras 2A-2C ilustran un análisis Western Blot para CREB (Figura 2A), PKB (Figura 2B) y proteínas p38 (Figura 2C) de los lisados de hASC 24 horas después de la infección con Ad-2 (MOI 3,8), Ad-36 (MOI 3,8) o con medios (simulados).

[0030] La Figura 3 ilustra la cantidad de proliferación celular (expresada como % células en fase S) de hASC 32 h después de la infección con Ad-36 (MOI 3,8) o infectado con medios (simulados).

[0031] La Figura 4A ilustra el grado de expresión de C/EBP $\beta$  en hASC 1 día después de la infección con Ad-36 (MOI 3,8) o infectado con medios (simulados).

[0032] La Figura 4B ilustra el grado de acumulación de lípidos en hASC 5 días después de la infección con Ad-36 (MOI 3,8) o infectado con medios (simulados).

[0033] La Figura 5 ilustra el grado de respuesta a los medios de diferenciación, expresado como % células de tinción de lípidos, en hASCs aislados de Ad-36 ADN+ de sujetos humanos en comparación con Ad-36 ADN- de sujetos humanos.

**[0034]** Las Figuras 6A-6C ilustran un análisis Western blot para las proteínas CREB (Figura 6A), PKB (Figura 6B) y p38 (Figura 6C) de hASC 24 h después de la infección con medios (simulados) o con Ad36+NC siARN (MOI 3,8) o con Ad-36+E4 orf-1 siARN (MOI 3,8).

**[0035]** La Figura 7A ilustra el grado de expresión Wnt10b en hASC 1 día después de la infección con Ad-36 + NC siARN (MOI 3,8), E4 orf-1 siARN solo (MOI 3,8) o Ad-36 + E4 orf1 siARN (MOI 3,8).

**[0036]** La Figura 7B ilustra el grado de expresión C/EBP $\beta$  en hASC 2 días después de la infección con Ad-36 + NC siARN (MOI 3,8), E4 orf-1 siARN solo (MOI 3,8) o Ad-36 + E4 orf1 siARN (MOI 3,8).

**[0037]** La Figura 7C ilustra el grado de expresión PPAR $\gamma$ 2 en hASC 3 días después de la infección con Ad-36 + NC siARN (MOI 3,8), E4 orf-1 siARN solo (MOI 3,8) o Ad-36 + E4 orf1 siARN (MOI 3,8).

**[0038]** La Figura 7D ilustra el grado de acumulación de lípidos en hASC 6 días después de la infección con Ad-36 + NC siARN (MOI 3,8), E4 orf-1 siARN solo (MOI 3,8) o Ad-36 + E4 orf1 siARN (MOI 3,8).

**[0039]** La Figura 8A ilustra el grado de expresión del gen Ad-36 E4 orf 1 proveniente de células madre adiposas de ratas Wistar 4 días después de ser infectadas con Ad-36, control (no infectado), Inf1 (Rata 1 infectada con Ad-36), Inf2 (Rata 2 infectada con Ad-36), Ad-2 (NC, control negativo) y PC (control positivo, células A549 infectadas con Ad-36).

**[0040]** La Figura 8B ilustra el cambio temporal en la expresión del gen Ad-36 E1A proveniente de células madre adiposas de ratas Wistar del día 2 al día 9 después de la infección con Ad-36 (infección intranasal con aproximadamente  $10^{12}$  PFU).

[0041] La Figura 8C ilustra el cambio temporal en la expresión del gen Ad-36 E4 orf 1 proveniente de células madre adiposas de ratas Wistar del día 2 al día 9 después de la infección con Ad-36 (infección intranasal con aproximadamente  $10^{12}$  PFU).

5 [0042] La Figura 8D ilustra el cambio temporal en el ADN de Ad-36 proveniente de células madre adiposas de ratas Wistar entre 3 h y 9 días después de la infección con Ad-36 (infección intranasal con aproximadamente  $10^{12}$  PFU).

[0043] La Figura 9A ilustra la diferencia en la acumulación de lípidos en hASC inoculadas con Ad-36 (Ad-36 + Os; MOI 2,7) o medios (Os), y después de tres días incubadas en medios osteogénicos durante 6 días.

10 [0044] La Figura 9B ilustra la diferencia en la expresión de PPAR- $\gamma$  determinada mediante qRT-PCR en hASC inoculadas con Ad-36 (Ad-36 + Os; MOI 2,7) o medios (Os), y después de tres días incubadas en medios osteogénicos durante 6 días.

15 [0045] La Figura 9C ilustra la diferencia en la expresión de RunX2 determinada mediante qRT-PCR en hASC inoculadas con Ad-36 (Ad-36 + Os; MOI 2,7) o medios (Os), y después de tres días incubadas en medios osteogénicos durante 6 días.

[0046] La Figura 10A ilustra la diferencia en la expresión de las proteínas  $\beta$  de unión al activador CCAAT (C/EBP- $\beta$ ) determinada por qRT-PCR en hASC durante hasta 9 días después de la infección con Ad-36 (MOI 2,7) o medios (Con).

20 [0047] La Figura 10B ilustra la diferencia en la expresión del gen del receptor activado por proliferador peroxisoma  $\gamma$ 2 (PPAR- $\gamma$ 2) determinada por qRT-PCR en hASC durante hasta 9 días después de la infección con Ad-36 (MOI 2,7) o medios (Con).

[0048] La Figura 10C ilustra la diferencia en la expresión  $\alpha$ P2 determinada por qRT-PCR en hASC durante hasta 9 días después de la infección con Ad-36 (MOI 2,7) o medios (Con).

**[0049]** La Figura 11A ilustra la diferencia en la acumulación de lípidos (determinada por tinción con Aceite Rojo-O) en hASC después de 9 días de infección con MOI creciente de Ad-36, de aproximadamente 0,5 a unos 13,3, y con medios (CON).

**[0050]** La Figura 11B ilustra el cambio temporal posterior de hasta 12 días en la acumulación de lípidos (determinada por tinción con Aceite Rojo-O) en hASC inoculados con Ad-36 (MOI 2,7) o medios (CON).

**[0051]** La Figura 11C ilustra el cambio temporal posterior de hasta 12 días en la expresión de la lipoproteína lipasa (LPL) en hASC inoculados con Ad-36 (MOI 2,7) o medios (CON).

**[0052]** La Figura 11D ilustra el cambio temporal posterior de hasta 12 días en la expresión de la glicerol quinasa (GyK) en hASC inoculados con Ad-36 (MOI 2,7) o medios (CON).

**[0053]** La Figura 11E ilustra el cambio temporal en la liberación de glicerol en hASC después de hasta 9 días de la inoculación con Ad-36 (MOI 2,7) o medios (CON).

**[0054]** La Figura 11F ilustra el cambio temporal posterior de hasta 9 días en la acumulación de lípidos (determinada por tinción con Aceite Rojo-O) en hASC incubados con inductores de la diferenciación de adipocitos e inoculados con Ad-36 (MOI 2,7) o medios (CON).

**[0055]** La Figura 12A ilustra el grado de fosforilación de la proteína quinasa B (PKB) en el tejido adiposo humano 15 días después de la inoculación con medios (simulados) o con Ad-36 (MOI 3,8).

**[0056]** La Figura 12B ilustra el grado de fosforilación de p38 en el tejido adiposo humano 15 días después de la inoculación con medios (simulados) o con Ad-36 (MOI 3,8).

**[0057]** La Figura 12C ilustra el grado de expresión del factor de crecimiento epitelial vascular (VEGF) en el tejido adiposo humano 4 días después de la inoculación con medios (simulados) o con Ad-36 (MOI 3,8).

**[0058]** La Figura 12D ilustra el grado de expresión de la proteína  $\beta$  de unión al activador CCAAT (C/EBP- $\beta$ ) en el tejido adiposo humano 12 días después de la inoculación con medios (simulados) o con Ad-36 (MOI 3,8).

**[0059]** La Figura 12E ilustra el grado de expresión del receptor activado por el proliferador peroxisoma  $\gamma$ 2 (PPAR- $\gamma$ 2) en el tejido adiposo humano 15 días después de la inoculación con  
5 medios (simulados) o con Ad-36 (MOI 3,8).

**[0060]** La Figura 13A ilustra la cantidad de secreción de adiponectina en las células 3T3-L1 7 días después de la inoculación con Ad-36 (MOI 3,8) o con medios (CON).

**[0061]** La Figura 13B ilustra la cantidad de secreción de adiponectina en las células 3T3-L1 que  
10 expresan E4 orf 1 o no expresan E4 orf 1 (nula) 7 días después de la inoculación con Ad-36 (MOI 3,8).

**[0062]** La Figura 14A ilustra el cambio temporal en la expresión del gen Ad-36 E4 orf-1 en las células musculares esqueléticas humanas (hSKM) hasta 5 días después de la inoculación con Ad-36 (MOI 3,8).

**[0063]** La Figura 14B ilustra el cambio dependiente de la dosis en la expresión del gen Ad-36 E4 orf-1 en las células musculares esqueléticas humanas hasta 5 días después de la inoculación con  
15 Ad-36 (MOI entre aproximadamente 1,9 y 7,6).

**[0064]** La Figura 15 ilustra el grado de expresión usando el análisis Western blot para varias proteínas que participan en la diferenciación de las células musculares (M-cadherina, MyoD, Miogenina) en clisatos de células musculares esqueléticas humanas 7 días después de la  
20 inoculación con Ad-36 (MOI 3,8 o MOI 7,6), usando la expresión de  $\beta$ -actina como un control.

**[0065]** La Figura 16A ilustra el grado de captación de glucosa en las células musculares esqueléticas aisladas en sujetos humanos diabéticos 24 h después de la infección con Ad-36 (MOI 3,8 ó 7,6) e incubadas con medios sencillo (base) o con insulina (estimulado con insulina).

**[0066]** La Figura 16B ilustra el grado de captación de glucosa en las células musculares esqueléticas aisladas en sujetos humanos delgados, no diabéticos, 24 h después de la infección con Ad-36 (MOI 3,8 ó 7,6) e incubadas con medios sencillo (base) o con insulina (estimulado con insulina).

5 **[0067]** La Figura 17 ilustra el grado de expresión de la proteína Glu1 o Glut4 en células musculares esqueléticas humanas usando el análisis Western blot 7 días después de la inoculación con Ad-36 (MOI entre aproximadamente 1,9 y 7,6) o Ad-2 (MOI 3,8), usando la expresión de  $\beta$ -actina como control.

**[0068]** La Figura 18A ilustra el efecto dependiente de la dosis sobre la expresión del gen Glut1  
10 en células musculares esqueléticas humanas usando un ensayo PCR en tiempo real 7 días después de la inoculación con Ad-36 (MOI entre aproximadamente 1,9 y 7,6) o medios.

**[0069]** La Figura 18B ilustra el efecto dependiente de la dosis sobre la expresión del gen Glut4 en células musculares esqueléticas humanas usando un ensayo PCR en tiempo real 7 días después de la inoculación con Ad-36 (MOI entre aproximadamente 1,9 y 7,6) o medios.

15 **[0070]** La Figura 19 ilustra el grado de expresión de varias proteínas (PY, IRS-1, IRS-2, IR- $\beta$  y PI 3K) usando análisis Western blot con los lisados de células musculares esqueléticas humanas 7 días después de la infección con Ad-36 (MOI entre aproximadamente 1,9 y 7,6) o medios e incubadas con o sin insulina (100 nM), usando  $\beta$ -actina como control.

**[0071]** La Figura 20 ilustra la cantidad de actividad PI3 quinasa asociada con IRS-1 o IRS-2  
20 usando inmunoprecipitación seguida de un ensayo de la actividad de PI3 quinasa con lisados de células musculares esqueléticas humanas 7 días después de la infección con Ad-36 (MOI entre aproximadamente 1,9 OI y 7,6) o medios, e incubados con o sin insulina (100 nM).

**[0072]** La Figura 21 ilustra el grado de expresión de la proteína RAS usando análisis Western blot con lisados de células musculares esqueléticas humanas 7 días después de la infección con Ad-  
25 36 (MOI entre aproximadamente 1,9 OI y 7,6) o medios, e incubados con o sin insulina (100 nM).

**[0073]** La Fig 22A ilustra el grado de acumulación de lípidos determinada usando tinción con rojo de Nilo en células confluentes 3T3-L1 inoculadas con vector nulo, gen Ad-36 E4 orf 1, o gen Ad-36 E4 orf 1 sin el dominio de enlace PDZ (E4 orf 1 dPDZ) e incubadas en MDI (MDI+, medios con insulina y dexametasona).

5 **[0074]** La Figura 22B ilustra el grado de acumulación de lípidos determinada usando tinción con rojo de Nilo en células confluentes 3T3-L1 inoculadas con vector nulo, gen Ad-36 E4 orf 1, o gen Ad-36 E4 orf 1 sin el dominio de enlace PDZ (E4 orf 1 dPDZ) e incubadas solo en medios (MDI-).

**[0075]** La Figura 22C ilustra los niveles de AMPc usando un equipo de inmunoensayo directo de AMPc a partir de células 3T3-L1 24 h después de re-alimentarse en células salvajes de 3T3-L1 o  
10 células inoculadas con el gen Ad-36 E4 orf 1 (E4orf1 T24) o el gen Ad-36 E4 orf 1 sin el dominio de enlace PDZ (E4orf1dPDZ).

**[0076]** La Figura 22D ilustra los niveles de CREBP, como el cociente de CREB fosforilado y CREB total, determinado usando análisis Western blot con lisados de células 3T3-L1 24 h después de re-alimentarse en células salvajes de 3T3-L1 o células inoculadas con el gen Ad-36 E4 orf 1  
15 (E4orf1 T24) o el gen Ad-36 E4 orf 1 sin el dominio de enlace PDZ (E4orf1dPDZ).

**[0077]** La Figura 22E ilustra la cantidad de actividad del fosfato quinasa B (PKB) usando análisis Western blot con lisados de células 3T3-L1 a los tiempos 0 y 24 h después de la inoculación con el vector nulo (Null), el gen Ad-36 E1a (E1a), el gen Ad-36 E4 orf 1 (E4orf1) o el gen Ad-36 E4 orf 1 sin el dominio de enlace PDZ (dPDZ), usando la expresión de MAPK como control.

20 **[0078]** La Figura 22F ilustra la expresión genética de CEBP/β determinada usando q-RT-PCR sobre mRNA de células 3T3-L1 con tipo salvaje (3T3L1) o 2 días después de la inoculación con el gen E4 orf1 (E4orf1).

### MODELOS PARA REALIZAR LA INVENCION

**[0079]** Hemos aislado una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO:1 que codifica la proteína Ad-36 E4 orf1. También reivindicamos cualquier secuencia de ácido nucleico que codifique la misma secuencia de aminoácido como se muestra en la SEQ ID NO:2 según la degeneración del código genético. Un vector de transformación que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína Ad-36 E4 orf1 podría usarse para transponer células adiposas o células musculares esqueléticas mamíferas.

**[0080]** También divulgamos una proteína para el empleo en el tratamiento o mejora de los síntomas de una enfermedad en un paciente mamífero en el cual se selecciona la enfermedad del grupo que comprende lipodistrofia, diabetes o una enfermedad debida a la resistencia a insulina, y dicho empleo comprende la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente efectiva de la proteína Ad-36 E4 orf 1, donde los síntomas del paciente mejoran después de dicha administración. Si la enfermedad está relacionada con la resistencia a la insulina, entonces la sensibilidad a la insulina del paciente aumentará después de dicha administración. Si la enfermedad está relacionada con la lipodistrofia, el número de células del tejido adiposo en el paciente aumenta después de dicha administración. Si la enfermedad es diabetes debida a una alta concentración de glucosa sérica, entonces la cantidad de glucosa sérica disminuye después de dicha administración.

**[0081]** También divulgamos que la proteína Adenovirus-36 E4 orf 1 puede administrarse mediante la introducción al mamífero de una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína del Adenovirus-36 E4 orf 1, de manera que se permita la expresión de la proteína Adenovirus-36 E4 orf 1. En dicho método, la secuencia de ácido nucleico puede introducirse mediante un método seleccionado entre los dados en el siguiente grupo que comprende electroporación, transfección DEAE dextrano, transfección de fosfato de calcio, fusión de liposoma catiónico, fusión de proptoplasto, creación de un campo eléctrico *in vivo*, bombardeo con microproyectiles recubiertos

con ADN, inyección con virus defectuosos de replicación recombinante, recombinación homóloga, terapia genética *in vivo*, terapia genética *ex vivo*, vectores virales y transferencia de ADN desnudo.

[0082] También divulgamos un vector para el uso en la mejora o inducción de adipogénesis en un paciente mamífero, y dicho uso comprende la administración al tejido adiposo del paciente de un vector con la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína Ad-36 E4 orf 1; donde la expresión de la secuencia codificada de aminoácido en el tejido adiposo del paciente tiene como resultado la adipogénesis.

[0083] También divulgamos un vector para el uso en la mejora o inducción de la captación de glucosa en un paciente mamífero, y dicho empleo comprende la administración al tejido muscular esquelético del paciente de un vector con la secuencia de ácido nucleico para codificar la proteína Ad-36 E4 orf 1; donde la expresión de la secuencia codificada de aminoácido en el tejido muscular esquelético del paciente tiene como resultado un aumento en la captación de glucosa.

[0084] También divulgamos un vector para el uso en mejorar o inducir la sensibilidad a la insulina en un paciente mamífero, y dicho empleo comprende la administración al tejido adiposo del paciente de un vector con la secuencia de ácido nucleico para codificar la proteína Ad-36 E4 orf 1; donde la expresión de la secuencia codificada de aminoácido en el tejido adiposo del paciente tiene como resultado un aumento en la sensibilidad a la insulina.

[0085] Las proteínas Ad-36 E4 orf 1 pueden usarse para aumentar la sensibilidad a la insulina y mejorar los síntomas debidos a la diabetes, para atenuar la lipodistrofia, para inducir la replicación de células madre o para estimular la captación de glucosa de células musculares. A continuación se muestran dos posibles enfoques que pueden emplearse:

[0086] Usando la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO:2, la proteína purificada de Ad-36 E4 orf 1 puede prepararse, por ejemplo, usando la producción de proteína recombinante disponible en la actualidad. Usando la proteína purificada, la estructura 3-D de la proteína puede determinarse mediante cristalografía por rayos X. Usando el conocimiento de esta estructura, pueden

identificarse o producirse fármacos que podrían imitar la acción de la proteína E4 orf 1. Estos fármacos podrían usarse para dirigirse a los tejidos específicos con el fin de obtener el efecto deseado, por ejemplo, adipocitos. Los fármacos podrían administrarse, por ejemplo, a los preadipocitos usando tecnologías tales como nanopartículas por ingeniería de superficie o bioconjugados nanopartículas-aptamer. La proteína purificada también podría ser administrada a los tejidos usando técnicas conocidas en el campo, tales como inyección dirigida o usando un sistema de gen-vector para administrar el gen Ad-36 E4 orf 1.

**[0087]** Esperamos que ya sea que los fármacos imiten las acciones de los genes o que la proteína preparada en los preadipocitos o en el tejido adiposo derivado de las células madre promuevan su replicación y diferenciación, aumentando así el número de células grasas. Esto aumentará la sensibilidad a la insulina y atenuará la hiperglucemia de la diabetes. Además, la lipodistrofia es una condición marcada por la incapacidad de los preadipocitos de diferenciarse en adipocitos, teniendo como resultado el almacenamiento ectópico de grasa en el cuerpo y causando una resistencia intensa a la insulina. La diferenciación de las células grasas inducidas por la proteína Ad-36 E4 orf 1 proporcionará células grasas maduras para el almacenamiento de grasa y atenuará las comorbilidades asociadas.

**[0088]** Además, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína del adenovirus 36 E4 orf 1 puede administrarse al tejido usando diversos enfoques de terapias genéticas. Entre los diferentes enfoques de administración del gen sistémico, se ha demostrado que la inyección de un gen al tejido seguida de electroporación aumenta el nivel de expresión del gen inyectado. Otros métodos de introducción de ácido nucleico exógeno a los órganos del mamífero incluyen los siguientes: transfección DEAE Dextrano, transfección de fosfato de calcio, fusión de liposomas catiónicos, fusión de protoplasto, creación de un campo eléctrico *in vivo*, bombardeo con microproyectiles recubiertos con ADN, inyección con virus recombinante incapaz de replicarse, recombinación homóloga, terapia genética *in vivo*, terapia genética *ex vivo*, vectores virales y transferencia de ADN desnudo. Estos métodos son reconocidos por los expertos en el campo. Véase la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. Nº US 2002/0119945.

**[0089]** Teniendo en cuenta los efectos anteriores descritos de Ad-36 E4 orf 1, pueden emplearse ensayos rutinarios tales como el PCR en tiempo real, PCR de transcripción inversa, análisis por Northern blot, ensayo por inmun absorción enzimática (ELISA), Western blot, o similares para detectar la presencia del ADN, mRNA o la proteína respectiva en el tejido adiposo, 5 sangre u otro tejido o fluido corporal de Ad-36 E4 orf 1. Esta prueba podría usarse para predecir la sensibilidad a la insulina del sujeto.

**[0090]** Hemos descubierto el siguiente gen y secuencias aminoácidas para Ad-36 E4 orf 1:

**[0091]** (1) **Secuencia de ADN de Ad-36 E4 orf 1 (SEQ ID nº 10)**

**[0092]**

ATGGCTGAATCTCTGTATGCTTTCATAGATAGCCCTGGAGGGATCG  
CTCCCGTCCAGGAAGGGGCTAGCAATAGATATATCTTCTTTGCCCCGAATCTTT  
CCACATTCTCCGCATGGGGTGATATTGCTTCACCTCAGAGTGAGCGTGCTGGTT  
5 CCTACTGGATATCAGGGCAGATTTATGGCCTTGAATGACTACCATGCCAGGGGCA  
TACTAACCCAGTCCGATGTGATATTTGCCGGGAGAAGACATGATCTCTCTGTGCT  
GCTCTTTAACCACACGGACCGATTTTTGTATGTCCGCGAGGGCCACCCAGTGGGA  
ACCCTGCTGCTGGAGAGAGTGATTTTTCTTCAGTGAGAATAGCCACCCTGGTTT  
AG

10

**[0093]           (2) Traducción de la proteína Ad-36 E4 orf 1 (SEQ ID nº 2)**

**[0094]**

MAESLY AFIDSPGGIAPVQEGASNRYIFFCPESFHIPPHGVILLHLRVSV  
LVPTGYQGRFMALNDYHARGILTQSDVIFAGRRHDLVLLFNHTDRFLYVREGHPV  
15 GTLLLERVIFPSVRIATLV

**[0095]           (3) Secuencia de ADN de Ad-36 E4 orf 1 ΔPDZ (SEQ ID nº 3)**

**[0096]**

ATGGCTGAATCTCTGTATGCTTTCATAGATAGCCCTGGAGGGATCG  
CTCCCGTCCAGGAAGGGGCTAGCAATAGATATATCTTCTTTGCCCCGAATCTTT  
20 CCACATTCTCCGCATGGGGTGATATTGCTTCACCTCAGAGTGAGCGTGCTGGTT  
CCTACTGGATATCAGGGCAGATTTATGGCCTTGAATGACTACCATGCCAGGGGCA

TACTAACCCAGTCCGATGTGATATTTGCCGGGAGAAGACATGATCTCTCTGTGCT  
 GCTCTTTAACCACACGGACCGATTTTTGTATGTCCGCGAGGGCCACCCAGTGGGA  
 ACCCTGCTGCTGGAGAGAGTGATTTTTCTTCAGTGAGAATATAG

[0097] (4) Traducción de la proteína Ad-36 E4 orf 1 ΔPDZ Ad-36 E4 orf 1 (SEQ ID NO. 4)

5 [0098]

MAESLYAFIDSPGGIAPVQEGASNRYIFFCPESFHIPPHGVILLHLRVSV  
 LVPTGYQGRFMALNDYHARGILTQSDVIFAGRRHDLVLLFNHTDRFLYVREGHPV  
 GTLLLERVIFPSVRI

10 [0099] Se demostró que la proteína Ad-36 E4 orf 1 es diferente de otras secuencias genéticas conocidas para otras proteínas del adenovirus E4 orf 1 usando la base de datos BLAST. Por ejemplo, las similitudes porcentuales con seis adenovirus son las siguientes: Ad-9, 92%; Ad-46, 92%; Ad-12, 47%; Ad-50, 47%; Ad-3, 47% y Ad-7, 47%.

### Ejemplo 1

#### ***Materiales y métodos***

15 [00100] Las abreviaturas y papeles de los diversos compuestos aquí empleados son los siguientes:

Abreviatura	Compuesto y su papel en este estudio
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina; Indica la diferenciación celular y acumulación de lípidos
CEBPs	Proteínas de unión al activador CCAAT $\alpha$ , $\beta$ , $\delta$ ; Genes indicadores de la cascada de diferenciación de preadipocitos
CREBP	Proteína de enlace del elemento de respuesta del AMP cíclico; Indica la activación de AMPc

Glut 1	Transportador de la glucosa 1; Participa en la captación de glucosa independiente de la insulina
Glut 4	Transportador de la glucosa 4; Participa en la captación de la glucosa estimulada por la insulina
IL	Interleucinas (citoquinas de la respuesta inmune); Indican inflamación
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos 1; Indica inflamación
MIF	Factor inhibidor de macrófagos 1; Previene la migración de macrófagos
P38 (MAPK)	Proteínas quinasa activadas por mitógenos P38; Molécula fundamental en la diferenciación celular
P13K	Fosfolidil inositol-3' quinasa; Enzima fundamental e indicador de la diferenciación celular, proliferación, angiogénesis, captación de la glucosa y acumulación de lípidos
PKB	Proteína quinasa B; Indica la activación de PI3k
PPARY2	Receptor $\gamma$ 2 activado por los proliferadores de peroxisomas; Factor de transcripción fundamental que participa en la diferenciación de preadipocitos y sensibilidad a la insulina
Wnt10b	Actúa como freno sobre la diferenciación de preadipocitos. La expresión disminuye conforme los preadipocitos se diferencian para formar adipocitos

**[00101]** *Aislamiento de hASC:* Se obtuvieron aspirados por liposucción de sitios del tejido adiposo subcutáneo de sujetos tratados por cirugía plástica de elección. El tejido se lavó 3 veces con PBS y se suspendió en un volumen igual de solución tamponada de fosfato (PBS) suplementada con 0,1% de colagenasa tipo I de *Clostridium histolyticum* (cat. nº LS004196, Worthington) y 1% albúmina proveniente de suero bovino esencialmente libre de ácidos grasos,  $\geq 96\%$ , y polvo liofilizado (cat. nº A6003, Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, EE.UU.) durante 1 hora a 37 °C bajo agitación moderada controlada a aproximadamente 75 rpm. Los tubos se centrifugaron a 1.200 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos, seguida por 10 segundos de agitación

vigorosa, y se repitió el paso de la centrifugación. Se eliminó el sobrenadante y se re-suspendió la pílora celular en 10 ml de PBS estéril con 1% BSA, seguida por la centrifugación a 1200 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. La pílora celular se re-suspendió en medio estromal y 200 µl de suspensión celular se expusieron a tampón lisogénico celular de eritrocitos Hybri-Max (cat. nº R7757, Sigma) durante 20 min seguido de un recuento celular usando un homocitómetro y solución azul de triptano 0,4% (cat. nº T8154, Sigma).

**[00102]** *Cultivo de ASC humano o de ratas:* Se creció el ASC en medio estromal que contenía medio de Eagle modificado por Dulbecco/mezcla de nutrientes de Ham F12 (DMEN/F12) 1:1, 3,15 l de glucosa, glutamina, rojo de fenol, HEPES, 1,2 bicarbonato de sodio, piruvato de sodio (cat. nº SH30023.01, HyClone), suplementado con 10% FBS (cat. nº SH30070.03, HyClone) y solución antibiótico/antimicótico 1X (cat. nº A-5955, Sigma) que contenía 10.000 unidades de penicilina, 10 mg de estreptomina y 25 µg de anfotericina B por ml.

**[00103]** *Inoculación con Ad-36 de hASC:* Se inoculó hASC de pasaje 2 con medio estromal (CON) o Ad-36 2,7 MOI durante 1 hora. Después se reemplazó el medio con medio estromal fresco. Se mantuvieron las células en cultivo durante 9 ó 12 días, y cada 3 días se reemplazó el medio.

**[00104]** *Diferenciación osteogénica de hASC:* Se cultivó hASC de pasaje 2 hasta un confluente 80-90%. Se inoculó el grupo Ad-36 con el virus y los dos grupos (Ad-36 y CON) recibieron medio estromal durante 3 días. El día 1 de la inducción osteogénica se reemplazó el medio con medio de inducción de osteoblastos que contenía DMEM con 10% FBS, 10 mM β-glicerofosfato, 0,15 mM ascorbato-2-fosfato, 10 nM dexametazona, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina. Se mantuvieron las células en cultivo durante 6 días después de la inducción osteogénica.

**[00105]** *Construcción de células 3T3-L1 que expresan establemente Ad-36 E4 orf 1 o genes E1A:* Para determinar la contribución de los genes candidato Ad-36 individuales, se construyeron vectores de retrovirus para transducir genes Ad-36 individuales a células 3T3-L1 y para seleccionar células que expresan estos genes. El vector LXSXN contiene un sitio múltiple de clonación para la inserción de genes de interés y el gene de resistencia a la neomicina para la selección de células

transducidas por el vector. Las células 3T3-L1 se infectaron con vectores LXS<sub>N</sub> que expresan el gen Ad-36 E1A, el gen Ad-36 E4 orf 1, gen Ad-36 E4 orf 1 con el dominio de unión PDZ suprimido (E4 orf-1 dPDZ) o vectores vacíos. Después de la confluencia, aun sin la inducción MDI, las células E4 orf 1 empiezan a acumular lípidos, ligeramente antes que las células 3T3-L1 no transducidas (control) o las células transducidas con el vector nulo (no se muestran los datos).

**[00106]** *Determinación de la acumulación de lípidos:* El Aceite Rojo O es un colorante específico de los lípidos. Este ensayo se basa en que el grado de tinción de las células grasas con Aceite Rojo O es proporcional al grado de acumulación de lípidos. Las células se fijan durante 1 h con solución de formalina al 10% (cat. nº HT551128, Sigma), después se lavan con agua y se tiñen durante 2 h con Aceite Rojo O (cat. nº BP 112-10, Fisher), seguida de un enjuague extenso con agua. Después de evaporar el exceso de agua a 32 °C, se extrajo el colorante con alcohol isopropílico (cat. nº 190764, Sigma) mecido las placas durante 5 minutos, y su absorbencia se leyó a 510 nm.

**[00107]** *Extracción del ADN:* El ADN total se extrajo usando el Mini Equipo de Tejidos DNeasy (cat. nº 69504, Qiagen) basado en una tecnología avanzada de membrana de gel de sílice para la purificación rápida y eficiente del ADN celular total, sin extracción orgánica o precipitación con etanol. Se almacenaron las muestras de ADN a -80 °C hasta su uso en la amplificación.

**[00108]** *Extracción de ARN y síntesis de cADN:* Se extrajo el ARN usando el Mini Equipo RNeasy, que combina las propiedades selectivas de enlace de una membrana de gel de sílice con la rapidez de la tecnología de microspin siguiendo las instrucciones del fabricante (cat. nº 74104, Qiagen). Se eliminó el ADN residual usando Desoxirribonucleasa I Grado Amplificación (cat. nº 18068-015, Invitrogen) la que digiere el ADN de hélice doble y sencilla dando oligodesoxirribonucleótidos que contienen 5'-fosfato. Se hizo la transcripción inversa de un µg de ARN total para producir cADN usando el equipo de síntesis de cADN iScript™ ( cat. nº 170-8890, Bio-Rad) siguiendo el protocolo del fabricante. Se almacenaron las muestras a -80 °C hasta su uso en la amplificación.

**[00109]** *RT-PCR cualitativo en dos pasos:* Se empleó el sistema central PCR II (cat. nº M7665, Promega) para la amplificación del cADN, obtenido como se describe anteriormente. Su uso de agua como control negativo de PCR. El control positivo de PCR fue ADN de células A-549 infectadas con Ad-36. La mezcla de reacción contenía 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 1x tampón de reacción de ADN polimerasa termofílica, mezcla de nucleótidos que contiene 200 µM de cada nucleótido, 1 µM de cebadores aguas abajo y aguas arriba, 1 µg de plantilla de ADN y 1,25 unidades de Taq ADN polimerasa. El volumen total se llevó a 50 µl con agua sin ADNasa. Se desnaturalizó el ADN durante 2 min a 95 °C y se sujetó a 35 ciclos de PCR (94 °C durante 1 min, 58 °C durante 1 min, 72 °C durante 2 min), seguido por extensión a 72 °C durante 5 min. Se visualizaron los productos PCR en un gel de agarosa al 1,2% con un marcador en escalera 100 bp de ADN (cat. nº G-2101, Promega).

**[00110]** *PCR cuantitativo en tiempo real (qRT-PCR):* Se generó un patrón usando cADN o ADN (dependiendo del diseño experimental) mezclando las muestras experimentales. Fueron necesarios al menos tres puntos de datos, que representan diluciones a una décima parte para generar una curva patrón. Las mezclas de reacción de control no de plantilla contenían agua en lugar de muestra. El PCR cuantitativo en tiempo real se hizo en placas de reacción ópticas de 96 ó 384 pocillos usando un detector de secuencias ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey, EE.UU.) usando un sistema de detección en verde SYBER (cat. nº 170-8880, Bio-Rad). La mezcla de reacción contenía 2,5 µl del tampón verde 10x SYBER, 1 mM cada uno de dATP, dGTP, dCTP y dUTP, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,625 unidades de iTaq ADN polimerasa, 200 nM de cada uno de los cebadores directo e inverso, 50 ng cADN ó 40 ng ADN y agua para alcanzar un volumen final de 25 µl. Tanto las muestras como los patrones se ejecutaron por duplicado y cada nivel de transcripción se ajustó al gen de mantenimiento usado ( $\beta$  actina para las muestras de rata o ciclofilina B para las muestras humanas). Se llevaron a cabo las reacciones usando los siguientes parámetros: un ciclo de 48 °C durante 30 min, después 95 °C durante 10 min, seguidos de 40 ciclos a 95 °C durante 15 s y 60 °C durante 1 min. Se expresó la cantidad de mRNA para los genes de interés relativo en relación al gen de mantenimiento.

**Ejemplo 2****El ad-36 induce la diferenciación y acumulación de lípidos en el tejido adiposo humano derivado de células madre (hASC)**

[00111] Los preadipocitos de rata (3T3-L1) proporcionan un modelo *in vitro* conveniente para el estudio de la adipogénesis. Sin embargo, para determinar la pertinencia de la adipogénesis inducida con Ad-36 en humanos, se estudiaron los efectos de la infección con Ad-36 y Ad-2 en cultivos primarios hASC. En la confluencia, los cultivos hASC se privaron de suero durante 18 h antes de la infección con Ad-2 o Ad-36 a MOI 3,8. Se observó tanto la expresión del gen viral Ad-2 como de Ad-36 en cultivos hASC infectados experimentalmente (Figuras 1A y 1B). En la Figura 1A se muestra la expresión del mRNA de Ad-2 aislado después de un día de infección y en la Figura 1B se muestra la expresión del mRNA de Ad-36. Después de 24 h de la infección, se aislaron las proteínas y se analizaron por Western blot. En la Figura 2A se muestra el aumento en la fosforilación CREB como resultado de la infección con Ad-36 en comparación con la infección simulada ( $p < 0,012$ ). En la Figura 2B se muestra que la fosforilación PKB aumenta en los cultivos infectados con Ad-36 en comparación con la infección simulada ( $p < 0,010$ ). En la Figura 2C la fosforilación también ha aumentado en los cultivos infectados con Ad-36 en comparación con la infección simulada ( $p < 0,005$ ). Por lo tanto, en la ausencia de inductores de diferenciación, solo Ad-36 pudo inducir la adipogénesis. Ad-36, pero no Ad-2, aumentó las fosforilaciones CREB y PKB.

[00112] La proliferación celular se determinó mediante la incorporación de BrdU a las 32 h. Se empleó análisis citométrico de flujo para determinar el porcentaje de células en fase S. Se encontró que el porcentaje es mayor en los cultivos infectados con Ad-36 en comparación con la infección simulada ( $p < 0,007$ ) (Figura 3). Asimismo, el Ad-36, pero no el Ad-2, reguló al alza la fosforilación de p38 (Figura 2C), lo que se requiere para la diferenciación de 3T3-L1 y de los preadipocitos humanos mediante la fosforilación de C/EBP $\beta$ . Los cultivos de hASC infectados con Ad-36 muestran un aumento en la expresión del gen C/EBP $\beta$  y acumulación de lípidos, un efecto que no se observa en los cultivos hASC infectados con Ad-2 (Figuras 4A y 4B). La expresión de C/EBP $\beta$  aumentó el día 1

en los cultivos infectados con Ad-36 en comparación con los cultivos infectados simulados ( $p < 0,040$ ). Además, en el día 5 la acumulación de lípidos fue mayor en los cultivos infectados con Ad-36 en comparación con los cultivos infectados simulados ( $p < 0,004$ ). En la Figura 5, hASC proveniente de sujetos humanos con Ad-36 ADN+ presentó una respuesta más intensa a los medios de diferenciación en comparación con sujetos humanos con Ad-36 ADN- ( $p < 0,003$ ).

[00113] Por lo tanto, se demostró que Ad-36 induce la diferenciación, aumenta las rutas de AMPc, P13K y p38 MAPK, e induce la acumulación de lípidos en el tejido adiposo humano derivado de células madre, que son células que se considera incluyen células progenitor de linaje adipocítico.

10

### Ejemplo 3

#### **E4 orf-1 es suficiente y necesario para producir cambios lipogénicos**

[00114] Para demostrar conclusivamente que se requiere E4 orf-1 para la adipogénesis inducida por Ad-36, se empleó siARN para la interrupción selectiva de la expresión E4 orf-1 en cultivos de 3T3-L1 y hASC infectadas con Ad-36. Ad-36 E4 orf-1 siARN reduce en gran medida los niveles de E4 orf-1 mRNA a las 24 h y 48 h después de la infección en células 3T3-L1 infectadas con Ad-36 y suprimió completamente la expresión en cultivos de hASC 24 h después de la infección (no se muestran los datos). La interrupción de la expresión del gen E4 orf 1 mediada por Ad-36 E4 orf 1 siARN causó la supresión de los efectos pro-adipogénicos de Ad-36 sobre las rutas de AMPc y PI3K, genes pro-adipogénicos y acumulación de lípidos en cultivos de hASC.

[00115] En la confluencia, los cultivos hASC se privaron de suero durante 18 h antes de la infección con Ad-36 E4 orf 1 siARN, Ad-36 + NC siARN o Ad-36 + E4 orf 1 siARN. En las Figuras 6A-6C, se recolectaron las proteínas 24 h después de la infección y se analizaron por Western blot en cuanto a las proteínas CREB (Figura 6A), PKB (Figura 6B) y p38 (Figura 6C). La Figura 6A ilustra el aumento en la fosforilación de CREB con Ad-36 + NC siARN en comparación con la infección simulada ( $p < 0,001$ ) y en comparación con Ad-36 + E4 orf 1 siARN ( $p < 0,018$ ). La Figura 6B ilustra el

25

aumento en la fosforilación de PKB en Ad-36 + NC siARN en comparación con la simulada ( $p < 0,004$ ) y en comparación con Ad-36 + E4 orf 1 siARN ( $p < 0,018$ ). Finalmente, la Figura 6C ilustra el aumento en la fosforilación de p38 en Ad-36 + NC siARN en comparación con la infección simulada ( $p < 0,013$ ) y en comparación con Ad-36 + E4 orf 1 siARN ( $p < 0,003$ ). En las Figuras 6A – 6C, la expresión de las proteínas en las células infectadas con Ad-36 + E4 orf 1 siARN no fue significativamente diferente a la de la infección simulada.

**[00116]** Se recolectó ARN de células infectadas como en la pre-infección anterior (día 0), y en los días 1, 2 y 3. Las células se fijaron el día 0, antes de la infección, y en los días 4 y 6 con tinción con Aceite Rojo O. En la Figura 7A, se demostró que la expresión de Wnt10b disminuye el día 1 en Ad-36 + NC siARN en comparación con la infección simulada ( $p < 0,002$ ) y en comparación con Ad-36 + E4 orf 1 siARN ( $p < 0,005$ ). En la Figura 7B, se demostró que la expresión de C/EBP $\beta$  aumenta el día 2 en Ad-36 + NC siARN en comparación con la infección simulada ( $p < 0,001$ ), y Ad-2 ( $p < 0,001$ ). En la Figura 7C se demostró que la expresión de PPAR $\gamma$ 2 aumenta el día 3 en comparación con la infección simulada ( $p < 0,006$ ) y en comparación con Ad-36 + E4 orf 1 siARN ( $p < 0,032$ ). En la Figura 7D se demostró que la acumulación de lípidos es mayor en Ad-36 + NC siARN el día 6 en comparación con la infección simulada ( $p < 0,002$ ) y en comparación con Ad-36 + E4 orf 1 siARN ( $p < 0,032$ ). Por lo tanto, sin la actividad de E4 orf 1, la infección con Ad-36 no ocasiona el aumento en la diferenciación como se demuestra por el aumento en la expresión de Wnt10b, disminución en la expresión de C/EBP $\beta$  y PPAR $\gamma$ 2 y disminución en la acumulación de lípidos en comparación con la infección con el tipo salvaje Ad-36 (Figuras 7A – 7D). Estos resultados implican la actividad de Ad-36 E4 orf 1 en los efectos pro-adipogénicos de la infección con Ad-36 en roedores y, de forma más importante, en el tejido adiposo humano.

**[00117]** Se encontró que Ad-36 E4 orf 1 es suficiente y necesario para producir cambios lipogénicos en 3T3-L1 y hASC (como se demuestra con siARN contra Ad-36 E4 orf-1). Más aún, se requiere E4 orf 1 en la regulación al alta inducida por Ad-36 de las rutas AMPc, PI3K y p38 MAPK, y para la inducción de las expresiones genéticas adipogénicas tales como C/EBP $\beta$  y PPAR $\gamma$ 2 en hASC.

La inducción de adipogénesis y PPAR $\gamma$ 2 se ha asociado a la mejora en la sensibilidad a la insulina (63 y 64).

**[00118]** Para determinar si el aumento inducido por E4 orf 1 en lípidos se debe a la hipertrofia celular o a un mayor número de células que almacenan lípidos, se trataron células 3T3-L1 5 confluentes y 3T3-L1 que expresan el vector nulo, E4 orf 1, o E4 orf 1 dPDZ con o sin MDI. Las células se tiñeron con rojo de Nilo, un colorante específico para lípidos, y se determinó el porcentaje de células teñidas mediante un ensayo FACS. Como se muestra en las Figuras 22A y 22B, las células que expresan Ad-36 E4 orf 1 poseen el mayor número de células que contienen lípidos con (Figura 22A) o sin MDI (Figura 22B) y la supresión del dominio de unión PDZ atenuó el efecto 10 de pro-diferenciación de E4 orf 1. Ésta es la primera evidencia del papel del dominio de enlace del dominio PDZ de E4 orf 1 como un motivo funcional que imparte la propiedad adipogénica al gen.

**[00119]** AMPc contribuye a la replicación y diferenciación. Se determinaron los niveles de AMPc en células 3T3-L1 confluentes sincronizadas que expresan establemente Ad-36 E4 orf 1, células Ad-36 E4 orf 1 dPDZ o células 3T3-L1 confluentes de tipo salvaje. Se determinó AMPc 15 usando un equipo de inmunoensayo directo de AMPc (Biovision, cat. nº 371-100). AMPc mostró niveles significativamente más altos en las células que expresan E4 orf 1 en comparación con las células 3T3-L1 de tipo salvaje o las células Ad-36 E4 orf 1 dPDZ ( $p = 0,025$ ; Figura 22C). El efecto de mejoría de AMPc de Ad-36 E4 orf 1 se anuló al suprimir el dominio de enlace de PDZ. La activación de AMPc provoca la activación de CREB mediante su fosforilación; y fosfo-CREB activa 20 intensamente los genes promotores-reporteros C/EBP $\beta$ , induce la expresión de C/EBPbeta y causa adipogénesis. Como se describe anteriormente, la proteína CREB total y fosforilada se determinó usando análisis Western blot 24 horas después de re-alimentarse, en células 3T3-L1 sincronizadas con el ciclo de las células confluentes que expresan de forma estable E4 orf 1, E4 orf 1 dPDZ, o en células 3T3-L1 de tipo salvaje. Las células que expresan E4 orf 1 tienen más CREB fosforilado 25 ( $p < 0,003$ ; Figura 22D), y este efecto es atenuado por E4 orf 1 dPDZ (Figura 22D).

[00120] Las células 3T3-L1 que expresan de forma estable Ad-36 E1A, Ad-36 E4 orf 1, Ad-36 E4 orf 1 dPDZ, o el vector nulo se alimentaron con 10% FBS después de 18 h de la privación de suero. Se recolectaron las células 24 h después en cuanto a proteína, se hizo el análisis Western blot para determinar la actividad de PKB y MAPK (usado como control de carga). Se usó el anticuerpo monoclonal PKB inmovilizado para inmunoprecipitar PKB de los extractos celulares (100 µg proteína total). Usando un equipo de ensayo de la actividad de PKB no radioactivo (Cell Signaling, Beverly, Massachusetts, EE.UU.), se hizo un ensayo *in vitro* usando la proteína de fusión GSK-3 como un sustrato para el PKB enlazado. Se describió la actividad de PKB como una medida de la fosforilación de GSK-3 por Western blot usando un anticuerpo fosfo-GSK-3 (ser21/9). E4 orf 1 mostró una mayor actividad de PKB a las 24 h (Figura 22E). La activación de PKB depende de la activación de PI3K y se considera una indicación de la activación de PI3K. La activación de PKB sin estimulación de la insulina indica que en presencia de Ad-36 E4 orf 1 no se requiere insulina para inducir el señalamiento PI3K.

[00121] Finalmente, el ARN extraído 2 d después de la confluencia de las células que expresan E4 orf 1 y células 3T3-L1 se usó para determinar la expresión de CEBP/β usando qRT-PCR. Se usó β actina como control interno y se consideró como 1 la expresión de CEBP/β por las células 3T3-L1. La Figura 22F indica una expresión 8 veces mayor de CEBP/β en las células que expresan E4 orf 1.

[00122] Las células que expresan Ad-36 E4 orf 1 aumentaron la diferenciación espontánea y mejoraron las rutas de AMPc y señalamiento de insulina determinadas mediante el aumento en los niveles de AMPc, la actividad de la proteína de enlace del elemento de respuesta de AMPc, y la actividad de PI3 quinasa. Se confirmó adicionalmente el papel de Ad-36 E4 orf 1 en la diferenciación mediante la atenuación de su expresión en las células 3T3-L1 infectadas con Ad-36 mediante una técnica ARNi, la cual reduce significativamente la acumulación de lípidos. Estos datos demuestran que E4 orf 1 mejora AMPc y las rutas de señalamiento de la insulina e induce la diferenciación en pre-adipocitos. Esto indica que E4 orf 1 es necesario para el efecto adipogénico de Ad-36 en hASC. En resumen, a través de su gen E4 orf 1, Ad-36 induce la diferenciación de pre-adipocitos en humanos y contribuye al efecto adipogénico del virus.

## Ejemplo 4

**Ad-36 mejora la sensibilidad a la insulina o trata la lipodistrofia**

**[00123]** *Ad-36 infecta ASC ex vivo:* Ad-36 indujo la adiposidad en ratas 6 meses después de la inoculación y aumentó la diferenciación de pre-adipocitos en líneas celulares de roedores. Se hizo una prueba para determinar si los genes tempranos de Ad-36 se expresaron en células adiposas madre (ASC) obtenidas de tejidos adiposos de ratas infectadas con Ad-36. Ad-36 E4 orf 1 se expresó en ASC extraído de tejido epididimario de ratas Wistar 4 días después de la inoculación con Ad-36, pero estuvo ausente en las ratas inoculadas con medio (Figura 8A). La Figura 8A muestra la expresión del gen Ad-36 E4 orf 1 en ratas después de 4 días de la inoculación con medio o con Ad-36, ASC de las ratas infectadas con Ad-36 expresó Ad-36 E4 orf 1 (inf1 e inf2), en comparación con la no expresión en el grupo de control (con), y con los controles positivos (PC, infectado con Ad-36) y negativos (NC, infectado con Ad-2), respectivamente. Esto indicó que el gen adipogénico Ad-36, E4 orf 1, se expresa en el tejido adiposo de animales infectados experimentalmente, lo que sugiere la replicación viral y el efecto directo subsiguiente de Ad-36 sobre el tejido adiposo.

**[00124]** *Ad-36 infecta ASC in vitro:* Se determinó un curso de tiempo de la infección Ad-36 en hASC determinando la expresión del gen temprano E1A y E4 orf 1 durante 9 días después de la inoculación. El hASC pre-confluyente infectado con Ad-36 demostró expresión continua de ADN de Ad-36 y E1A y E4 orf 1. Los genes Ad-36 E1A (Figura 8B) y E4 orf 1 (Figura 8C) se expresan y el ADN genómico Ad-36 aumenta con el paso del tiempo (Figura 8D). Se determinaron el ARN y ADN por qRT-PCR y los valores se representaron en una escala logarítmica (N=3; Media  $\pm$  DE) (Figuras 8B, 8C, 8D). Estos resultados sugieren que hASC puede soportar la expresión y replicación del gen Ad-36.

**[00125]** *El Ad-36 induce el compromiso de hASC al linaje adipocítico:* Se inoculó hASC con medio (CON) o Ad-36. Después de 72 h los dos grupos se incubaron con medio osteogénico, que normalmente compromete al ASC al linaje osteogénico. El grupo inoculado con Ad-36 demostró un aumento en la acumulación de lípidos determinada por Aceite Rojo O (Figura 9A), mayor expresión PPAR- $\gamma$  (Figura 9B) y menor expresión RunX2 (Figura 9C), determinadas por qRT-PCR. (N=3; Media  $\pm$

DE). Las células inoculadas con Ad-36 muestran una acumulación de lípidos significativamente mayor 9 días después de la inoculación, una mayor expresión de PPAR $\gamma$ , un gen clave de la ruta adipogénica, y una expresión reducida de RUNx2, un gen clave de la ruta osteogénica. Estos resultados indican que Ad-36 compromete las células madre al linaje adipogénico, aún en presencia de inductores osteogénicos.

**[00126]** *Ad-36 induce la expresión de C/EBP $\beta$  y PPAR $\gamma$ :* C/EBP $\gamma$  y PPAR $\gamma$  son los genes involucrados en la diferenciación de pre-adipocitos y objetivos posibles para la acumulación de lípidos inducida por Ad-36. Usando qRT-PCR, se demostró que Ad-36 aumenta significativamente la expresión de los genes C/EBP- $\beta$  ( $p < 0,01$ , Figura 10A) y PPAR $\gamma$  ( $p < 0,001$ , Fig 10B) 9 días después de la infección, en ausencia de cualquier agente de inducción de adipocitos. Esto indica que Ad-36 induce parcialmente la diferenciación de hASC mediante la regulación al alta de la expresión de los genes C/EBP $\beta$  y PPAR $\gamma$ .

**[00127]** *Ad-36 induce la expresión aP2:* La proteína de enlace de los ácidos grasos (aP2) se usa ampliamente como un marcador de la diferenciación de células no comprometidas a adipocitos maduros. Por lo tanto, se determinaron los niveles de expresión de aP2 por qRT-PCR en hASC infectado y no infectado (CON) con Ad-36. El hASC expresó niveles significativamente más altos de aP2 5 días ( $p < 0,01$ ), 9 días ( $p < 0,05$ ) y 12 días ( $p < 0,01$ ) después de la inoculación con Ad-36, en la ausencia de un cóctel de inducción (Figura 10C), donde se muestra que el Ad-36 induce la diferenciación terminal de hASC.

**[00128]** *Ad-36 induce y mejora la acumulación de lípidos en hASC.* La acumulación espontánea de lípidos se define como la acumulación de lípidos presente en la ausencia de cualquier agente adipogénico (por ej., insulina, dexametasona, metil isobutil xantina, tiazolidindiona). Se emplearon múltiples MOIs (multiplicidad de infección) para infectar hASC y se determinó la acumulación de lípidos 9 días después mediante el ensayo con Aceite Rojo O. La acumulación de lípidos en hASC como respuesta al aumento en MOI de Ad-36 se muestra en la Figura 11A. El grupo infectado con Ad-36 mostró un aumento en la acumulación de lípidos en el orden de dosis en aumento del virus

(MOI), hasta un MOI de 2,7 ( $p < 0,03$ , Figura 11A). Esto demuestra que Ad-36 induce la acumulación espontánea de lípidos en relación directa con la dosis.

**[00129]** Como se muestra en la Figura 11B, Ad-36 aumenta significativamente la acumulación de lípidos en hASC 9 días ( $p < 0,01$ ) y 12 días ( $p < 0,01$ ) después de la infección determinada mediante el ensayo con Aceite Rojo O. Se obtuvieron resultados similares en hASC obtenido de 3 donantes que pertenecían a una categoría diferente de edad e índice de masa corporal (IMC), lo que demuestra que Ad-36 puede inducir la acumulación de lípidos en hASC.

**[00130]** La lipoproteína lipasa adiposa (LPL) participa en la captación de triglicéridos en los adipocitos. Al aumentar la captación de lípidos de la dieta, la sobre expresión de LPL aumenta la acumulación de lípidos en los adipocitos. Por lo tanto, se determinó la LPL en hASC. Se observó una mayor expresión de LPL en hASC infectado con Ad-36. La Figura 11C ilustra la expresión significativamente mayor de LPL en hASC 9 días ( $p < 0,05$ ) y 12 días ( $p < 0,01$ ) después de la inoculación con Ad-36, en la ausencia de un cóctel de inducción, determinada con qRT-PCR. La sobreexpresión de LPL en el grupo infectado indica que Ad-36 estimula la incorporación de lípidos en la dieta a los adipocitos, contribuyendo a la mayor acumulación de lípidos demostrada por encima de la acumulación de lípidos.

**[00131]** La glicerol quinasa adiposa (Gk) es una enzima responsable de la síntesis de triglicéridos en adipocitos. Por lo tanto, se determinó la expresión de glicerol quinasa. Como se muestra en la Figura 11D, la expresión de glicerol quinasa aumentó con la infección con Ad-36 y el glicerol disminuyó cuando se determinó en el medio (Figura 11E). Estos resultados sugieren que Ad-36 aumenta la acumulación de lípidos en adipocitos al proporcionar niveles más altos del glicerol necesario para la síntesis de lípidos.

**[00132]** Ad-36 induce la acumulación de lípidos en ausencia de los inductores de adipocitos. Se hicieron experimentos para determinar el efecto de Ad-36 en hASC inducido por adipocitos, con la hipótesis de que el efecto de Ad-36 y los inductores de la diferenciación sería aditiva. Cinco días después de la inoculación e inducción de adipocitos, el grupo infectado con Ad-36 mostró una

acumulación de lípidos significativamente aumentada ( $p < 0,01$ ), determinada mediante tinción con Aceite Rojo O, normalizada al número de células (Figura 11F;  $n=5$ , media  $\pm$  DE). Sin embargo, después de 9 días, la acumulación de lípidos fue similar en los dos grupos. Estos resultados demuestran que Ad-36 mejora la acumulación de lípidos en hASC en presencia de agentes de inducción de adipocitos.

**[00133]** Ad-36 induce el compromiso de hASC al linaje adipogénico, aún en presencia de medios osteogénicos. Esto indica el uso potencial de Ad-36 en el tratamiento de lipodistrofia mediante la inducción de adipogénesis. Ad-36 también aumenta la expresión de mRNA en la lipoproteína lipasa (LPL) y glicerol quinasa (GyK), lo que sugiere una mayor depuración de los lípidos y reducción en la liberación de glicerol en hASC infectado con Ad-36. Más aún, la infección de las células 3T3-L1 con Ad-36 tipo salvaje, así como la expresión de E4 orf 1 en las células 3T3-L1, aumentó en la secreción de adiponectina. Colectivamente, estos cambios metabólicos están asociados a una mejor sensibilidad a la insulina.

### Ejemplo 5

#### 15 Efecto adipogénico de Ad-36 sobre el tejido adiposo humano

**[00134]** El tejido adiposo humano comprende células madre, células adipogénicas, células endoteliales, y células inmunogénicas. Además de la respuesta de células aisladas de linaje adipogénico se hicieron experimentos para determinar la respuesta del tejido adiposo completo en la infección con Ad-36, usando explantes de tejido adiposo humano (pedazos pequeños de tejido adiposo cultivado). La infección con Ad-36 de los explantes induce las rutas adipogénicas (p38 y PI3K) y aumenta la expresión de mRNA de genes adipogénicos (C/EBP $\beta$  Y PPAR $\gamma$ 2) y angiogénicos (VEGF) (6).

**[00135]** Considerando la heterogeneidad celular y la extensa interacción de los tipos celulares residentes en el tejido adiposo, es posible que la respuesta de las células aisladas de linaje adipocítico no refleje exactamente la respuesta *in vivo*. En contraste con el aislamiento de células

con colagenasa y técnicas de cultivo, el cultivo de explantes de tejido adiposo humano permite la manipulación y análisis de interacciones celulares mientras que se mantienen las estructuras tridimensionales de los tejidos. Se hicieron experimentos para determinar si los cultivos de explantes de tejido adiposo humano retienen características adipogénicas, angiogénicas e inmunogénicas, y si los explantes responden como se predice en los estudios *ex vivo* e *in vitro*. Se encontró (no se muestran los datos) que las secciones de tejido adiposo humano obtenidas de lipoaspirados y después cultivadas como explantes en placas de 96 pocillos retienen la viabilidad como se demuestra mediante la expresión detectable de genes pro-adipogénicos, proteínas de unión  $\beta$  al activador CCAAT (C/EBP $\beta$ ), receptores  $\gamma$ 2 activados por los proliferadores de peroxisomas (PPAR $\gamma$ 2), proteína de enlace de los lípidos adipocitos (ap2), lipoproteína lipasa (LPL), sintasa de ácido graso (FAS); gene angiogénico, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); citoquinas, proteína 1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1), factor inhibidor de macrófagos 1 (MIF-1) e interleucina 18 (IL-18); la presencia detectable de rutas de transducción pro-adipogénicas activas (AMPc), fosfoinositida-3 quinasa (PI3K) y proteinquinas activadas por mitógenos p38 (MAPK), así como la presencia de una población de células de linaje monocito (Western blot para HAM56).

**[00136]** Para evaluar el efecto de la infección con Ad-36 sobre el tejido adiposo humano, se infectaron explantes con Ad-36. Los explantes infectados demostraron una expresión intensa y mayor de los genes virales confirmando una infección viral activa. A semejanza de los resultados obtenidos con los hASC cultivados infectados con Ad-36, la infección viral regula al alta las rutas de transducción de la señal pro-adipogénica PI3K (Fig, 12A; día 2 después de la infección) y p38 (Figura 12B; día 2 después de la infección), como se indica por el aumento en las fosforilaciones de PKB y p38, respectivamente, seguido de aumentos significativos en pro-adipogénico (C/EBP $\beta$  (Fig, 12D; día 12 después de la infección) y PPAR $\gamma$ 2 (Figura 12E; día 15 después de la infección) y VEGF, expresión de un gen pro-angiogénico (Figura 12C; día 4 después de la infección) en explantes de tejido adiposo humano. En las Figuras 7A-7E, el tejido adiposo humano se inoculó con medio (simulado) o Ad-36 y se determinaron varias expresiones genéticas entre el día 2 y el día 15. Los

resultados sugieren que Ad-36 puede inducir cambios adipogénicos en el tejido adiposo humano. El empleo de explantes de tejido adiposo minimiza la extrapolación de los resultados *in vitro* obtenidos al estudiar tipos de células individuales o usando técnicas de co-cultivo artificiales.

**[00137]** Los estudios descritos anteriormente demuestran que la infección con Ad-36 del tejido adiposo humano regula al alta la ruta de señalamiento de PI3 quinasa y aumenta la diferenciación y acumulación de lípidos. También se investigó la capacidad de Ad-36 de remodelar el tejido adiposo mediante la activación de PI3 quinasa infectando explantes de tejido adiposo humano en presencia o ausencia de Wortmanina (WM), un inhibidor de la PI3 quinasa bien caracterizado. La remodelación del tejido adiposo se evaluó determinando los marcadores de adiposidad (PPAR $\gamma$ 2, aP2), angiogénesis (PECAM-1), sensibilidad a la insulina (adiponectina, FAS) e inflamación (MCP-1). En la Tabla 1 se muestran los resultados. En dicha tabla, se compara el grupo Ad-36 con un control no infectado, mientras que el grupo Ad-36 + WM se compara sólo con Ad-36.

**Tabla 1: Cambio en la dimensión de la expresión genética por qRT-PCR ( $p < 0,05$ )**

	Ad-36	Ad-36 + WM
PPAR $\gamma$ 2	29,0	-6,4
aP2	106,0	-80,3
PECAM-1	19,0	-34,8
Adiponectina	8,7	-2,2
FAS	3,3	-2,0
MCP-1	-19,0	9,3

**[00138]** Colectivamente los resultados dados en la Tabla 1 sugieren que Ad-36 remodela el tejido adiposo humano para exhibir una mayor adipogénesis, angiogénesis, sensibilidad a la insulina y un perfil inflamatorio favorable de la citoquina, que requiere la actividad de PI3 quinasa. El potencial de Ad-36 de remodelar el tejido adiposo puede ofrecer un mecanismo terapéutico efectivo para remodelar un perfil desfavorable del tejido adiposo común en la obesidad, diabetes y síndrome metabólico.

### Ejemplo 6

#### ***Ad-36 induce una reducción coordinada en la inflamación***

**[00139]** Las citoquinas inflamatorias, como por ejemplo MCP-1, aumentan la resistencia a la insulina, y la reducción en sus niveles mejora la sensibilidad a la insulina (65). Se observó que la infección con Ad-36 reduce rápidamente la producción de citoquina pro-inflamatoria (MCP-1, IL-6, IL-18) y aumenta la expresión antiinflamatoria (MIF-1) en hASC y explantes de tejido adiposo *in vitro* y ratas *in vivo*. Ad-2, un adenovirus no adipogénico, no suprimió la respuesta inflamatoria.

**[00140]** El crecimiento del tejido adiposo está asociado con un aumento en las citoquinas inflamatorias. Debido a la asociación de las citoquinas pro-inflamatorias con la diabetes y otras comorbilidades, la comprensión de la regulación de la respuesta pro-inflamatoria inducida del tejido adiposo es crítica. Se realizaron experimentos para determinar si Ad-36 reduce una respuesta antiinflamatoria en el tejido adiposo y adipocitos, lo que podría contribuir a la sensibilidad inducida a la insulina por Ad-36. Se infectó hASC de un donante sano (IMC=25) con Ad-36 o Ad-2 (MOI=3,8). Ad-2 es un adenovirus humano no adipogénico usado como control negativo. El día 1, la expresión de mRNA del factor de inhibición de la migración de macrófagos (MIF) fue significativamente mas elevado en la infección con Ad-36 y significativamente menor en la infección con Ad-2, lo que sugiere que Ad-36 suprime el reclutamiento de macrófagos, mientras que Ad-2 promueve el reclutamiento de macrófagos (véase la Tabla 2). El día 2, la expresión de la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1) y de mRNA de IL-18 fue significativamente menor en el grupo infectado con Ad-36, lo que indica que la infección con Ad-36 induce una subresión inmune

coordinada en células aisladas de linaje adipocítico. Para determinar la respuesta antiinflamatoria de Ad-36 en el tejido adiposo, explantes de tejido adiposo humano obtenidos por lipoaspiración se infectaron con Ad-36. A semejanza de los resultados obtenidos con hASC, el grupo infectado con Ad-36 mostró una mayor expresión de MIF y menor de mRNA de MCP-1 en comparación con el control no infectado (Tabla 2). Para determinar el impacto *in vivo* de la modulación inducida por Ad-36 de la inflamación, se inocularon por vía intranasal ratas Wistar macho de 5 semanas con medio, Ad-36 inactivado con UV, o Ad-36 competente en la replicación. Cuatro días después, se encontró que los niveles de IL-6 sérico se habían reducido en los dos grupos infectados con el virus, indicativo de una supresión inmune mediada por un receptor (Tabla 2). Sin embargo, los niveles de IL-18 y MCP-1 se redujeron significativamente sólo en la infección con Ad-36 competente en la replicación, lo que indica que para obtener estos efectos se requiere una replicación viral activa. Estos datos indican que Ad-36 puede inducir rápidamente la reducción coordinada en la inflamación, lo que podría jugar un papel directo en la modulación de la adiposidad y sensibilidad a la insulina.

15 **Tabla 2: Porcentaje de mRNA\* o proteína\*\* en comparación con los grupos de control no infectados respectivos. Los datos se expresan como Media % Cambio (valor p)**

	<b>MCP-1</b>	<b>MIF</b>	<b>IL-18</b>	<b>IL-6</b>
<b>hASC*: infectado con Ad-36</b>	42% (p<0,003)	154% (p<0,001)	79% (p<0,007)	NA
<b>hASC*: infectado con Ad-2</b>	136% (p<0,05)	51% (p<0,03)	94% (p=NS)	NA
<b>Explantos hAT*: infectado con Ad-36</b>	70% (p<0,07)	167% (p<0,056)	113% (p=NS)	NA

<b>Suero de rata**: infectado con Ad-36</b>	52% (p<0,05)	NA	51% (p<0,005)	22% (p=NS)
<b>Suero de rata**: Ad-36 inactivado con UV</b>	92% (p=NS)	NA	76% (p<0,054)	28% (p=NS)

NA: Datos no disponibles; NS: Estadísticamente no significativo.

### Ejemplo 7

#### *Los efectos de Ad-36 que no se deben a la "infección"*

5 [00141] La comparación con los adenovirus humanos no adipogénicos es un enfoque para  
 identificar las características únicas de Ad-36. Quizás el adenovirus humano tipo 2 (Ad-2) es el virus  
 más difundido, pero es no adipogénico en animales y no se ha encontrado asociación con la  
 obesidad humana. Ya que las células 3T3-L1 expresan muy poco el receptor del virus de Coxsackie-  
 adenovirus (CAR) usado por Ad-2 para la entrada a la célula, no puede infectar las células 3T3-L1 y  
 10 promover la diferenciación: una explicación posible de la falta descrita de efecto adipogénico para  
 Ad-2. Para resolver el asunto de la entrada celular de Ad-2, se usaron células 3T3-L1 que sobre-  
 expresan CAR (3T3-CAR). Ad-36 y Ad-2 podrían infectar las células 3T3-CAR, como se determinó por  
 la expresión de los genes virales respectivos. Estos resultados apoyan el que la infección con Ad-36  
 de 3T3-CAR aumenta significativamente la proliferación celular, la ruta de la PI3 quinasa, la  
 15 diferenciación y la acumulación de lípidos en comparación con el control no infectado (no se  
 muestran los datos). Sin embargo, ninguno de estos efectos lipogénicos fueron observados en 3T3-  
 CAR infectado con Ad-2. Se repitió este experimento en células madre derivadas de tejido adiposo  
 humano (hASC), que apoyan la expresión de los genes virales para Ad-2 y Ad-36. El Ad-36, pero no  
 el Ad-2, aumentó significativamente la acumulación de lípidos en hASC (no se muestran los datos).  
 20 Por esto, el efecto adipogénico de Ad-36 no se debe simplemente a su entrada a los preadipocitos,

**[00142]** Para identificar adicionalmente el mecanismo del efecto anti-lipogénico, se determinaron los efectos de Ad-2 durante un curso de tiempo de la cascada de expresión genética adipogénica durante hasta 7 días después de la infección en ausencia o presencia de inductores adipogénicos (por ejemplo, metil isobutil xantina, dexametasona e insulina (MDI)). Se usó Ad-36 como un control adipogénico positivo. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

**Tabla 3: Cambios en la expresión genética y acumulación de lípidos por Ad-36 y Ad-32 en comparación con un grupo de control no infectado.  $p < 0,05$  para todos los cambios observados.**

**ND: no hay diferencia en comparación con el control no infectado**

	Wnt10b	Pref1	C/EBP $\beta$	C/EBP $\delta$	C/EBP $\alpha$	PPAR $\gamma$ 2	G3PDH	aP2	Lípido
Ad-36 No MDI	↓	↓	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
Ad-2 No MDI	ND	↓	ND	ND	↓	ND	↓	↓	↓
Ad-36 + MDI	↓	↓	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
Ad-2 +MDI	ND	ND	ND	ND	↓	↓	↓	↓	↓

**[00143]** Los grupos infectados con Ad-2 presentaron una acumulación de lípidos significativamente menor aún en presencia de MDI (Tabla 3). Estos resultados indican un patrón diferente de modulación genética celular por Ad-36, que podría contribuir a sus efectos fenotípicos. El adenovirus humano no adipogénico Ad-2 no es lipogénico en las células 3T3-L1 o hASC, a pesar del éxito en la infección de esas células por el virus. Por esto, los efectos observados de Ad-36 no se deben simplemente a una "infección", sino más específicamente a las proteínas virales hechas por Ad-36.

**Ejemplo 8*****Ad-36 y Ad-36 E4 orf 1 aumentan la adiponectina***

[00144] Se determinó la concentración de adiponectina en medio en células 3T3-L1 7 días después de la inoculación con Ad-36. La cantidad de adiponectina fue significativamente mayor en el grupo Ad-36 en comparación con el grupo de control no infectado ( $p < 0,04$ ) (Figura 13A). Además, las células 3T3-L1 que sólo expresan el gen Ad-36 E4 orf 1 mostraron una mayor secreción de adiponectina en medio, lo que indica un papel de E4 orf 1 en la modulación de la secreción de adiponectina (Figura 13B). Por lo tanto, en comparación con el control no infectado, las células 3T3-L1 infectadas con Ad-36 mostraron una expresión 12 veces mayor de adiponectina ( $P < 0,001$ ). Además, los niveles de acuaporin-7 aumentaron un 37% en pre-adipocitos, pero disminuyeron 19% en adipocitos infectados con Ad-36 (no se muestran los datos). Como se esperaba, Ad-36 aumentó los niveles de glicerol intracelulares ( $p < 0,05$ ) y redujo la liberación de glicerol al medio en hasta un cuarto. Los resultados indican que el aumento en la adiponectina y reducción en la liberación de glicerol debido a la supresión de acuaporina-7 podrían contribuir al efecto sensibilizador a la insulina de Ad-36, mientras que aumenta la acumulación de lípidos en adipocitos.

[00145] Por lo tanto, Ad-36 de tipo salvaje y su gen E4 orf 1 aumentan la secreción de adiponectina en las células grasas, lo que indica un papel para el virus o para el gen E4 orf 1 (o proteína) en el aumento en la sensibilidad a la insulina.

**Ejemplo 9**

20 ***La infección con Ad-36 aumenta la diferenciación y captación de glucosa en las células musculares esqueléticas***

[00146] El músculo esquelético juega un papel importante en la depuración de la glucosa y sensibilidad a la insulina. Un paso limitante en este proceso es el transporte de la glucosa, que es mediada por diferentes transportadores de glucosa. GLUT1 es responsable del transporte basal y GLUT4 es responsable del transporte de la glucosa estimulada por la insulina o el ejercicio a través

de translocación a la membrana del plasma (66). Por lo tanto, además de este efecto sobre el tejido adiposo y los adipocitos, se determinó el efecto de Ad-36 sobre la captación de la glucosa por el músculo esquelético. Como se describe posteriormente, hemos demostrado que Ad-36 puede infectar el músculo esquelético humano y promover la diferenciación de los mioblastos. Ad-36  
 5 aumenta la abundancia de PI3K, y de las proteínas de transporte glut 4 y glut 1 y aumenta la captación de glucosa en el músculo esquelético humano diabético y no diabético. Parece que el aumento en la captación de glucosa es independiente del señalamiento de la insulina.

**[00147]** *Cultivo de células musculares esqueléticas humanas.* Los métodos para la biopsia muscular y aislamiento y crecimiento celular son las descritas (67). Se obtuvieron biopsias  
 10 musculares del músculo *vastus lateralis* mediante el procedimiento de biopsia con aguja de sujetos con diabetes tipo 2 y un sujeto delgado. Se picaron aproximadamente 100 mg de tejido humano con tijeras quirúrgicas y se digirieron con 0,55% tripsina y 2,21 mM EDTA con agitación constante a 37 °C. Después de centrifugarse para eliminar la grasa y detritos, se crecieron los mioblastos en un cultivo de monocapa en medio de crecimiento de músculo esquelético (SkGM) de Cambrex Co  
 15 (Walkersville, Maryland, EE.UU.) con 10% (v/v) suero de feto bovino, 1% (v/v) antibióticos (10.000 unidades/ml de penicilina G y 10 mg/ml de estreptomycin), 2 mM de glutamina y 25 mM Hepes (pH 7,4).

**[00148]** *Infección de células HKSM con el virus Ad-36.* Se mantuvieron las células de mioblastos en medio de crecimiento músculo esquelético con 10 FBS a 80% confluencia. Las células se  
 20 infectaron con Ad-36 o Ad-2 usando las dosis señaladas durante 1 hora. Las células infectadas con Ad-2 se usaron como grupo de control. Después de transcurrida la hora, se lavaron las células y se añadió medio fresco. Se verificó el éxito de la infección determinando la expresión del gen viral mediante qPCR, como se indicó anteriormente.

**[00149]** *Análisis por ensayo RT-PCR en tiempo real:* El ARN total de las células hSKM se aisló  
 25 con reactivo TRIzol (Invitrogen) siguiendo el protocolo del fabricante, y se purificó adicionalmente usando el mini-equipo RNeasy de Qiagen (Maryland).

**[00150]** *Análisis por Western blot.* Se prepararon lisados de células enteras como se describió previamente (68). Se incubaron las membranas con anticuerpos policlonales o monoclonales que reconocen los anticuerpos MyoD, Miogenina, M-cadherina, IRS-1, IRS-2, IR  $\beta$ , PI 3, Akt-p, Ras, Glut-1, Glut-4 o  $\beta$ -actina, respectivamente. Siguiendo el anticuerpo secundario correspondiente  
 5 conjugado con peroxidasa de rábano, se detectaron las señales mediante solución quimioluminiscente mejorada. Se cuantificaron las bandas específicas por densitometría de barrido, y los datos se normalizaron a los niveles de  $\beta$ -actina.

**[00151]** *Captación de 2-desoxi-D-glucosa.* Se infectaron células hSKM con varias dosis de virus Ad-36 durante hasta 5 días. Se añadió vehículo (solución salina) o insulina (100 mM) durante los  
 10 últimos 15 minutos de incubación. Las células se lavaron dos veces usando PBS y se llevó a cabo la captación de glucosa como se ha descrito anteriormente (69). Brevemente, las células musculares se cultivaron en placas de 24 pocillos con  $5 \times 10^5$  células/pocillo en medio SkMG que contenía 5 mM de glucosa y 2% de suero de ternera durante 24 h a 37 °C. Se reemplazó el medio de cultivo con un medio basal de células musculares esqueléticas sin suero, glucosa o piruvato (sin factores  
 15 de crecimiento) que contenía 10  $\mu$ Ci/ml [ $^3$ H]2DG 500  $\mu$ l/pocillo (Perkin Elmer Life Sciences, Boston, Massachusetts, EE.UU.). Después, se incubaron los pocillos durante 7 min a temperatura ambiente. A continuación, se eliminó el medio por aspiración, y se lavaron las células tres veces con PBS frío. Las células se lisaron con 500  $\mu$ l/pocillo de NaOH 0,2N durante 15 min. Se transfirió el lisado celular (400  $\mu$ l) de cada placa de pocillos a un vial de centelleo y se determinó la radiactividad mediante un  
 20 recuento de centelleo. Todos los experimentos se hicieron por triplicado con al menos tres donantes diferentes de células musculares.

**[00152]** *Ensayos de la actividad de la PI3 quinasa asociada con IRS-1 y IRS-2.* Se inmunoprecipitó un total de 1 mg de proteína proveniente de los lisados de células musculares usando 4  $\mu$ g de anticuerpo policlonal IRS-1 para determinar la actividad de la PI3 quinasa asociada  
 25 con IRS-1, como se ha descrito anteriormente (70). Se visualizó el producto PI3 quinasa fosfato por autorradiografía, y se cuantificó por densitometría de barrido.

**[00153]** *Ad-36 puede infectar las células musculares esqueléticas humanas (hSKM):* Usando un ensayo PCR en tiempo real, se determinó la expresión del gen E4 orf 1 en células hSKM infectadas con Ad-36. Las células musculares aisladas de biopsias musculares de sujetos humanos (67) se inocularon con o sin Ad-36 durante hasta 5 días. Como se muestra en la Figura 14A, el mRNA de Ad-36 E4 orf 1 aumentó con el tiempo con una infección de Ad-36 de MOI de 3,8. Adicionalmente, se probaron diferentes dosis de infección con Ad-36 (MOI entre aproximadamente 1,9 y 7,6). Como se muestra en la Figura 14B, el mRNA de E4 orf 1 aumentó con la dosis. Los datos mostrados en las Figuras 14A y 14B son el resultado de mediciones por triplicado y representan una media  $\pm$  DEM.

**[00154]** *Mioblastos mejorados con Ad-36 se diferencian en miotubos.* Usando un análisis por Western blot para varias proteínas musculares, se demostró que las células infectadas con Ad-36 muestran un nivel significativamente mayor de proteínas M-cadherina, miogenina y MyoD al día 7 después de la infección con Ad-36. Las concentraciones aumentaron con la dosis más alta de MOI de 7,6 (Figura 15). Estas proteínas indican una diferenciación de mioblastos a miotubos.

**[00155]** *Ad-36 aumenta la captación de glucosa en células musculares.* La captación de 2-desoxi glucosa se determinó en células musculares infectadas con Ad-36 obtenidas de un sujeto diabético y un sujeto delgado no diabético. Se determinó el grado de captación con o sin estimulación de insulina en un control, y también a dos dosis diferentes de Ad-36 (MOI de 3,8 y 7,6). Como se muestra en la Figura 16A, la infección con Ad-36 aumentó significativamente la captación de glucosa basal y la estimulada por insulina en células hSKM provenientes de un sujeto diabético pasado de peso en comparación con el grupo de control no infectado. Adicionalmente, se obtuvieron resultados similares a niveles comparables de infección en células hSKM provenientes de un sujeto delgado no diabético (Figura 16B). El ensayo de glucosa se hizo por triplicado y los resultados en las Figuras 16A y 16B se expresaron como media  $\pm$  DEM (\*\*\*)  $P < 0,001$ , células infectadas con Ad-36 en comparación con el control no infectado).

**[00156]** *Ad-36 aumenta la expresión genética de GLUT1 y GLUT4 y las proteínas en células hSKM.* Usando un análisis de Western blot, se determinó el efecto de la infección con Ad-36 y Ad-2

sobre la abundancia de las proteínas Glut1 y Glut4 7 días después de la infección. En la Figura 17 se muestran los resultados. La infección con Ad-36, pero no con Ad-2, aumentó significativamente el nivel de las proteínas Glut1 y Glut4 en relación directa con la dosis.

5 [00157] Adicionalmente, usando un ensayo PCR en tiempo real, se determinó el efecto de la infección con Ad-36 sobre la expresión genética de Glut1 y Glut4 en células hSKM. El día 7 después de la infección se demostró que Ad-36 aumenta la expresión genética de Glut1 hasta un MOI de 3,8 (Figura 18A). Sin embargo, se observó el nivel más alto de expresión de Glut4 en las células hSKM a un MOI de 7,6 (Figura 18B). En las Figuras 18A y 18B, los datos son la media  $\pm$  DEM de mediciones por triplicado (\*P<0,05, \*\*P<0,01 y \*\*\*P<0,001, al compararse las células infectadas con Ad-36 con  
10 el control).

[00158] *Ad-36 aumenta PI3K, pero no las proteínas que participan en la ruta de señalamiento de la insulina.* Usando un análisis Western blot se determinaron las proteínas que participan en el análisis de proteínas de la ruta de señalamiento de la insulina en células infectadas con Ad-36 a diferentes concentraciones durante 7 días. Los resultados se muestran en la Figura 19. A los 7 días  
15 después de la infección, se sujetaron cantidades iguales de sobrenadante de los lisados celulares infectados a 6% SDS PAGE, y después se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Se añadieron los anticuerpos específicos contra PY, IRS-1, IRS-2, I $\alpha$ , PI 3 y  $\beta$ -actina a un tampón BSA TBST 2% a 4 °C y se dejaron toda la noche, seguidos por un segundo anticuerpo como se describió anteriormente. El ensayo se hizo con tres experimentos separados. La Figura 19 demuestra que la  
20 infección con Ad-36 aumenta substancialmente la abundancia de PI3K aun sin insulina, pero las proteínas que participan en el señalamiento estimulado por insulina (IRS-1 y IRS-2) no cambiaron. Estos resultados indican que Ad-36 puede activar PI3K a través de una ruta independiente de la insulina, y por lo tanto será útil en el tratamiento de la diabetes de tipo 1 y tipo 2. Este aumento en PI3K causa un aumento en la captación de glucosa celular.

25 [00159] Para entender más a fondo los cambios en PI3K, el día 7 después de la infección con Ad-36 se recolectaron células hSKM y se homogeneizaron. Después de la centrifugación, 400  $\mu$ g de

sobrenadante se inmunoprecipitaron con 3 µg de anticuerpo IRS-1 o IRS-2 (Upstate Biotech, Lake Placid, Nueva York, EE.UU.). La actividad de la PI3 quinasa se analizó por duplicado en tres experimentos diferentes. Los resultados se muestran en la Figura 20, donde se indica que PI3K se activa al formar complejos con IRS-1 e IRS-2 en respuesta a la inducción insulínica. Sin embargo, la  
 5 activación de PI3K debida a la infección con Ad-36 no ocurre mediante la formación de complejos con IRS-1 y IRS-2. Nuevamente, estos resultados apoyan el hecho que Ad-36 puede inducir la activación de PI3K, independientemente del señalamiento de la insulina.

**[00160]** *La infección con Ad-36 aumenta la abundancia de la proteína RAS.* El efecto de la infección con Ad-36 sobre la activación de RAS en las células hSKM se determinó usando un análisis  
 10 Western blot. Las células hSKM se infectaron con varias dosis de Ad-36 (MOI entre 1,9 y 7,6, aproximadamente). En la Figura 21 se muestran los resultados, los cuales indican un aumento dependiente de la dosis en la abundancia de la proteína RAS. Se sabe que la proteína RAS activa PI3K. Estos resultados sugieren que el efecto de la infección con Ad-36 sobre la activación de PI3K se realiza a través de un aumento en la proteína RAS.

**[00161]** Se ha demostrado que Ad-36 aumenta la diferenciación y captación de glucosa independientemente de la insulina en las células musculares esqueléticas humanas primarias (hSMC). La captación de glucosa en la línea base por hSMC obtenidas de sujetos con diabetes tipo 2 fue menor que en las de sujetos no diabéticos. Sin embargo, la infección con Ad-36 aumentó la captación de glucosa en las células obtenidas tanto en sujetos diabéticos como no diabéticos. Ad-  
 20 36 aumenta la expresión de glut4 y la abundancia de proteína, la que participa en la captación de glucosa por las células. En experimentos futuros se estudiará el efecto de la infección con el gen Ad-36 E4 orf 1. Se espera, basándose en los resultados usando células de tejido adiposo, que el gen E4 orf 1 aumente la diferenciación y la captación de glucosa en células musculares.

#### *Miscelánea*

**[00162]** El término “proteína Ad-36 E4 orf 1” utilizado en el presente y en las reivindicaciones se refiere al péptido mostrado en SEQ ID nº 2.

**[00163]** El término “cantidad terapéuticamente efectiva” utilizado en el presente se refiere a una cantidad de la proteína Ad-36 E4 orf 1 o sus agonistas suficiente para aumentar la sensibilidad a la insulina, promover la diferenciación celular (adiposa o muscular), promover la acumulación de lípidos en el tejido adiposo y promover la captación de glucosa en las células musculares a un grado estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ). Los intervalos de dosificación para la administración de Ad-36 E4 orf 1 son los que producen el efecto deseado. Generalmente, la dosis variará con la edad, peso, condición y sexo del paciente. Una persona con conocimientos normales en este campo, teniendo en cuenta las enseñanzas de la especificación actual, podrá determinar fácilmente los intervalos adecuados de dosificación. El médico individual podrá ajustar la dosis en el caso de cualquier contraindicación. En cualquier caso, la efectividad del tratamiento podrá determinarse realizando un seguimiento del nivel de sensibilidad a la insulina mediante métodos reconocidos por los expertos en este campo. Más aún, la proteína Ad-36 E4 orf 1 podrá aplicarse en vehículos farmacéuticamente aceptables conocidos en el campo, entre los que figuran moléculas vehículo que se dirigen a tejidos específicos.

**[00164]** La invención actual presenta una proteína para el uso en la prevención, tratamiento o mejora de los síntomas de resistencia a la insulina, diabetes o lipodistrofia, y dicho empleo comprende la administración a un sujeto bajo riesgo de padecer una enfermedad o que presenta síntomas de esa enfermedad, una cantidad terapéuticamente efectiva de la proteína Ad-36 E4 orf 1 y sus agonistas. El término “mejorar” se refiere a una disminución o reducción de los síntomas o indicaciones del trastorno que se está tratando.

#### **Bibliografía**

1. Rossner S. Can obesity be an infectious disease? *Lakartidningen*. 2005 Jun 13-26;102(24-25):1896-8.
2. Astrup A, Lundsgaard C, Stock MJ. Is obesity contagious? *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1998 Apr;22(4):375-6.

3. Powledge TM. Is obesity an infectious disease? *Lancet Infect Dis.* 2004 Oct;4(10):599.
4. Dhurandhar NV, Atkinson RL y Ahmad A. Obesity of Infectious Origin: A Review. *Growth, Genetics and Hormones* 2004, 20(3)- 33-39.
5. Dhurandhar NV, Israel BA, Kolesar JM, Mayhew GF, Cook ME y Atkinson RL. Increased adiposity in animals due to a human virus. *Int J Obesity* 2000; 24: 989-996.
6. Dhurandhar NV, Israel BA, Kolesar JM, Mayhew GF, Cook ME y Atkinson RL. Transmissibility of adenovirus-induced adiposity in a chicken model. *Int J Obesity* 2001; 25:990-996.
7. Dhurandhar NV, Whigham LD, Abbott DH, Schultz-Darken NJ, Israel BA, Bradley SM, Kemnitz JW, Allison DB, y Atkinson RL. Human Adenovirus Ad-36 Promotes Obesity in Male Rhesus and Marmoset Monkeys. *J Nutrition* 2002,132:3155-3160.
8. Atkinson RL, Dhurandhar NV, Allison, DB, Bowen RL, Israel BA, Albu JB, y Augustus AS. Human adenovirus-36 is associated with increased body weight and paradoxical reduction of serum lipids. *International Journal of Obesity* 2005 29:281-286.
9. Vangipuram SD, Sheele J, Atkinson RL, Holland TC, y Dhurandhar NV. A Human Adenovirus Enhances Preadipocyte Differentiation. *Obesity Research* 2004; 12:770-777 (reimpresión adjunta).
10. Bernard A, Zwingelstein G, Meister R y Fabian Wild T. Hyperinsulinemia induced by canine distemper virus infection of mice and its correlation with the appearance of obesity. *Comp Biochem Physiol*, 1988; 91B:691-696.
- 20 11. Bernard A, Fevre-Montange M, Giraudon P, Hardin H, Fabian Wild T y Belin MF. Localization of viral proteins and RNA in hypothalamus of mice infected by canine distemper virus (French). *Virology* 1991; 313:545-551.

12. Bernard A, Fevre-Montange M, Bencsik A, Giraudon P, Fabian Wild T, Confavreux C y Belin MF. Brain structures selectively targeted by canine distemper virus in a mouse model infection. *J Neuropath Exp Neuro* 1993; 52:471-480.
13. Carter JK, Ow CL y Smith RE. Rous-Associated virus type 7 induces a syndrome in chickens characterized by stunting and obesity. *Infection and Immunity* 1983; 39:410-422.
14. Carter JK, Garlich JD, Donaldson WT y Smith RE. Influence of diet on a Retrovirus induced obesity and stunting syndrome. *Avian Dis*, 1983; 27:317-322.
15. Dhurandhar NV, Kulkarni PR, Ajinkya SM y Sherikar AA. Avian adenovirus leading to pathognomic obesity in chickens. *J Bombay Vet College*, 1990; 2:131-132.
16. Dhurandhar NV, Kulkarni PR, Ajinkya SM y Sherikar AA. Effect of adenovirus infection on adiposity in chickens. *Veterinary Microbiology*, 1992; 31:101-107.
17. Dhurandhar NV, Kulkarni PR, Ajinkya SM, Sherikar AA y Atkinson RL. Screening of human sera for antibody against avian adenovirus. *Obesity Research* 1997; 5:464-469.
18. Gosztonyi G y Ludwig H. Borna disease: Neuropathology and pathogenesis. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 1995; 190:39-73.
19. Lyons MJ, Faust IM, Hemmes RB, Buskirk DR, Hirsch J y Zabriskie JB. A virally induced obesity syndrome in mice. *Science* 1982; 216:82-85.
20. So PW, Herlihy AH, Bell JD. Adiposity induced by adenovirus 5 inoculation. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2005 Jun;29(6):603-6.
21. Foy HM y Grayston JT. 1976. Adenoviruses. In "Viral infections of humans: Epidemiology and control". Evans Alfred S. Ed. Plenum Medical. New York., pp53-70.
22. Foy HM y Grayston JT. 1976. Adenoviruses. In "Viral infections of humans: Epidemiology and control". Evans Alfred S. Ed. Plenum Medical. New York., pp53-70.

23. Horvath J, Palkonyay I, Weber J. Group C adenovirus sequences in human lymphoid cells. *J Virol* 1986; 59:189-192.
24. Neumann R, Genersch E, Eggers HJ. Detection of adenovirus nucleic acid sequences in human tonsils in the absence of infectious virus. *Virus Res* 1987; 7:93-97.
- 5 25. Hierholzer JC, Wigand R, Anderson LJ, Adrian T y Gold JWM. Adenoviruses from patients with AIDS: A plethora of serotypes and a description of five new serotypes of subgenus D (Types 43-47). *J Infectious Dis* 1988;158:804-813;
26. Wigand R, Gelderblom H, Wadell G. New human adenovirus (candidate adenovirus 36), a novel member of subgroup D. *Arch Virology* 1980; 64:225-233.
- 10 27. Pereira HG, Huebner RJ, Ginsberg HS y Van Der Veen J. A short description of the adenovirus group. *Virology* 1963; 20:613-620.
28. Shen Y, Shenk TE. Viruses and apoptosis. *Curr Opin Genet Dev.* 1995;5(1):105-11.
29. Javier, R., Raska, K., Jr., Macdonald, G. J., y Shenk, T. (1991). Human adenovirus type 9-induced rat mammary tumors. *J Virol* 65(6), 3192-202.
- 15 30. Javier, R., Raska, K., Jr., y Shenk, T. (1992). Requirement for the adenovirus type 9 E4 region in production of mammary tumors. *Science* 257(5074), 1267-71.
31. Javier, R. T. (1994). Adenovirus type 9 E4 open reading frame 1 encodes a transforming protein required for the production of mammary tumors in rats. *J Virol* 68(6), 3917-24.
- 20 32. Thomas, D. L., Shin, S., Jiang, B. H., Vogel, H., Ross, M. A., Kaplitt, M., Shenk, T. E., y Javier, R. T. (1999). Early region 1 transforming functions are dispensable for mammary tumorigenesis by human adenovirus type 9. *J Virol* 73(4), 3071-9.

33. Weiss, R. S., McArthur, M. J., y Javier, R T. (1996). Human adenovirus type 9 E4 open reading frame 1 encodes a cytoplasmic transforming protein capable of increasing the oncogenicity of CRE6 cells. *J Virol* 70(2), 862-72.
34. Weiss, R. S., Gold, M. O., Vogel, H., y Javier, R T. (1997). Mutant adenovirus type 9 E4 ORF 1 genes define three protein regions required for transformation of CRE6 cells. *J Virol* 71(6), 4385-94.
35. Nourry, C., Grant, S. G., y Borg, J. P. (2003). PDZ domain proteins: plug and play! *Sci STKE* 2003(179), RE7.
36. Latorre, I. J., Roh, M. H., Frese, K. K., Weiss, R. S., Margolis, B., y Javier, R T. (2005). Viral oncoprotein-induced mislocalization of select PDZ proteins disrupts tight junctions and causes polarity defects in epithelial cells. *J Cell Sci* 118(Pt 18), 4283-93.
37. Frese, K. K., Lee, S. S., Thomas, D. L., Latorre, I. J., Weiss, R. S., Glaunsinger, B. A., y Javier, R. T. (2003). Selective PDZ protein-dependent stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase by the adenovirus E4-ORF1 oncoprotein. *Oncogene* 22(5), 710-21.
38. Sakaue, H., Ogawa, W., Matsumoto, M., Kuroda, S., Takata, M., Sugimoto, T., Spiegelman, B. M., y Kasuga, M. (1998). Posttranscriptional control of adipocyte differentiation through activation of phosphoinositide 3 kinase. *J Biol Chem* 273(44), 28945-52.
39. Tomiyama, K., Nakata, H., Sasa, H., Arimura, S., Nishio, E., y Watanabe, Y. (1995). Wortmannin, a specific phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, inhibits adipocytic differentiation of 3T3-L1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 212(1),263-9.
40. Farmer SR Regulation of PPARgamma activity during adipogenesis. *Int J Obes . 2005 Suppl* 1:S13-6.
41. Gregoire FM, Smas CM y Sul HS. Understanding adipocyte differentiation. *Physiological Reviews* 1998 78(3): 783-809.

42. Ntambi JM, Young-Cheul K. Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr.* 2000, 30(12):3122S-3126S. Review.
43. Hansen JB, Zhang H, Rasmussen TH, Petersen RK, Flindt EN, Kristiansen K. Peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPARdelta)-mediated regulation of preadipocyte proliferation and gene expression is dependent on cAMP signaling. *J Biol Chem.* 2001;276(5):3175-82.
44. Reusch JE, Colton LA, Klemm DJ. CREB activation induces adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Mol Cell Biol.* 2000; 20(3):1008-20.
45. Chiou GY, Fong JC. Synergistic effect of prostaglandin F2alpha and cyclic AMP on glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. *J Cell Biochem.* 2005; 94(3):627-34.
46. Cornelius P, Marlowe M, Call K, Pekala PH. Regulation of glucose transport as well as glucose transporter and immediate early gene expression in 3T3-L1 preadipocytes by 8-bromo-cAMP. *J Cell Physiol.* 1991;146(2):298-308.
47. Burgering BM, Coffey PJ. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature.* 1995 Aug 17;376(6541):599-602.
48. Magun R, Burgering BM, Coffey PJ, Pardasani D, Lin Y, Chabot J, Sorisky A. Expression of a constitutively activated form of protein kinase B (c-Akt) in 3T3-L1 preadipose cells causes spontaneous differentiation. *Endocrinology.* 1996 Aug;137(8):3590-3.
49. Atkinson RL, Whigham LD, Kim YC, Israel BA, Dhurandhar NV, y Strasheim A. Evaluation of human adenoviruses as an etiology of obesity in chickens. *Int J Obesity* 2001;25 (suppl 2):S12.
50. Pasarica M, Mahida M, Ou Yang H, Yu M, Mohankumar S, Jen K-L C y Dhurandhar NV. Human adenovirus-36 (Ad-36) induces adiposity in rats. *Obesity Research* 2004, 12 (supplement): A122.

51. Dhurandhar NV, Vangipuram S, Tian J, Stanhope K, Havel P y Heydari AR. Regulation of Leptin Expression and Secretion by a Human Adenovirus. Obesity Research 2003, 11:A38.
52. Komers R, Vrana A. Thiazolidinediones - tools for the research of metabolic syndrome X. Physiol Res. 1998;47(4):215-25.
- 5 53. Verges B. Clinical interest of PPARs ligands. Diabetes Metab. 2004 Feb;30(1):7-12.
54. Weyer C, Foley JE, Bogardus C, Tataranni PA, Pratley RE, Enlarged subcutaneous abdominal adipocyte size, but not obesity itself, predicts type II diabetes independent of insulin resistance. Diabetologia. 2000 Dec;43(12):1498-506.
55. Stern JS, Batchelor BR, Hollander N, Cohn CK, Hirsch J. Adipose-cell size and immunoreactive insulin levels in obese and normal-weight adults. Lancet. 1972 Nov 4;2(7784):948-51.
- 10 56. Pasarica M, Holland TC, y Dhurandhar NV. Enhanced cell cycle activation by adenovirus 36 may contribute to increased lipid accumulation in 3T3-L1 cells. FASEB J 2005,19 (4): A70.
57. Dhurandhar NV, Israel BA, Kolesar JM, Mayhew GF, Cook ME y Atkinson RL. Increased adiposity in animals due to a human virus. Int J Obesity 2000; 24: 989-996.
- 15 58. Yamada T, Ueda M, Seno M, Kondo A, Tanizawa K, y Kuroda S. Novel Tissue and Cell Type-specific Gene / Drug Delivery System Using Surface Engineered Hepatitis B Virus Nano-particles. Current Drug Targets - Infectious Disorders, Volume 4, Number 2, June 2004, pp. 163-167(5).
59. Farokhzad OC, Jon S, Khademhosseini A, Tran TN, Lavan DA, Langer R. Nanoparticle-aptamer bioconjugates: a new approach for targeting prostate cancer cells. Cancer Res. 2004 Nov 1;64(21):7668-72.
- 20 60. Virella-Lowell I, Zusman B, Foust K, Loiler S, Conlon T, Song S, Chesnut KA, Ferkol T, Flotte TR. Enhancing rAAV vector expression in the lung. J Gene Med. 2005 Jul;7(7):842-50.

61. Loiler SA, Tang Q, Clarke T, Campbell-Thompson ML, Chiodo V, Hauswirth W, Cruz P, Perret-Gentil M, Atkinson MA, Ramiya VK, Flotte TR. Localized gene expression following administration of adeno-associated viral vectors via pancreatic ducts. *Mol Ther.* 2005 Sep; 12(3):519-27.
- 5 62. Kou B, Li Y, Shi Y, Xia J, Wang X, Wu S. Gene therapeutic exploration: retrovirus-mediated soluble vascular endothelial growth factor receptor-2 (sFLK-1) inhibits the tumorigenicity of S180, MCF-7, and B16 cells *in vivo*. *Oncol Res.* 2005;15(5):239-47.
63. de Souza CJ, Eckhardt M, Gagen K, Dong M, Chen W, Laurent D, Burkey BF. Effects of pioglitazone on adipose tissue remodeling within the setting of obesity and insulin resistance. *Diabetes.* 2001 Aug;50(8):1863-71.
- 10 64. Fornsinn C, Waldhausl W. Thiazolidinediones: metabolic actions *in vitro*. *Diabetologia.* 2002 Sep;45(9):1211-23.
65. Kanda H et al. MCP-I contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest.* Jun;116(6):1494-505, 2006.
- 15 66. Douen AG, Ramlal T, Rastogi S, Bilan PJ, Cartee GD, Vranic M, Holloszy JO, y Klip A. *J. Biol. Chem.* 1990 265,13427-13430.
67. Henry RR, Abrams L, Nikoulina S. y Ciaraldi TP. Insulin action and glucose metabolism in nondiabetic control and NIDDM subjects. Comparison using human skeletal muscle cell cultures. *Diabetes.* 1995 44:936-946.
- 20 68. Wang ZQ, Bell-Farrow AD, Sonntag WE, Cefalu WT. Effect of age and caloric restriction on insulin receptor binding and glucose transporter levels in aging rats. *Exp Gerontology.* 1997 32:671-684.
69. Klip, A., G. Li, y W. Logan. Induction of sugar uptake response to insulin by serum depletion in fusing L 6 myoblaste. *Am. J. Physiol.* 1984, 247:E291-E296.

70. Wang ZQ, Zhang XH, Russell JC, Hulver M & Cefalu WT. Chromium picolinate enhances skeletal muscle cellular insulin signaling *in vivo* obese, insulin-resistant JCR:LA-cp rats. *J Nutr.* 2006, 136:415- 420.
71. Suomalainen M, Nakano MY, Boucke K, Keller S. Greber UF (2001) Adenovirus-activated PKA and p38/MAPK pathways boost microtubule-mediated nuclear targeting of virus. *Embo J* 20: 5 1310-1319.
72. Rajala MS, Rajala RV, Astley RA, Butt AL, Chodosh J (2005) Corneal cell survival in adenovirus type 19 infection requires phosphoinositide 3-kinase/Akt activation. *J Virol* 79: 12332-12341.
73. Tan PH, Xue SA, Manunta M, Beutelspacher SC, Fazekasova H, et al. (2006) Effect of vectors 10 on human endothelial cell signal transduction: implications for cardiovascular gene therapy. *Arterioscler Thromb Vase Biol* 26: 462-467.
74. Frese KK, Latorre IJ, Chung SH, Caruana G. Bernstein A, et al. (2006) Oncogenic function for the Dlg1 mammalian homolog of the *Drosophila* discs-large tumor suppressor. *Embo J* 25: 1406-1417.
- 15 75. Fusinski et al, "Induction of Adipogenesis by Activation of Cell Signaling Pathways by Adenovirus 36," an abstract and poster presentation to American Society of Microbiology. December 1-4, 2004.
76. P.M. Rogers et al, "E4 orf 1 gene of adipogenic human adenovirus Ad-36 . enhances cAMP and insulin signaling pathways and induces differentiation in preadipocytes," *FASEB. J.*, vol. 20(4): A165 (2006). 20
77. ZQ. Wang et al, "Effect of Adenovirus-36 Infection on Aquaporins In Preadipocytes and Adipocytes," presented at American Diabetic Association, Honolulu, Hawaii, September 16-19, 2006.

78. M. A. Rathod et al, "Human Adenovirus Ad-36, Infection Induces Differentiation and Replication of Preadipocytes," *Obesity Reviews*, vol. 7(suppl 2):138(2006).
79. M. Pasarica et al. "Induction of Differentiation in Human Preadipocytes May Contribute to Adipogenic Effect of Human Adenovirus Ad-36," *Obesity Reviews*,  
5 vol. 7(suppl 2):36 (2006).
80. P.M. Rogers et al, "Human Adenovirus Ad-36 via E4 orf 1 Activity Up-regulates Pro-Adipogenic Signal Transduction Pathways and Increases Lipid Accumulation in Human Adipose Derived Stem Cells" *Obesity*, vol. 14(9): A 13 (2006).
81. M.A. Rathod et al, "Unique properties of human adenovirus 36 contribute to its adipogenic effect," *Obesity*, vol. 14(9): A 52 (2006).  
10
82. P.M. Rogers et al, "An Organotypic Culture Model of Human Adipose Tissue," abstract submitted to International Fat Applied Technology Society, October 21-24, 2006, Baton Rouge, Louisiana.
83. M. Pasarica et al, "A novel lipogenic modulator of human adipose derived stem cells: A human adenovirus," abstract submitted to international Fat Applied Technology Society,  
15 October 21-24, 2006, Baton Rouge, Louisiana.
84. S. A. Loiler et al, "Rapid Immune Cytokine Suppression Induced by Adenovirus-36 Infection," abstract submitted to International Fat Applied Technology Society, October 21-24, 2006, Baton Rouge, Louisiana.

20

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> BOARD OF SUPERVISORS OF LOUISIANA STATE UNIVERSITY AND AGRICULTURAL AND MECHANICAL COLLEGE

5 Dhurandhar, Nikhil V.  
Holland, Thomas C.  
Wang, Zhong Q.

<120> Gen y proteina E4 orf 1 del adenovirus-36 y sus usos

10

<130> Dhurandhar OSP09W

<140> PCT/US2006/\_\_\_\_\_

<141> 2006-11-30

15

<150> 60/741,399

<151> 2005-11-30

<160> 4

20

<170> Patent In version 3.3

<210> 1

<211> 378

<212> ADN

<213> Adenovirus tipo 36

<400> 1

5	atggctgaat ctctgatgc tttcatagat agccctggag ggatcgctcc cgtccaggaa	60
	ggggctagca atagetatat ctcttttgc cccgaatctt tccacattcc tccgatggg	120
	gtgatattgc ttcacctcag agtgagcgtg ctggttccta ctggatatca gggcagattt	180
	atggccttga atgactacca tgccaggggc atactaacc agtccgatgt gatattgcc	240
	gggagaagac atgatctctc tggctgctc ttaaccaca cggaccgatt tttgatgtc	300
10	cgcgagggcc accgagtggg aaccctgctg ctggagagag tgattttcc ttcagtga	360
	atagccaccc tggtttag	378

<210> 2

<211> 125

15 <212> PRT

<213> Adenovirus tipo 36

<400> 2

20 Met Ala Glu Ser Leu Tyr Ala Phe Ile Asp Ser Pro Gly Gly Ile Ala

1                    5                    10                    15

Pro Val Gln Glu Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Ile Phe Phe Cys Pro Glu

20                    25                    30

Ser Phe His Ile Pro Pro His Gly Val Ile Leu Leu His Leu Arg Val

35 40 45

Ser Val Leu Val Pro Thr Gly Tyr Gln Gly Arg Phe Met Ala Leu Asn

5 50 55 60

Asp Tyr His Ala Arg Gly Ile Leu Thr Gln Ser Asp Val Ile Phe Ala

65 70 75 80

10 Gly Arg Arg His Asp Leu Ser Val Leu Leu Phe Asn His Thr Asp Arg

85 90 95

Phe Leu Tyr Val Arg Glu Gly His Pro Val Gly Thr Leu Leu Leu Glu

100 105 110

15

Arg Val Ile Phe Pro Ser Val Arg Ile Ala Thr Leu Val

115 120 125

<210> 3

20 <211> 366

<212> ADN

<213> Adenovirus tipo 36

<400> 3

ES 2 472 325 T3

atggctgaat ctctgatgc tttctagat agccctggag ggatcgctcc cgtccaggaa 60  
 ggggctagca atagatatat ctcttttgc cccgaatctt tccacattcc tccgcatggg 120  
 gtgatattgc ttcacctcag agtgagcgtg ctggttccta ctggatatca gggcagattt 180  
 atggccttga atgactacca tgccaggggc atactaacc agtccgatgt gatatttggc 240  
 5 gggagaagac atgatctctc tgtgctgctc ttaaccaca cggaccgatt tttgatgtc 300  
 cgcgagggcc acccagtggg aaccctgctg ctggagagag tgattttcc ttcagtgaga 360  
 atatag 366

<210> 4

10 <211> 121

<212> PRT

<213> Adenovirus tipo 36

<400> 4

15

Met Ala Glu Ser Leu Tyr Ala Phe Ile Asp Ser Pro Gly Gly Ile Ala

1 5 10 15

Pro Val Gln Glu Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Ile Phe Phe Cys Pro Glu

20 20 25 30

Ser Phe His Ile Pro Pro His Gly Val Ile Leu Leu His Leu Arg Val

35 40 45

Ser Val Leu Val Pro Thr Gly Tyr Gln Gly Arg Phe Met Ala Leu Asn

50 55 60

Asp Tyr His Ala Arg Gly Ile Leu Thr Gin Ser Asp Val Ile Phe Ala

5 65 70 75 80

Gly Arg Arg His Asp Leu Ser Val Leu Leu Phe Asn His Thr Asp Arg

85 90 95

10 Phe Leu Tyr Val Arg Glu Gly His Pro Val Gly Thr Leu Leu Leu Glu

100 105 110

Arg Val Ile Phe Pro Ser Val Arg Ile

115 120

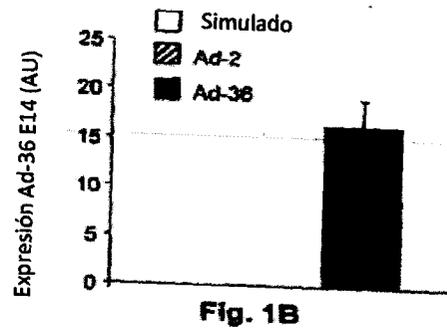
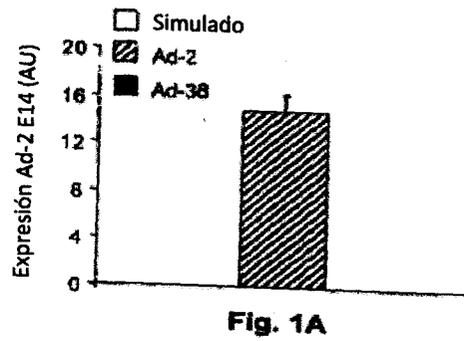
### REIVINDICACIONES

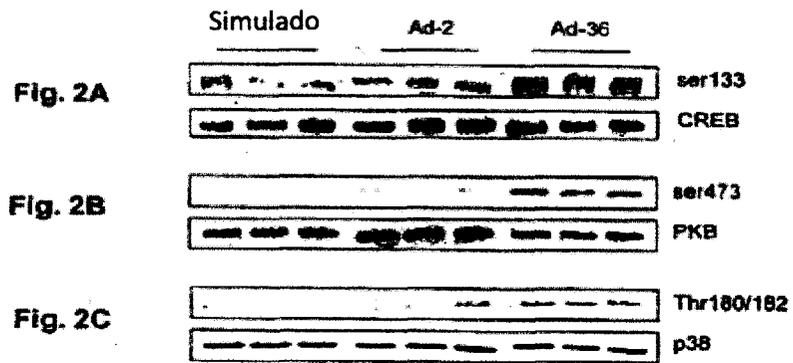
1. Un ácido nucleico aislado que consiste en la SEQ ID nº 1 o una que codifica la misma secuencia de aminoácidos que la SEQ ID nº 1 según la degeneración del código genético.
- 5 2. El ácido nucleico mencionado en la reivindicación 1, donde dicho ácido nucleico es SEQ ID nº 1.
3. Un vector de transformación que comprende el ácido nucleico mencionado en la reivindicación 1, donde dicho vector se adapta para transponer las células adiposas mamíferas o células musculares esqueléticas mamíferas.
- 10 4. Un promotor que es funcional en las células animales, unido de forma operativa a un ácido nucleico como el mencionado en la reivindicación 1.
5. Una célula animal transformada con el ácido nucleico mencionado en la reivindicación 4.
6. Una proteína aislada cuya secuencia de aminoácidos comprende la SEQ ID nº 2.
7. La proteína mencionada en la reivindicación 6, donde la secuencia de aminoácidos de dicha proteína es SEQ ID nº 2.
- 15 8. La proteína de las reivindicaciones 6 ó 7 para el uso en el tratamiento o mejora de los síntomas de una enfermedad en un paciente mamífero donde la enfermedad se selecciona de entre las del grupo que comprende lipodistrofia, diabetes o una enfermedad debida a la resistencia a la insulina y dicho uso comprende la administración a un paciente de una cantidad terapéuticamente efectiva de la proteína donde los síntomas del paciente mejoran  
20 después de dicha administración.
9. La proteína para su uso como se indica en la reivindicación 8, donde la enfermedad está relacionada con la resistencia a la insulina y donde la sensibilidad del paciente a la insulina aumenta después de dicha administración.

10. La proteína para su uso como se indica en la reivindicación 8, donde la enfermedad es lipodistrofia y donde el número de células del tejido adiposo en el paciente aumenta después de dicha administración.
- 5 11. La proteína para su uso como se indica en la reivindicación 8, donde la diabetes es diabetes debida a una alta concentración de glucosa en el suero y donde la cantidad de glucosa en el suero disminuye después de dicha administración.
- 10 12. La proteína para su uso como se indica en la reivindicación 8, donde se administra la proteína adenovirus-36 E4 orf 1 introduciendo al mamífero un ácido nucleico que codifica la proteína del adenovirus-36 E4 orf 1, de manera que se permita la expresión de la proteína del adenovirus-36 E4 orf 1.
- 15 13. La proteína para su uso como se indica en la reivindicación 12, donde se introduce el ácido nucleico mediante un método seleccionado de entre los del siguiente grupo que consiste en electroporación, transfección usando DEAE-dextrano, transfección usando fosfato de calcio, fusión de liposomas catiónicos, fusión de protoplastos, creación de un campo eléctrico *in vivo*, bombardeo con microproyectiles recubiertos con ADN, inyección con virus recombinantes defectuosos en la replicación, recombinación homóloga, terapia genética *in vivo*, terapia genética *ex vivo*, vectores virales y transferencia de ADN desnudo.
- 20 14. El vector de la reivindicación 3 para el empleo en mejorar o inducir adipogénesis en un paciente mamífero; dicho empleo comprende la administración al tejido adiposo del paciente del vector donde la expresión de la secuencia codificada del aminoácido en el tejido adiposo del paciente causa la adipogénesis.
15. El vector de la reivindicación 3 para el empleo en mejorar o inducir la captación de glucosa en un paciente mamífero; dicho empleo comprende la administración al tejido muscular esquelético del paciente del vector donde la expresión de la secuencia codificada del

aminoácido en el tejido muscular esquelético del paciente causa el aumento en la captación de glucosa.

- 5
16. El vector de la reivindicación 3 para el empleo en mejorar o inducir la sensibilidad a la insulina en un paciente mamífero; dicho empleo comprende la administración al tejido adiposo del paciente del vector donde la expresión de la secuencia codificada del aminoácido en el tejido adiposo del paciente causa el aumento en la sensibilidad a la insulina.
  17. El vector de cualquiera de las reivindicaciones 3, 14, 15 ó 16, donde el ácido nucleico comprende la SEQ ID nº 1.





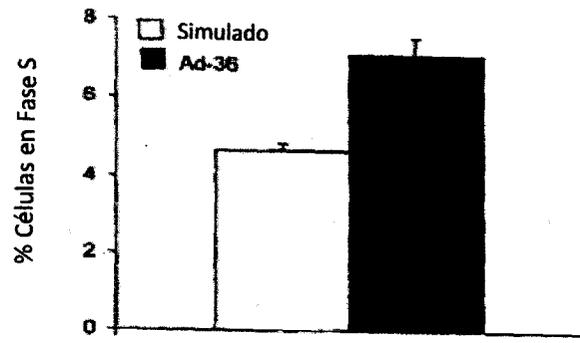
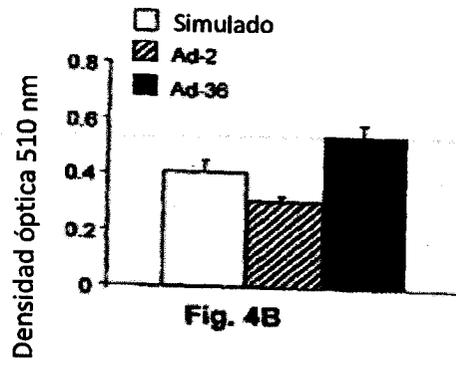
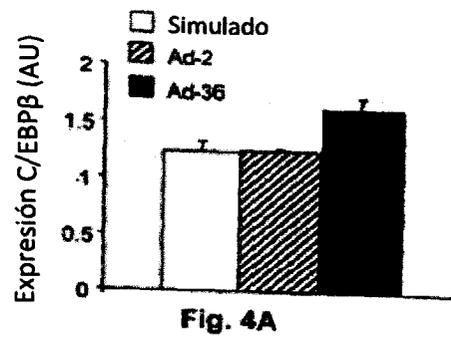


Fig. 3



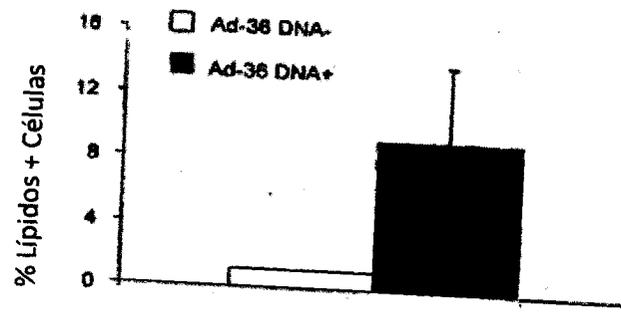
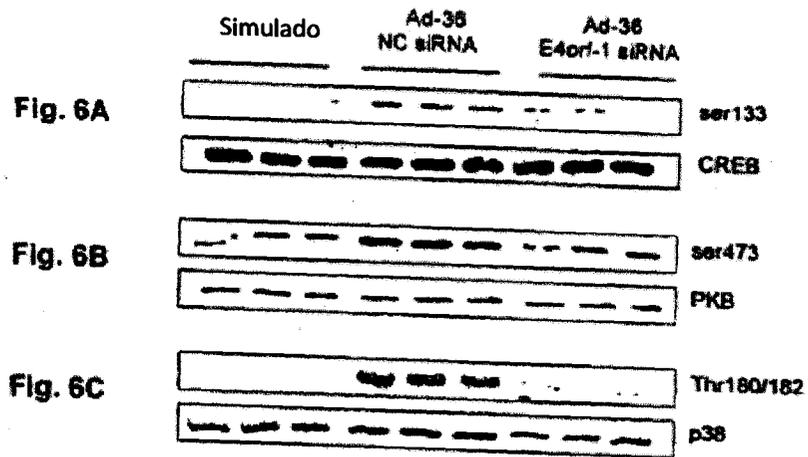
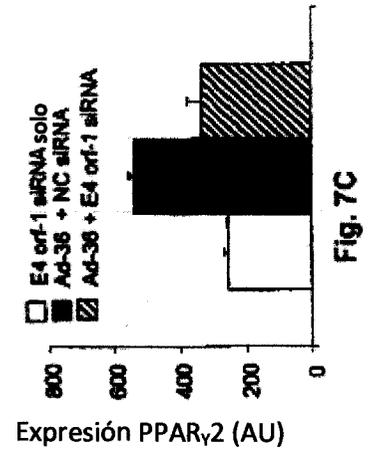
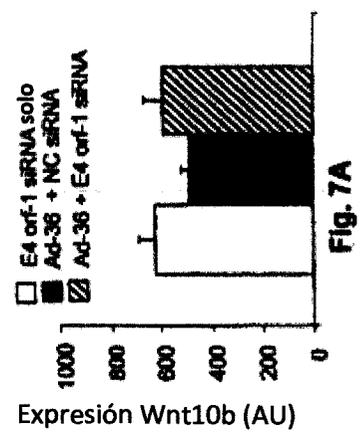
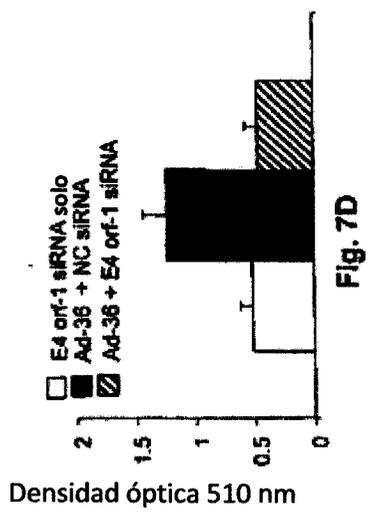
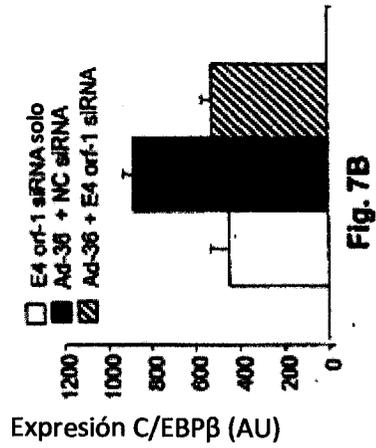


Fig. 5





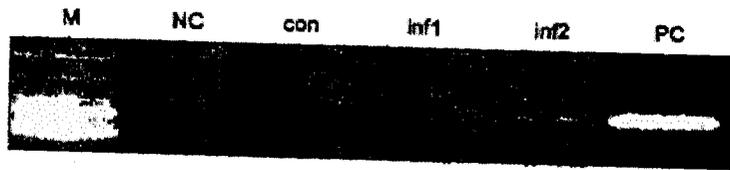


Fig. 8A

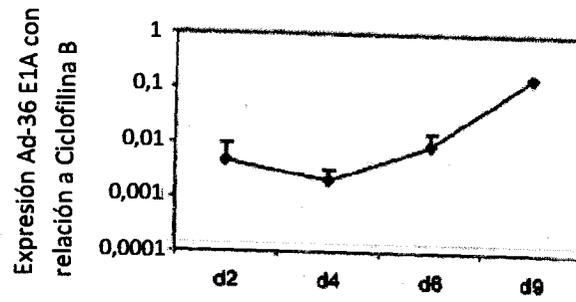


Fig. 8B

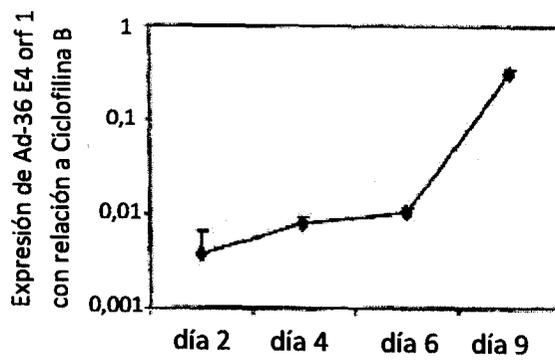


Fig. 8C

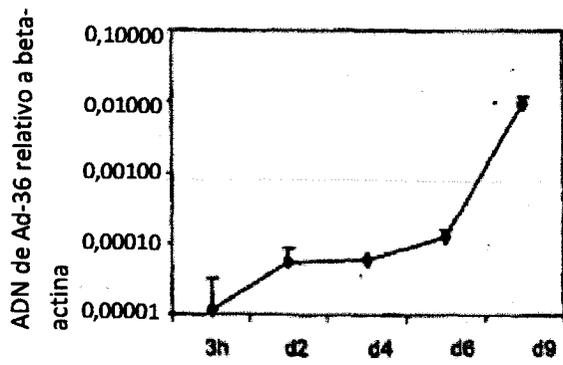


Fig. 8D

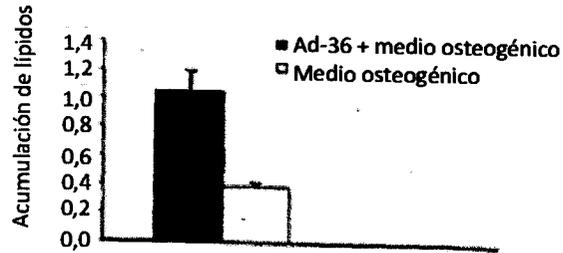


Fig. 9A

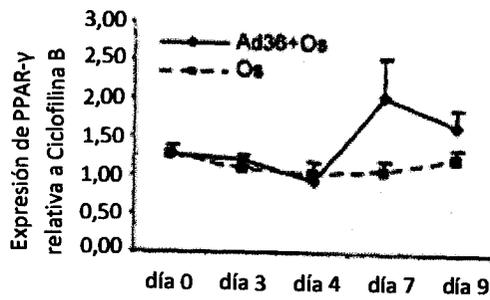


Fig. 9B

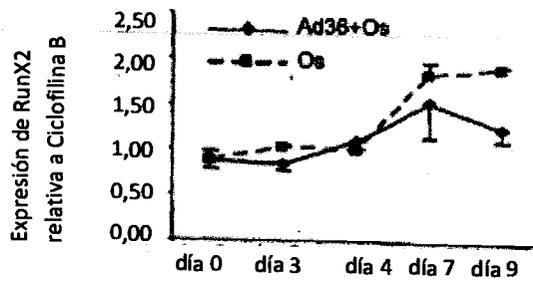


Fig. 9C

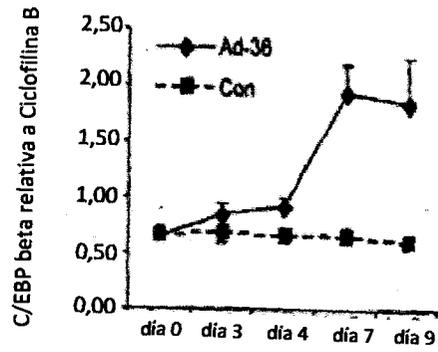


Fig. 10A

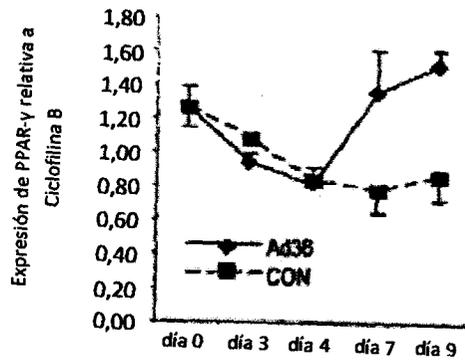


Fig. 10B

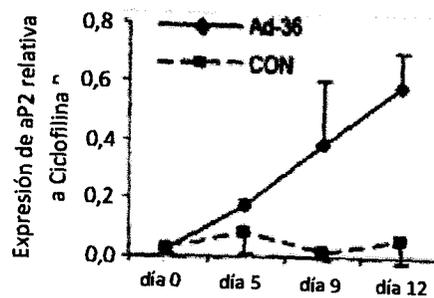


Fig. 10C

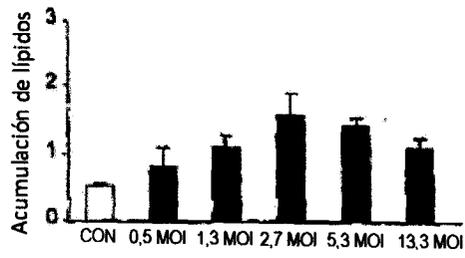


Fig. 11A

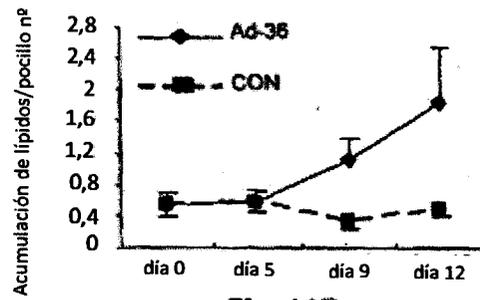


Fig. 11B

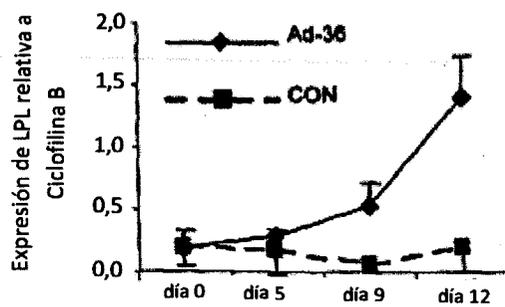


Fig. 11C

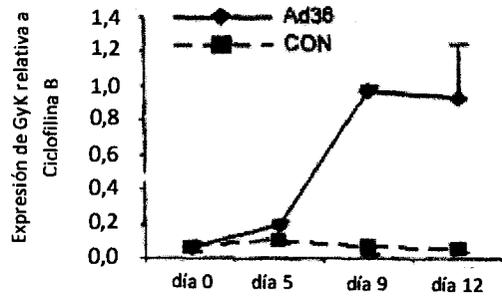


Fig. 11D

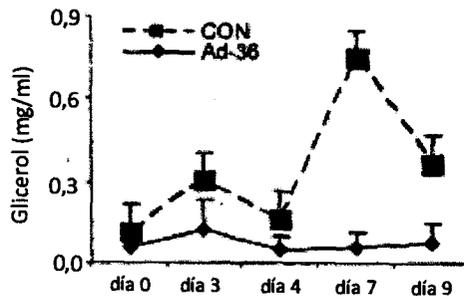


Fig. 11E

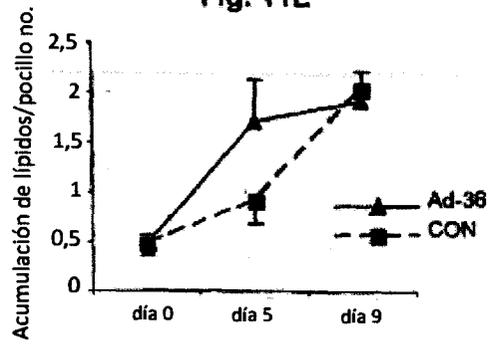


Fig. 11F

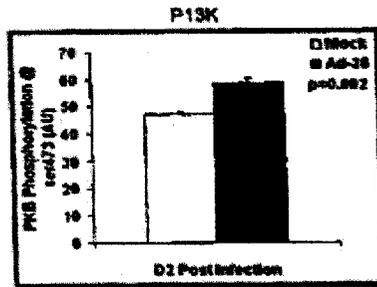


Fig. 12A

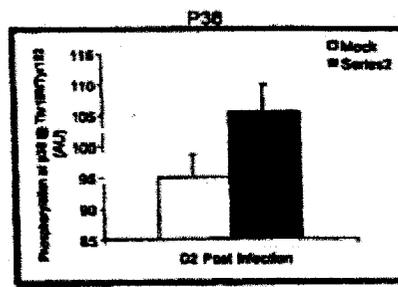


Fig. 12B

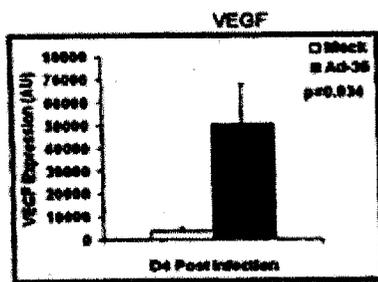


Fig. 12C

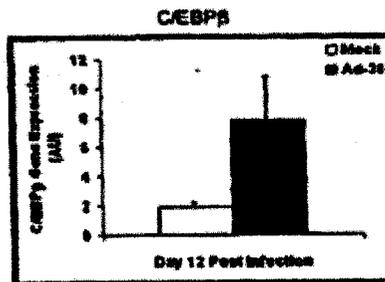


Fig. 12D

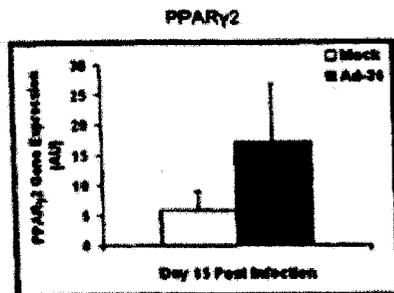


Fig. 12E

Fig. 12A, B, C y D: Mock – Simulado

Fig. 12A: Eje Y – Fosforilación de PKB a ser473 (AU).

Eje X – Día 2 post-infección

Fig. 12B: Eje Y – Fosforilación de p38 a Thr120/Tyr 182 (AU).

Eje X – Día 2 post-infección

Fig. 12C: Eje Y – Expresión de VEGF (AU).

Eje X – Día 4 post-infección

Fig. 12D: Eje Y – Expresión genética de C/EBPβ (AU).

Eje X – Día 12 post-infección

Fig. 12E: Eje Y – Expresión genética de PPARγ2 (AU).

Eje X – Día 15 post-infección

Secreción de adiponectina en medio  
D 7 N° MDI, p=0,032

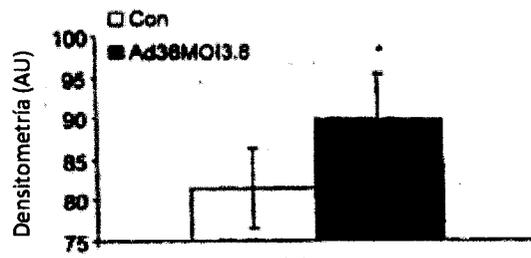


Fig. 13A

Secreción de adiponectina en medio de  
expresores constitutivos  
Dia 3, \*p<0,04

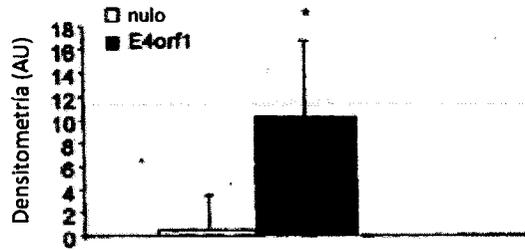


Fig. 13B

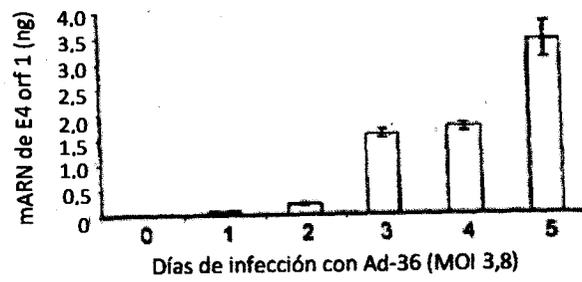


Fig. 14A

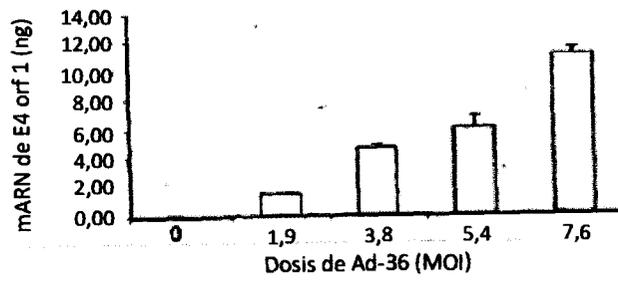
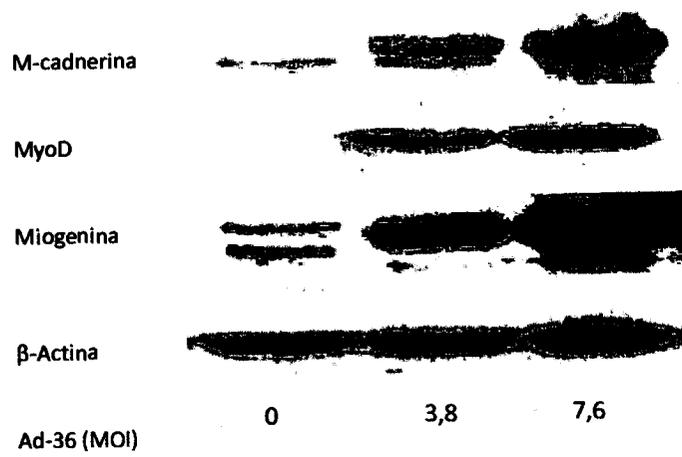


Fig. 14B



**Fig. 15**

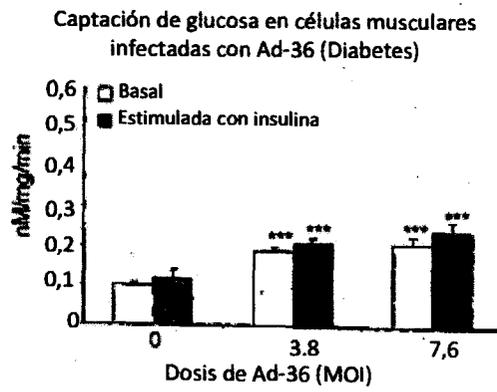


Fig. 16A

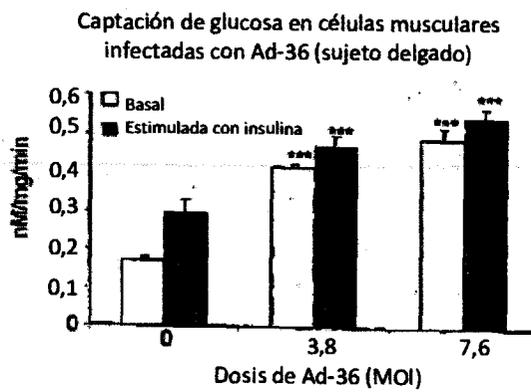


Fig. 16B

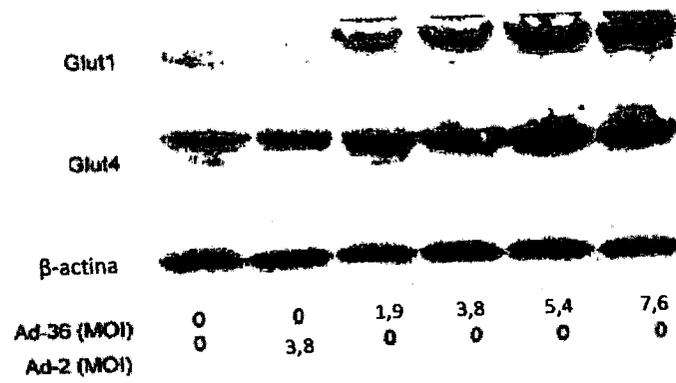
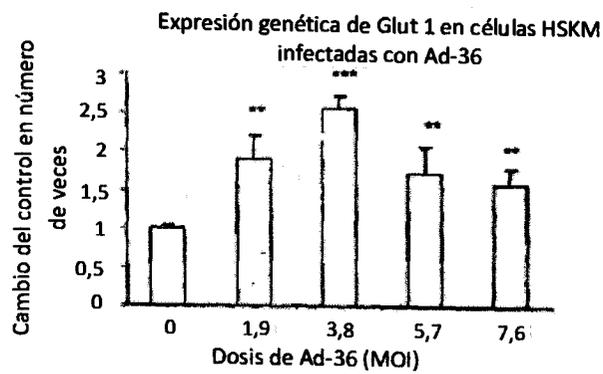
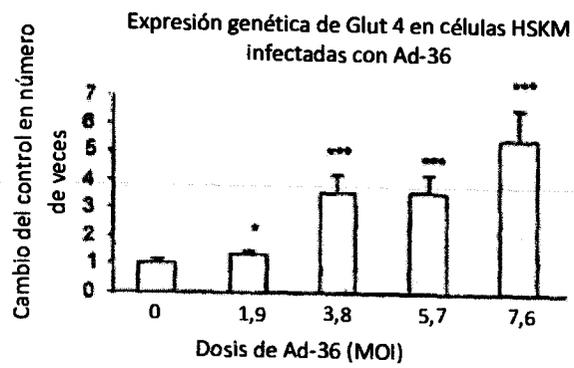


Fig. 17



**Fig. 18A**



**Fig. 18B**

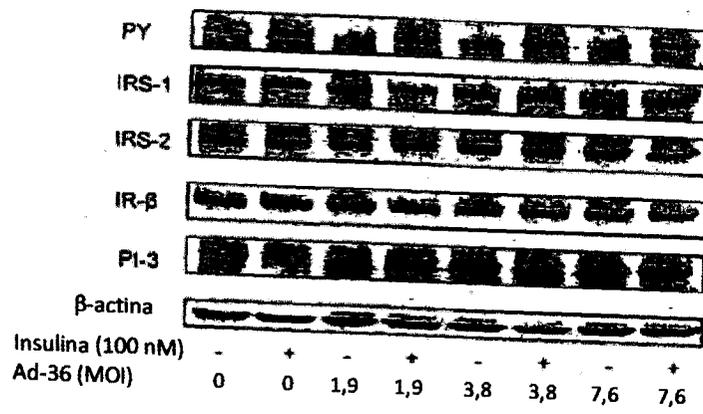
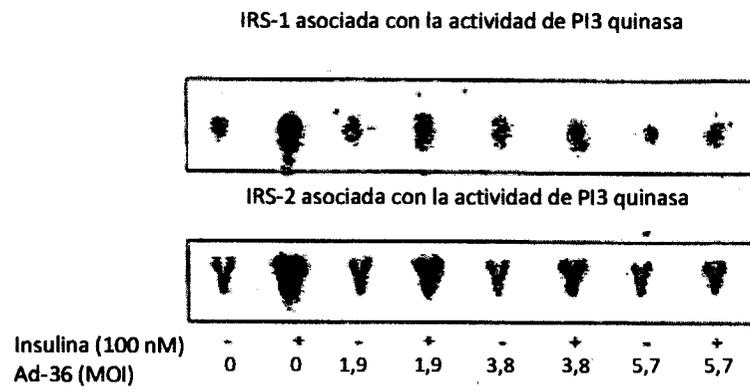
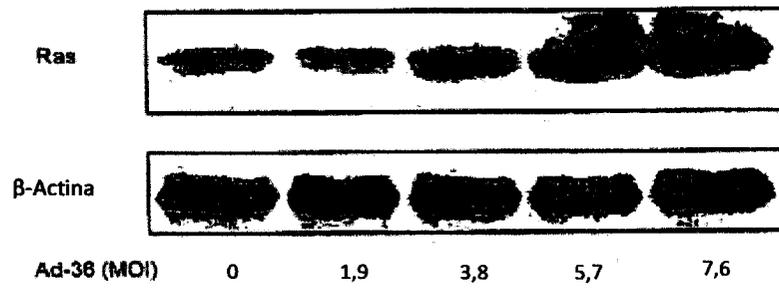


Fig. 19



**Fig. 20**



**Fig. 21**

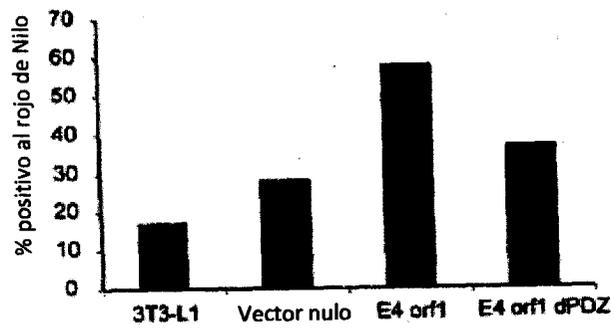


Fig. 22A

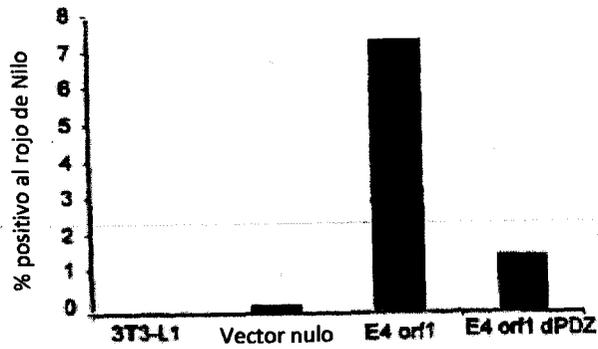


Fig. 22B

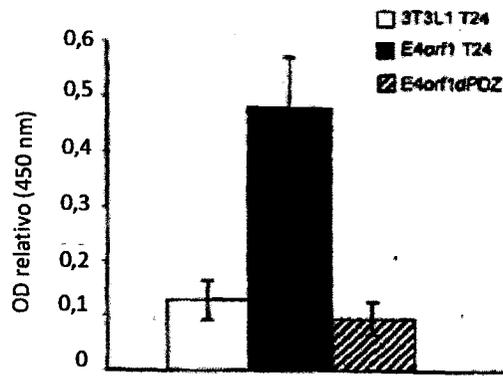


Fig. 22C

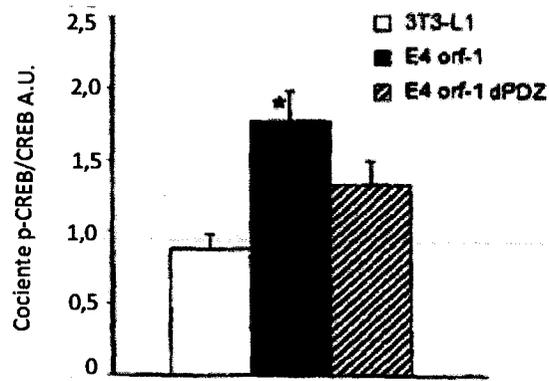


Fig. 22D

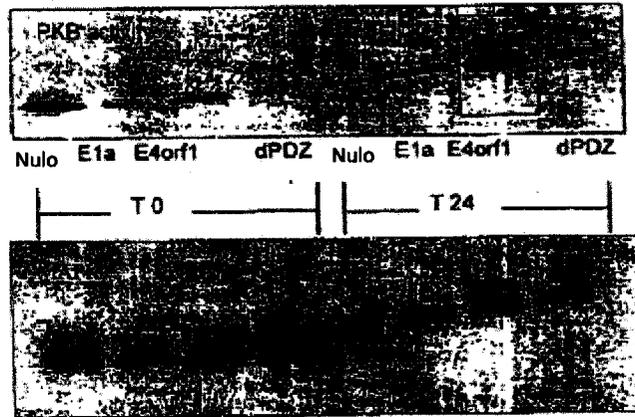


Fig. 22E

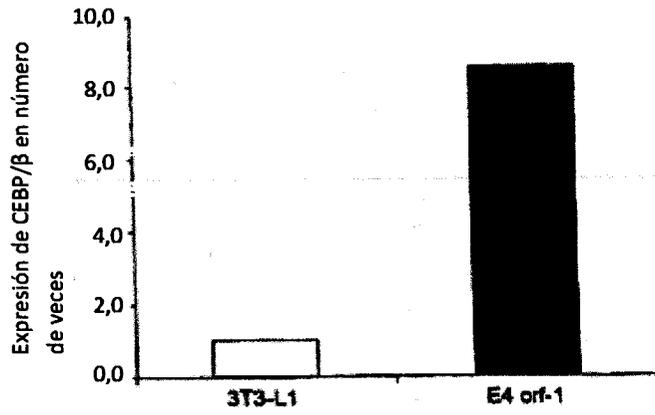


Fig. 22F