

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 550 962**

51 Int. Cl.:

A61K 38/16 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

A61P 3/06 (2006.01)

A61P 3/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.07.2011 E 11741354 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.09.2015 EP 2590665**

54 Título: **Proteína E4orf1 de adenovirus Ad36 para prevención y tratamiento de enfermedad de hígado graso no alcohólico**

30 Prioridad:

08.07.2010 US 362443 P

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

13.11.2015

73 Titular/es:

**BOARD OF SUPERVISORS OF LOUISIANA
STATE UNIVERSITY AND AGRICULTURAL AND
MECHANICAL COLLEGE (100.0%)
Pennington Biom. Res. Center 6400 Perkins
Road, B1035 Pennington
Baton Rouge, Louisiana 70808-4124, US**

72 Inventor/es:

DHURANDHAR, NIKHIL

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 550 962 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

Proteína E4orf1 de adenovirus Ad36 para prevención y tratamiento de enfermedad de hígado graso no alcohólico

Campo

5 La invención generalmente se refiere a proteína E4orf1 de adenovirus-36 para uso en métodos de tratamiento o prevención de los síntomas de la enfermedad de hígado graso no alcohólico en un individuo, y al uso de la proteína E4orf1 de adenovirus-36 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de los síntomas de la enfermedad de hígado graso no alcohólico en un individuo.

Antecedentes

10 El hígado tiene un rol predominante en el metabolismo de la grasa y normalmente acumula lípidos (grasas), pero solamente hasta "niveles normales". La acumulación excesiva de lípido en los hepatocitos da lugar a una esteatosis hepática, la cual es dañina metabólicamente y puede resultar de una variedad de disfunciones del hígado, tales como la beta-oxidación reducida o la secreción reducida de lipoproteínas. Otra de las muchas funciones del hígado es liberar glucosa a la circulación. En individuos sanos, las células hepáticas liberan glucosa regularmente para regular los niveles de glucosa en la sangre. En contraste, en individuos con diabetes, las células hepáticas liberan glucosa de modo incontrolable lo cual incrementa los niveles de glucosa en la sangre. Por lo tanto reducir la liberación de glucosa desde las células hepáticas (hepatocitos) puede ser muy efectivo en el control de la diabetes.

15 La acumulación excesiva de lípido en el hígado puede contribuir a la resistencia a insulina y de esta manera a un mal control glucémico. La adiponectina, una proteína secretada por el tejido adiposo mejora la sensibilidad a insulina de muchas maneras. La adiponectina actúa a través de receptores de adiponectina AdipoR1 y AdipoR2 para activar rutas de AMPK y PPAR α (32), para reducir la resistencia sistémica y hepática a insulina y para atenuar la inflamación y la fibrosis de hígado (32). Esto es un determinante fuerte del contenido hepático de lípido, tal como se indica por parte de los modelos de ratón de adiponectina KO o sobre-expresión (14, 33). La adiponectina disminuye la esteatosis hepática mediante el aumento de oxidación hepática de lípido, mediada por AMPK (34).

20 La enfermedad de ácido graso no alcohólico (NAFLD por non-alcoholic fatty liver disease) afecta hasta un 20% de adultos en los Estados Unidos e incluye la acumulación excesiva de grasa en el hígado (esteatosis hepática). Con frecuencia, se asocia con obesidad y resistencia a insulina (1, 2). La prevalencia de NAFLD es de aproximadamente 70-80% en adultos con diabetes tipo 2 u obesidad (3-5), 3-10%, en todos los niños y hasta 40-70% en niños obesos (4). La NAFLD está asociada con mayor mortalidad en general relacionada con el hígado (6, 7). Además de la esteatosis, pueden desarrollarse inflamación y fibrosis y la NAFLD puede progresar a esteato-hepatitis no alcohólica (NASH), cirrosis, falla hepática y carcinoma hepatocelular. Mientras que la esteatosis es potencialmente reversible, una vez progresa a NASH no existen tratamientos establecidos y los pocos medicamentos disponibles presentan un éxito limitado (8, 9). Por lo tanto, la prevención y/o el tratamiento oportunos de la esteatosis hepática son críticos. Sin embargo, incluso para NAFLD, el tratamiento con medicamentos tiene un éxito marginal (10), y reducir la captación de grasa en la dieta y la obesidad es el pilar del tratamiento (11). A pesar de los obvios beneficios para la salud, el cumplimiento con los cambios en el estilo de vida para lograr mejoramientos sostenidos en la dieta o la obesidad ha demostrado ser un reto para la población general.

25 Mientras que la adiposidad excesiva o una dieta rica en grasa (HF) son factores de riesgo para NAFLD, el adenovirus 36 (Ad36) atenúa la esteatosis hepática en ratones a pesar de una dieta HF continuada y sin una reducción en adiposidad visceral o subcutánea. Ad36 parece manipular de modo cualitativo el tejido adiposo existente para atenuar la esteatosis hepática inducida por una dieta HF. Este cambio en la calidad metabólica del tejido adiposo por parte de Ad36 incluye una captación mayor y una liberación reducida de ácidos grasos y mayor secreción de adiponectina (12, 13). Esta habilidad única de Ad36 ofrece un modelo extraordinario para anular creativamente los efectos mórbidos de adiposidad excesiva o de captación excesiva de grasa en la dieta, sin la necesidad de reducirla. La clase de medicamentos de tiazolidinedionas (TZDs) también puede mejorar la calidad metabólica del tejido adiposo, aumentar la adiponectina y mejorar la esteatosis hepática (14-16). Han sido reportados efectos secundarios graves de TZDs (17-19).

30 Ad36 no causa morbidez o mortalidad no intencionada en animales. Adicionalmente, Ad36 parece tener distintas ventajas sobre la acción de las TZDs, particularmente en presencia de una dieta HF. A diferencia de las TZDs, Ad36 no incrementa adiposidad en ratones alimentados con AG (20, 21). En presencia de una dieta AG, las TZDs pueden mejorar control glucémico pero pueden promover en concurrencia el almacenamiento de lípido en diversos órganos, incluido el hígado (20, 22, 23). Esto limita el alcance de las TZDs, si no se reduce la captación de grasa. Debido a sus efectos independientes de grasa en la dieta y de adiposidad, la acción potencial de Ad36 en las múltiples vías metabólicas puede ofrecer una estrategia anti-esteatosis novedosa que sea clínicamente más atractiva y, por lo tanto, potencialmente más efectiva.

35 El empleo de determinadas propiedades de virus para propósitos benéficos ácido aplicado por varios años, incluido el uso de propiedades bactericidas de un virus bacteriófago (27), la capacidad oncolítica de un adenovirus mutante

(28) o el uso de virus de Herpes simplex y varios otros virus para el tratamiento de cánceres (29), solos o con diversos medicamentos sinérgicos (30, 31).

Por lo tanto, los agentes para disminuir la esteatosis hepática independiente de la adiposidad o de la captación de grasa en la dieta serían extremadamente atractivos y de beneficio práctico.

5 Resumen de la invención

La invención se refiere al descubrimiento que la infección de Ad36 está asociada a una incidencia reducida de patología y disfunción hepáticas y que la proteína E4orf1 de Ad36 puede usarse para modificar expresión genética y las vías bioquímicas que dan lugar a una función hepática mejorada.

10 La invención proporciona la proteína E4orf1 de adenovirus-36 o una variante funcional de la misma, o un ácido nucleico que codifica E4orf1 de adenovirus-36 o una variante funcional de la misma, o un análogo de E4orf1 de adenovirus-36 para usar en un método de tratamiento o prevención de los síntomas de enfermedad de hígado graso no alcohólico en un individuo, preferiblemente en un humano. Dicha proteína o variante funcional de la misma se administra preferiblemente al individuo en una cantidad terapéuticamente efectiva, en cuyo caso los síntomas del individuo mejoran después de la administración.

15 La invención también proporciona la proteína E4orf1 de adenovirus-36 o una variante funcional de la misma para uso en un método de reducción de grasa excesiva del hígado en un individuo, preferiblemente en un humano.

Dicha proteína o variante funcional de la misma se administran preferiblemente al individuo en una cantidad terapéuticamente efectiva, en cuyo caso se reduce la grasa en el hígado después de la administración. La secuencia de aminoácidos de la proteína E4orf1 de adenovirus-36 es preferiblemente SEQ ID NO:2 o una variante funcional de la misma.

20 Dicha proteína E4orf1 de adenovirus-36 o variante funcional de la misma se administra preferiblemente introduciendo al mamífero una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína E4orf1 de adenovirus-36 de una manera que permite la expresión de la proteína E4orf1 de adenovirus-36. La secuencia de ácido nucleico comprende preferiblemente SEQ ID NO: 1 o una variante funcional de la misma. Una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína E4orf1 de adenovirus-36 por la variante funcional de la misma se introduce preferiblemente mediante un método seleccionado del grupo que consiste en electroporación, transfección de dextrano DEAE, transfección de fosfato de calcio, fusión de liposoma catiónica, fusión de protoplasto, creación de un campo eléctrico in vivo, bombardeo de micro-proyectiles recubiertos con ADN, inyección con virus sin capacidad de replicación recombinante, recombinación homóloga, terapia de genes in vivo, terapia de genes ex vivo, vectores virales y transferencia de ADN desnudo.

La invención también proporciona proteínas de E4orf1 de Ad36 o variante funcional de la misma para usarse en un método para tratar o prevenir disfunción hepática, caracterizada por hígado graso y/o resistencia a insulina en un individuo, preferiblemente en un humano.

35 Una cantidad terapéuticamente efectiva de proteína E4orf1 de Ad36 se administra preferiblemente al individuo, en cuyo caso la acumulación de grasa del hígado se mejora después de la administración. El mejoramiento de la acumulación de grasa de hígado puede caracterizarse por una oxidación incrementada de lípido o un transporte incrementado de lípido desde el hígado. La secuencia de aminoácidos de la proteína E4orf1 de adenovirus-36 es preferiblemente SEQ ID NO:2 o la variante funcional de la misma.

40 Dicha proteína E4orf1 de adenovirus-36 o la variante funcional de la misma se administra preferiblemente introduciendo al individuo una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína E4orf1 de adenovirus-36 de una manera que permite la expresión de la proteína E4orf1 de adenovirus-36. Dicha secuencia de ácido nucleico se introduce preferiblemente mediante un método seleccionado del grupo que consiste en electroporación, transfección de dextrano DEAE, transfección de fosfato de calcio, fusión de liposoma catiónica, fusión de protoplasto, creación de un campo eléctrico in vivo, bombardeo de micro-proyectiles recubiertos con ADN, inyección con virus sin capacidad de replicación recombinante, recombinación homóloga, terapia de genes in vivo, terapia de genes ex vivo, vectores virales y transferencia de ADN desnudo. Dicha secuencia de ácido nucleico comprende preferiblemente SEQ ID NO: 1 o una variante funcional de la misma.

50 La invención también proporciona proteínas de E4orf1 de adenovirus-36 o una variante funcional de la misma para usarse en un método de reducción o prevención de NASH en un individuo, preferiblemente en un humano. Preferiblemente se administra una cantidad efectiva terapéuticamente de proteína E4orf1 de Ad36 al individuo, en cuyo caso se reduce la hiperglicemia resultante de la disfunción hepática. La secuencia de aminoácidos de la proteína E4orf1 de adenovirus-36 puede ser SEQ ID NO:2 o variantes funcionales de la misma. Dicha proteína E4orf1 de adenovirus-36 por la variante funcional de la misma se administra preferiblemente introduciendo al individuo una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína E4orf1 de adenovirus-36 de una manera que permite la expresión de la proteína E4orf1 de adenovirus-36. La secuencia de ácido nucleico del E4orf1 de

adenovirus-36 puede comprender SEQ ID NO: 1 o variantes funcionales de la misma. El individuo puede ser un humano.

5 La proteína E4orf1 de adenovirus-36 puede administrarse al individuo introduciendo al individuo una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína E4orf1 de adenovirus-36, de una manera que permite la expresión de la proteína E4orf1 de adenovirus-36. La secuencia de ácido nucleico puede introducirse usando cualquier método adecuado. Muchos métodos adecuados son convencionales en la técnica, tales como electroporación, transfección de dextrano DEAE, transfección de fosfato de calcio, fusión de liposoma catiónico, fusión de protoplasto, creación de un campo eléctrico in vivo, bombardeo de micro proyectiles recubiertos con ADN, inyección con virus sin capacidad de replicación recombinante, recombinación homóloga, terapia de genes in vivo, terapia de genes ex vivo, entrega de nanopartículas, vectores virales y transferencia de ADN desnudo.

10 La invención también se refiere al uso de la proteína E4orf1 de adenovirus-36 o una variante funcional de la misma, o un ácido nucleico que codifica E4orf1 de adenovirus-36 o una variante funcional del mismo, o un análogo de E4orf1 de adenovirus-36, para fabricar un medicamento para tratar o prevenir enfermedad de hígado graso no alcohólico en un individuo, reduciendo grasa excesiva del hígado en un individuo, aumentando sensibilidad a insulina en un individuo, tratar o prevenir disfunción hepática, caracterizada por hígado graso y resistencia a insulina, en un individuo, y/o reducir o prevenir la esteato-hepatitis no alcohólica (NASH) en un individuo, preferiblemente en un humano. La secuencia de aminoácidos de la proteína E4orf1 de adenovirus-36 puede ser SEQ ID NO:2 o variantes funcionales de la misma.

15 Dicha proteína E4orf1 de adenovirus-36 o la variante funcional de la misma se administra preferiblemente introduciendo al individuo una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína E4orf1 de adenovirus-36 de una manera que permite la expresión de la proteína E4orf1 de adenovirus-36. La secuencia de ácido nucleico de E4orf1 de adenovirus-36 puede comprender SEQ ID NO: 1 o las variantes funcionales del mismo. El individuo puede ser un humano.

20 La proteína E4orf1 de adenovirus-36 puede administrarse al individuo introduciendo al individuo una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína E4orf1 de adenovirus-36 de una manera que permite la expresión de la proteína E4orf1 de adenovirus-36. La secuencia de ácido nucleico puede introducirse usando cualquier método adecuado. Muchos métodos adecuados son convencionales en la técnica, tales como electroporación, transfección de dextrano DEAE, transfección de fosfato de calcio, fusión de liposoma catiónica, creación de un campo eléctrico in vivo, bombardeo de micro proyectiles recubiertos con ADN, inyección con virus sin capacidad de replicación recombinante, recombinación homóloga, terapia de genes in vivo, terapia de genes ex vivo, entrega de nanopartículas, vectores virales y transferencia de ADN desnudo.

25 Descripción breve de los dibujos

FIG. 1 es un gráfico que muestra pesos de almohadilla de grasa retroperitoneal e hígado en ratones alimentados con producto comercial para ratones.

35 FIG. 2 es un gráfico que muestra peso corporal de ratones alimentados con dieta alta en grasa (AG).

FIG. 3A es un gráfico que muestra la glucosa de suero en ayunas de ratones alimentados con producto comercial estándar. FIG. 3B es un gráfico que muestra la insulina de suero de ratones alimentados con producto comercial estándar. FIG. 3C es un gráfico que muestra el cambio de niveles en glucosa de suero en ayunas de ratones alimentados con producto comercial estándar. FIG. 3D es un gráfico que muestra el cambio en insulina de suero en ayunas en ratones alimentados con dieta AG. FIG. 3E es un gráfico que muestra los resultados de un ensayo de tolerancia a glucosa 12 semanas después de infección en ratones alimentados con dieta AG. FIG. 3F es un gráfico que muestra glucosa en suero alimentada libremente 20 semanas después de infección en ratones alimentados con dieta AG.

40 FIG. 4A es un gráfico que muestra la glucosa de suero en ayunas de ratones alimentados con dieta AG. FIG. 4B es un gráfico que muestra glucosa en suero alimentada libremente de ratones alimentados con dieta AG 20 semanas después de infección.

45 FIG. 5A es un Western blot que muestra abundancia de proteína en músculo esquelético de ratones alimentados con dieta AG. FIG. 5B es un Western blot que muestra abundancia de proteína en tejido adiposo de ratones alimentados con dieta AG. FIG. 5C es un Western blot que muestra abundancia de proteína en hígados de ratones alimentados con dieta AG.

50 FIG. 6A es un panel de tinción de Schiff-ácido periódico del tejido hepático de ratones CS7B1/6J. La tinción oscura muestra glucógeno y las áreas blancas indican acumulación de lípido. Los ratones de control alimentados con alimento estándar muestran mínima acumulación de lípido. Los grupos alimentados con dieta AG mostraron mayor acumulación de líquido. Sin embargo, Ad36, pero no Ad2, atenuó significativamente la esteatosis inducida por la dieta AG, tal como se indica por la menor acumulación de lípido y el mayor glucógeno (simulado alimentado con

dieta AG, infectado vs Ad36 alimentado con dieta AG infectado; $p < .02$). FIG. 6B es un gráfico que muestra el contenido de glucógeno de las secciones de hígado de los ratones alimentados con HF. FIG. 6C es un gráfico que muestra el contenido de lípido de las secciones de hígado de ratones alimentados con dieta AG.

5 FIG. 7 muestra Western blots que usan proteínas de tejido adiposo de ratones alimentados con dieta AG, muertos en estado alimentado libremente, 20 semanas después de infección (3 ratones/grupo). FIG. 7 A: GAPDH fue el control de carga. En comparación con el simulado, fosfo-AKT, Glut1, Glut 4 & adiponectina fueron mayores para el grupo Ad36 ($p < .05$), pero no para Ad2. FIG. 7B: comparado con el simulado, cada uno de los oligómeros de adiponectina ensayados en condiciones no reductoras, no desnaturizantes fueron mayores para Ad36, ($p < .03$) pero no para Ad2.

10 FIG. 8 muestra Western blots que usa proteínas de hígado de ratones alimentados con dieta AG. En comparación con el simulado, p-AMPK fue mayor y Glut2 y G6pase fueron menores para Ad36 ($p < .05$), pero no Ad2.

FIGS. 9 A y 9B son gráficos que muestran glucosa en la sangre en ayunas (A) e insulina en suero en ayunas (B) en la línea base (semana 0) y hasta 12 semanas después de infección en ratones alimentados con alimento estándar. * $p < .05$ vs el simulado.

15 FIGS. 10 A-D son gráficos que muestran el transcurso de tiempo de glucosa e insulina en suero en Ad36, Ad2 o grupos simulados después de infección en ratones con dieta AG. (A) semanas 4 y 8: glucosa en suero en ayunas ajustada a línea de base (semana 0). (B): semana 12: ensayo de tolerancia de glucosa i.p. después de 2.5 mg/g de peso corporal. (C): semana 20: glucosa alimentada libremente. (D): cambio en insulina en ayunas desde la semana 0. * $p < .05$ o menos, en comparación con el simulado de estudios respectivos.

20 FIGS. 11A-C son gráficos que muestran captación de glucosa 2 DG basal significativamente incrementada de expresión de E4orf1 en (A) preadipocitos 3T3-L1, (B) adipocitos y (C) mioblastos C2C12. FIG. 11D es un gráfico que muestra salida de glucosa significativamente reducida de expresión de E4orf1 por parte de células HepG2 en condiciones basales y también estimuladas por insulina.

Descripción detallada

25 Panorama

La invención se refiere al descubrimiento que la infección con Ad36 está asociada con la incidencia disminuida de patología y disfunción del hígado y que la proteína E4orf1 de Ad36 puede usarse para modificar la expresión de genes y las vías bioquímicas que dan lugar a una función mejorada del hígado. Con base en estos descubrimientos, la enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD) puede tratarse o incluso prevenirse administrando Ad36 o proteína E4orf1 de Ad36 aislada o recombinantes a un individuo. En la técnica se conoce bien que la NAFLD frecuentemente progresa a NASH; por lo tanto, tratando o reduciendo los procesos patológicos de NAFLD, puede reducirse o impedirse el progreso a NASH. Por consiguiente, la invención también incluye un uso de proteína E4orf1 de Ad36 en un método para reducir o impedir NASH. Mientras que muchos virus causan lesión grave al hígado (25, 26), Ad36 y E4orf1 de Ad36 protegen de manera sorprendente el hígado modulando favorablemente las múltiples vías metabólicas para tener de esa manera un efecto benéfico en la esteatosis hepática y la función del hígado.

Tal como se usa en la presente, "control glucémico" se refiere a la capacidad del cuerpo para mantener niveles de glucosa dentro de un rango normal. El control glucémico se mejora cuando se incrementa la sensibilidad a la insulina. La resistencia a la insulina tiene el efecto opuesto sobre el control glucémico.

40 Tal como se usa en la presente, "captación de glucosa" se refiere a la cantidad de glucosa que una célula tomará de sus alrededores. En términos generales, una captación superior de glucosa por las células del músculo o las células de grasa (adipocitos y preadipocitos), es benéfica ya que despeja la glucosa de la circulación y mejora la hiperglicemia (superior a la glucosa normal en la sangre).

45 Fue descubierta una conexión entre infecciones naturales de Ad36 en humanos y un mejor control glucémico y lípido hepático más bajo. Esta conexión se investigó aún más en modelos animales y los resultados confirmaron que la infección con Ad36 redujo de manera inesperada los niveles de lípido hepático y mejoró el control glucémico. La investigación adicional reveló que el efecto de Ad36 es mediado por la proteína E4orf1 de Ad36. Tal como se describe en la presente, los resultados de los estudios realizados demuestran que la proteína E4orf1 de Ad36 incrementó la oxidación de la grasa en el hígado, incrementó el transporte de grasa desde el hígado y redujo la liberación de glucosa desde el hígado. De esta manera, los inventores han descubierto que la proteína viral, E4orf1 de Ad36, es responsable del efecto protector de Ad36 en la NAFLD, y los efectos benéficos sobre la función hepática y el control glucémico. La estructura de E4orf1 de Ad36 y determinadas funciones metabólicas están descritas en la solicitud internacional No. PCT/US2006/045919, publicada como publicación internacional No. WO 2007/064836 el 7 de junio de 2007.

5 Tal como se muestra en la presente, la proteína E4orf1 de Ad36 es la mediadora del efecto protector del virus Ad36 en la esteatosis hepática. Los ratones infectados con Ad36 continúan expresando el gen E4orf1 en sus hígados incluso 5 meses después de infección. Estos hígados muestran acumulación significativamente inferior de lípido y mayor expresión de genes que promueven oxidación de lípido y exportación de lípido. Adicionalmente, E4orf1 de Ad36 aumenta la adiponectina, y la transfección de células de HepG2 (línea celular de hepatocitos) con E4orf1 de Ad36 disminuye la abundancia de Glut2 y la liberación de glucosa.

10 Sin querer adherirse a alguna teoría particular, se cree que la adiponectina es un efector clave de esteatosis hepática y es secretada por el tejido adiposo. La expresión de la proteína E4orf1 de Ad36 sola incrementa de manera robusta la secreción de adiponectina por parte de las células. Esto demuestra que Ad36 reduce la acumulación de lípido hepático a través del incremento de adiponectina mediado por E4orf1. Asimismo, E4orf1 de Ad36 disminuye la abundancia de Glut2 y la liberación de glucosa, lo cual puede contribuir a una acumulación de líquido más baja en el hígado. De esta manera, se cree que Ad36 protege de esteatosis hepática mediante efectos directos sobre hepatocitos y mediante efectos indirectos a través de adiponectina, y que la proteína E4orf1 es la mediadora de estos efectos.

15 **Métodos terapéuticos**

La invención proporciona proteína E4orf1 de Ad36 para usarse en métodos terapéuticos para tratar o prevenir enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD), reducir grasa excesiva del hígado, mejorar control glucémico y tratar o prevenir disfunción del hígado.

20 En un aspecto, la invención proporciona proteína E4orf1 de Ad36 para usarse en métodos para tratar y prevenir, por ejemplo mediante profilaxis de los síntomas, enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD). Una cantidad efectiva terapéuticamente de una composición de Ad36 se administra a un individuo (por ejemplo, un mamífero tal como un humano u otro primate) que la necesita para tratar o prevenir NAFLD.

25 En un aspecto, la invención proporciona proteína E4orf1 de Ad36 para usarse en métodos para la prevención de NASH. Una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición de Ad36 se administra a un individuo (por ejemplo, a un mamífero tal como un humano u otro primate) que la necesite para prevenir NASH, reduciendo preferiblemente la hiperglicemia que resulta de la disfunción hepática.

30 En un aspecto, la invención proporciona proteína E4orf1 de Ad36 para usarse en métodos para reducir grasa excesiva del hígado de un individuo (por ejemplo, un mamífero tal como un humano u otro primate). Una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición de Ad36 se administra a un individuo que la necesite para reducir grasa excesiva del hígado del individuo.

En un aspecto, la invención proporciona métodos para tratar o prevenir disfunción hepática caracterizada por hígado graso y/o resistencia a insulina. Una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición de Ad36 se administra a un individuo (por ejemplo, a un mamífero tal como un humano u otro primate) que la necesite para tratar o prevenir la disfunción hepática caracterizada por hígado graso y/o resistencia a insulina.

35 En modalidades preferidas de cualquiera de los métodos descritos en la presente, la composición de Ad36 que se administra es una proteína E4orf1 de Ad36 aislada o recombinante, o una variante funcional de la misma. En otras modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, la composición de Ad36 que se administra es un ácido nucleico aislado o recombinante que codifica la proteína E4orf1 de Ad36 o una variante funcional de la misma.

40 **Composiciones de Ad36**

45 La composición de Ad36 administrada de acuerdo con la invención puede tener una variedad de formas. Preferiblemente, la composición comprende E4orf1 o una variante funcional de la misma. Por ejemplo, la composición de Ad36 puede ser el virus Ad36 o una variante atenuada, o una forma desactivada de Ad36, tal como un Ad36 muerto por calor o muerto por decolorante o un Ad36 recombinante sin capacidad de replicación. La composición de Ad36 comprende preferiblemente una proteína E4orf1 aislada o recombinante o una variante funcional de la misma. La composición de Ad36 puede comprender un ácido nucleico que codifica la proteína E4orf1 o una variante funcional de la misma. La composición de Ad36 puede comprender un análogo de la proteína E4orf1, por ejemplo un análogo químico o análogo estructural.

Proteínas y péptidos

50 La composición de Ad36 puede comprender una proteína E4orf1 aislada o recombinante o una variante funcional de la misma.

Las proteínas o los polipéptidos referidos en la presente como "aislados" son proteínas o polipéptidos purificados a un estado más allá del cual existen en células de mamífero infectadas. Las proteínas de Ad36, incluyendo E4orf1 y

variantes funcionales de la misma, pueden producirse usando métodos bien conocidos tales como expresión recombinante y purificación, síntesis química (por ejemplo péptidos sintéticos), o mediante combinaciones de métodos biológicos y químicos y proteínas o polipéptidos recombinantes que se aíslan. Las proteínas pueden obtenerse en un estado aislado de al menos alrededor de 50% en peso, preferiblemente al menos alrededor de 75% en peso, y más preferible en forma esencialmente pura. Las proteínas o los polipéptidos referidos en la presente como "recombinantes" son proteínas o polipéptidos producidos por la expresión de ácidos nucleicos recombinantes.

Tal como se usa en la presente "E4orf1 de Ad36" se refiere a proteínas de E4orf1 de origen natural o endógenas a partir de adenovirus 36, a proteínas que tienen una secuencia de aminoácidos que es la misma que aquella correspondiente a E4orf1 de Ad36 de origen natural o endógena (por ejemplo, proteínas recombinantes), y a variantes funcionales de cada una de las precedentes (por ejemplo, fragmentos funcionales y/o mutantes producidos mediante mutagénesis y/o técnicas recombinantes). Por consiguiente, tal como se define en la presente, el término incluye E4orf1 de Ad36 maduro, proteínas E4orf1 de Ad36 glicosiladas o no glicosiladas, variantes polimórficas o alélicas, y otras isoformas de E4orf1 de Ad36 (por ejemplo, producidas por empalme alternativo u otros procesos celulares), y fragmentos funcionales.

"Variantes funcionales" de E4orf1 de Ad36 incluyen fragmentos funcionales, proteínas de mutantes funcionales y/o proteínas de fusión funcional. En términos generales, los fragmentos o las porciones de E4orf1 de Ad36 abarcados por la presente invención incluyen aquellos que tienen una supresión (es decir, una o más supresiones) de un aminoácido (es decir, uno o más aminoácidos) en relación con la E4orf1 de Ad36 maduro (tal como N-terminal, C-terminal o supresiones internas). También son concebibles los fragmentos o las porciones en los cuales han sido suprimidos solamente aminoácidos contiguos, o en los cuales han sido suprimidos aminoácidos no contiguos en relación con E4orf1 de Ad36. En general, los mutantes o derivados de E4orf1 de Ad36, abarcados por la presente invención incluyen variantes naturales o artificiales que difieren por la adición, supresión y/o sustitución de uno o más residuos de aminoácidos contiguos o no contiguos, o polipéptidos modificados en los que uno o más residuos se encuentran modificados, y mutantes que comprenden uno o más residuos modificados. Los mutantes preferidos son variantes naturales o artificiales de E4orf1 de Ad36 que difieren por la adición, supresión y/o sustitución de uno o más residuos de aminoácidos contiguos o no contiguos.

Un "fragmento o porción funcional" de E4orf1 de Ad36 se refiere a una proteína o a un oligopéptido aislado y/o recombinante que tiene al menos una propiedad, actividad y/o función característica de E4orf1 de Ad36, tal como atenuar la esteatosis hepática, mejorar el desecho de glucosa y/o mejorar el control glucémico.

En términos generales, la E4orf1 de Ad36 o una variante funcional de la misma tiene una secuencia de aminoácidos que es similar en al menos aproximadamente 85%, similar en al menos aproximadamente 90%, similar en al menos aproximadamente 95%, similar en al menos aproximadamente 96%, similar en al menos aproximadamente 97%, similar en al menos aproximadamente 98%, o similar en al menos aproximadamente 99% a SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4 sobre la longitud de la variante.

En algunas modalidades, SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO:3 se usan para hacer proteína purificada de E4orf1 de Ad-36, por ejemplo, usando producción de proteínas recombinantes disponible en la actualidad. La identidad de la secuencia de aminoácidos puede determinarse usando un algoritmo adecuado de alineación de secuencia de aminoácidos tal como CLUSTAL W, usando los parámetros predeterminados (Thompson J. D. et al., *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680 (1994).)

Ácidos nucleicos y vectores

La composición de Ad36 puede comprender un ácido nucleico o vector aislado o recombinante que codifica la proteína E4orf1 o una variante funcional de la misma.

Un ácido nucleico aislado y/o recombinante (incluyendo, por ejemplo, esencialmente puro) que tienen secuencias que codifican una proteína E4orf1 de Ad36 o una variante funcional de la misma puede administrarse para causar la producción de E4orf1 de Ad36 in situ. Los ácidos nucleicos referidos en la presente como "aislados" son ácidos nucleicos separados de los ácidos nucleicos del ADN genómico o ARN celular de su fuente de origen (por ejemplo, tal como existe en células o en una mezcla de ácidos nucleicos tales como una librería), y pueden haberse sometido a procesamiento adicional. Ácidos nucleicos "aislados" incluyen ácidos nucleicos obtenidos mediante métodos descritos en la presente, métodos similares u otros métodos adecuados que incluyen ácidos nucleicos esencialmente puros, ácidos nucleicos producidos mediante síntesis química, mediante combinaciones de métodos biológicos y químicos y ácidos nucleicos recombinantes que están aislados. Los ácidos nucleicos referidos en la presente como "recombinantes" son ácidos nucleicos que han sido producidos mediante metodología de ADN recombinante, incluyendo aquellos ácidos nucleicos que se generan mediante procedimientos basados en un método de recombinación artificial tales como la reacción de cadena de polimerasa (PCR) y/o clonación a un vector usando enzimas de restricción. Ácidos nucleicos "recombinantes" también son aquellos que resultan de eventos de recombinación que ocurren a través de mecanismos naturales de las células, pero se seleccionan después de la introducción a las células de ácidos nucleicos diseñados para permitir y hacer probable un evento deseado de recombinación.

Ácidos nucleicos aislados y/o recombinantes que cumplen estos criterios comprenden ácidos nucleicos que tienen secuencias idénticas a las secuencias que codifican E4orf1 de Ad36 de origen natural y porciones de la misma, o variantes funcionales de las secuencias de origen natural. Tales variantes incluyen mutantes que difieren por la adición, supresión o sustitución de uno o más residuos, ácidos nucleicos modificados en los que uno o más residuos están modificados (por ejemplo, análogos de ADN o ARN), y mutantes que comprenden uno o más residuos modificados. La secuencia puede optimizarse por codón o des-optimizarse por codón para expresión en el individuo.

En un aspecto, la E4orf1 de Ad36 o variante funcional tiene una secuencia de ácido nucleico la cual es similar en al menos aproximadamente 85%, similar en al menos aproximadamente 90%, similar en al menos aproximadamente 95%, similar en al menos aproximadamente 96%, similar en al menos aproximadamente 97%, similar en al menos aproximadamente 98%, o similar en al menos aproximadamente 99% a SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO:3 sobre la longitud de la variante. La identidad de la secuencia de ácido nucleico puede determinarse usando un algoritmo adecuado de alineamiento de secuencias de ácido nucleico tal como CLUSTAL W, usando los parámetros predeterminados (Thompson J. D. et al., *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680 (1994).)

El ácido nucleico puede estar en forma de ADN, ARN y puede ser mono- o bicatenario. En términos generales, el ácido nucleico se enlaza, de manera que puede operarse, a secuencias de control de expresión tales como un origen de replicación, un promotor y un potenciador (véase, por ejemplo, Queen, et al., *Immunol. Rev.* 89:49-68, 1986). Una cantidad de vectores adecuados para expresión de proteínas recombinantes en células deseadas son bien conocidos y convencionales en la técnica. Los vectores adecuados pueden contener una cantidad de componentes que incluyen, pero no se limitan a uno o más de los siguientes: un origen de replicación; un gen de marcador seleccionable; uno o más elementos de control de expresión, tales como un elemento de control transcripcional (por ejemplo, un promotor, un potenciador, un terminador), y/o una o más señales de traducción; y una secuencia de señal o secuencia líder para seleccionar la ruta secretoria objetivo en una célula hospedera seleccionada. Si se desea, el vector puede incluir un marcador detectable.

En determinadas modalidades, los vectores de expresión se usan en terapia de genes. La expresión requiere que las señales apropiadas sean suministradas en los vectores y que incluyan diversos elementos regulatorios tales como potenciadores/promotores, tanto de fuentes virales como de fuentes de mamíferos que accionan la expresión de los genes de interés en células hospederas. También son conocidos elementos diseñados para optimizar estabilidad y capacidad de traducción de ARN mensajero en células hospederas.

Existe una cantidad de vías en las cuales pueden introducirse vectores de expresión a las células. En determinadas modalidades de la invención, el constructo de expresión comprende un virus o un constructo diseñado derivados de un genoma viral. La capacidad de ciertos virus para entrar a las células a través de endocitosis mediada por receptor, para integrarse al genoma de célula hospedera y expresar genes virales de manera estable y eficiente los ha hecho candidatos atractivos para la transferencia de genes extraños dentro de células de mamíferos (Ridgeway, 1988; Nicolas y Rubinstein, en: *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*, Rodríguez y Denhardt, eds., Stoneham: Butterworth, pp. 494-513, 1988.; Baichwal y Sugden, Baichwal, en: *Gene Transfer*, Kucheralapati R, ed., Nueva York, Plenum Press, pp. 117-148, 1986. 1986; Temin, en: *Gene Transfer*, Kucheralapati, R. ed., Nueva York, Plenum Press, pp. 149-188, 1986). Los vectores preferidos de terapia de genes son generalmente vectores virales.

Administración de E4orf1 de Ad36

Una variedad de rutas de administración son posibles incluyendo, pero no necesariamente limitando a parenteral (por ejemplo, inyección intravenosa, intraarterial, intramuscular, subcutánea), oral (por ejemplo, dietaria), tópica, inhalación (por ejemplo, inhalación intrabronquial, intranasal u oral, gotas intranasal es), o rectal.

La proteína E4orf1 de adenovirus-36 puede administrarse introduciendo en el mamífero una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína E4orf1 de adenovirus-36 de una manera que permite la expresión de la proteína E4orf1 de adenovirus-36. En tal método, la secuencia de ácido nucleico puede introducirse por un método seleccionado del grupo consistente en electroporación, transfección de dextrano DEAE, transfección de fosfato de calcio, fusión de liposoma catiónica, fusión de protoplasto, creación de un campo eléctrico in vivo, bombardeo de micro proyectiles recubiertos de ADN, inyección con virus sin capacidad de replicación recombinante, recombinación homóloga, terapia de genes in vivo, terapia de genes ex vivo, vectores virales y transferencia de ADN desnudo.

La formulación de una composición de Ad36 que va administrarse variará según la ruta de administración seleccionada (por ejemplo, solución, emulsión, cápsulas) y el individuo que va a tratarse. Una composición apropiada que comprende el compuesto que va administrarse puede prepararse en un vehículo o soporte fisiológicamente aceptable. Para soluciones o emulsiones, los soportes adecuados incluyen, por ejemplo, soluciones acuosas u alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, incluyendo solución salina y medios con pH regulado. Los vehículos parenterales pueden incluir solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, solución láctica de Ringer o aceites fijados. Vehículos intravenosos pueden incluir diversos aditivos, preservantes o reforzadores de fluido, nutriente o electrólito (véase, en general, *Remington's Pharmaceutical Science*, 16ª edición, Mack, Ed. 1980). Para inhalación, el compuesto se solubiliza y se carga a un dosificador

adecuado para administración (por ejemplo, un atomizador, nebulizador o dosificador de aerosol presurizado), o se formula como un polvo seco respirable.

5 La composición de Ad36 puede administrarse en una dosis única o en dosis múltiples. Se administra una cantidad terapéuticamente efectiva. Una cantidad terapéuticamente efectiva es una cantidad suficiente para producir el efecto pretendido en las condiciones de administración. Por ejemplo, puede administrarse una cantidad que sea suficiente para incrementar la oxidación de la grasa, incrementar el transporte de grasa fuera del hígado, para disminuir la abundancia de Glut2 en el hígado, para reducir la G6Pasa en el hígado, para mejorar la adiponectina, y/o Glut4, para mejorar el control glucémico y/o para mejorar la función del hígado. La dosificación apropiada puede determinarse por un profesional clínico de habilidad ordinaria usando métodos conocidos en la técnica, el cual toma en consideración la edad del individuo, su sensibilidad a medicamentos, medicamentos de tolerancia, severidad de la enfermedad y bienestar en general, así como otros factores. Las dosis adecuadas pueden estar entre aproximadamente 0.1 y aproximadamente 10.0 mg/kg de peso corporal por tratamiento.

15 Los individuos a los que se administran composiciones de Ad36 pueden monitorearse por medio de ensayos no invasivos, por ejemplo usando ultrasonido, para determinar si el tratamiento fue efectivo. En algunos aspectos, el individuo será monitoreado usando ultrasonido. En algunos aspectos, el individuo se someterá a ensayos de función hepática para medir enzimas hepáticas.

Secuencias de E4orf1 de Ad36

Secuencia de ADN de E4 orf 1 de Ad-36 (SEQ ID NO. 1)

ATGGCTGAATCTCTGTATGCTTTCATAGATAGCCCTGGAGG
 GATCGCTCCCGTCCAGGAAGGGGCTAGCAATAGATATATCTTCTTTTGCCC
 CGAATCTTTCCACATTCCTCCGCATGGGGTGATATTGCTTCACCTCAGAGT
 GAGCGTGCTGGTTCCTACTGGATATCAGGGCAGATTTATGGCCTTGAATG
 ACTACCATGCCAGGGGCATACTAACCAGTCCGATGTGATATTTGCCGGG
 AGAAGACATGATCTCTCTGTGCTGCTCTTTAACCACACGGACCGATTTTGG
 TATGTCCGCGAGGGCCACCCAGTGGGAACCCTGCTGCTGGAGAGAGT
 GATTTTTCCTTCAGTGAGAATAGCCACCCTGGTTTAG

20 Traducción de proteína de E4 orf 1 de Ad-36 (SEQ ID NO.2)

MAESLYAFIDSPGGIAPVQEGASNRYIFFCPESFHIPPHGV
 ILLHLRVSVLVPTGYQGRFMALNDYHARGILTQSDVIFAGRHRHDLSVLLF
 NHTDRFLYVREGHPVGTLLLERVIFPSVRIATLV

Secuencia de ADN de ΔPDZ de E4 orf 1 de AD-36 (SEQ ID NO.3)

ATGGCTGAATCTCTGTATGCTTTCATAGATAGCCCTGGAGG
 GATCGCTCCCGTCCAGGAAGGGGCTAGCAATAGATATATCTTCTTTTGCCC
 CGAATCTTTCCACATTCCTCCGCATGGGGTGATATTGCTTCACCTCAGAGT
 GAGCGTGCTGGTTCCTACTGGATATCAGGGCAGATTTATGGCCTTGAATG
 ACTACCATGCCAGGGGCATACTAACCAGTCCGATGTGATATTTGCCGGG
 AGAAGACATGATCTCTCTGTGCTGCTCTTTAACCACACGGACCGATTTTGG
 TATGTCCGCGAGGGCCACCCAGTGGGAACCCTGCTGCTGGAGAGAGTGAT
 TTTTCTTCAGTGAGAATATAG

Traducción de proteína de ΔPDZ de E4 orf 1 de AD-36 (SEQ ID NO.4)

MAESLYAFIDSPGGIAPVQEGASNRYIFFCPESFHIPPHGV

ILLHLRVSVLVPTGYQGRFMALNDYHARGILTQSDVIFAGRRHDLVLLF

NHTDRFLYVREGHPVGTLLLERVIFPSVRI

Ejemplificación

5 Los resultados de los estudios divulgados en la presente revelaron que existe una conexión entre la infección con Ad36 en humanos y los niveles de lípido hepático más bajos y un mejor control glucémico. Los resultados también demuestran que la proteína E4orf1 de Ad36 es la mediadora del efecto protector del virus Ad36 y que el efecto es probablemente mediado por la modificación de la expresión de varios genes incluyendo adiponectina y abundancia de Glut2. De esta manera, estos estudios divulgados en la presente muestran que Ad36, E4orf1 de Ad36, y las variantes funcionales de los mismos pueden usarse para tratar o prevenir NAFLD, reducir grasa excesiva del hígado de un mamífero, mejorar control glucémico y tratar o prevenir disfunción hepática.

10 Técnicas y ensayos:

Preparación de virus. Se obtuvo Ad-36 de la placa de colección American Type Culture collection (ATCC Cat# VR913) purificada y propagada en células A549 (línea celular de cáncer de pulmón de humano) tal como se describe y se usa previamente (45,44). También se obtuvo Ad-2 de la ATCC (Cat #VR846) y se propagó en células A549. Se determinaron títulos virales mediante ensayo de placa (45) inoculaciones expresadas como unidades de formación de placa (PFU por plaque forming units).

15 b. Ensayos bioquímicos:

Glucosa: 2 µl de suero de cada ratón se midieron en un formato de placa de 96 pozos usando el método de oxidasa de glucosa de Raichem (R80038). Se leyó la absorbancia a 500 nm. Insulina: se usó el kit ELISA de insulina de ratón ultrasensible (Crystal Chem, # 90090) para determinar insulina. Se determinaron los triglicéridos usando tiras de ensayo de panel de lípido Cardiochek.

qRT-PCR: mRNA fue extraído de tejido adiposo de ratones alimentados con dieta alta en grasa usando el kit RNeasy Mini según las instrucciones del fabricante (Qiagen, # 74101). Se eliminó ADN residual usando desoxirribonucleasa I de grado amplificación (Invitrogen, # 18068-015). 1 µg del ARN total se transcribió en reversa a cADN usando el kit de síntesis iscript™ cDNA (BioRad, # 170-8890) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se usó el sistema central II de PCR (Promega, # M7665) para la amplificación de cADN. Se realizó RT-PCR cuantitativo para examinar los niveles de expresión relativa de los genes TNFα (factor de necrosis tumoral alfa, Applied Biosystems, # Mm00443259_g1), Resistin (Applied Biosystems, # Mm00445641_m1), MCP-1 (proteína quimioatrayente de macrófago; Applied Biosystems, # Mm00441243_g1), CD68 (Applied Biosystems, # Mm03047343_m1), TLR4 (receptor del tipo Toll 4; Applied Biosystems, # Mm00445274_m1), MCSF (vector estimulante de colonias de macrófagos; Applied Biosystems # Mm00432688_m1), e IL6 (interleuquina 6; Applied Biosystems, # Mm00446191_m1) en comparación con GAPDH (gliceroaldehídos 3 fosfato deshidrogenasa; Applied Biosystems, # Mm99999915_g1). Se compararon las medias mediante una prueba T. La significatividad se estableció en p<0.05.

c. Confirmación de infección:

35 Título de anticuerpo:

La presencia de anticuerpos neutralizantes en suero fue determinada mediante el método de 'suero constante con reducción de virus', el cual es un ensayo estándar de oro, sensible y específico para determinar anticuerpos neutralizantes tal como se describe en detalle (92). Brevemente, los sueros de la prueba desactivados por calor se diluyeron en serie (dos veces) de 1:2 a 1:512 en placas de 96 pozos. En total se adicionaron a cada uno de los pozos un total de 100 TCID-50 (dosis de infectividad de un tipo de tejido 50) del estándar de trabajo de adenovirus respectivo, seguido por la adición de células A549 después de 1 hora de incubación a 37 °C. Cada suero de prueba fue corrido en duplicado. El control de suero (suero y células, pero sin virus), el control de células (células solamente, sin virus, sin suero), y el control de virus (células y virus, sin suero) se incluyeron con cada ensayo. Las placas se incubaron a 37 °C durante 13 días y se notó la presencia de CPE (efecto citopático). Las muestras de suero sin CPI en diluciones de 1:8 o superiores fueron consideradas positivas para la presencia de anticuerpos neutralizantes al virus respectivo y evidencia de infección previa con ese virus. Las muestras con títulos inferiores a 1:8 fueron consideradas negativas para la presencia de anticuerpos virales. Se llevó a cabo una titulación por retroceso de virus con cada ensayo como chequeo de calidad.

Monitoreo de AND y ARN virales:

ES 2 550 962 T3

Aislamiento de ADN: se aisló ADN usando un minikit de ADN QIAMP (# 51306). Se diseñaron cebadores para gen E4 de Ad36, Ad2 y también β -actina de ratón. Se amplificó ADN mediante PCR. Las secuencias de cebador fueron como sigue:

Cebador hacia adelante de Ad36: 5'-GGCATACTAACCCAGTCCGATG-3',

5 Cebador reverso de Ad36: 5'-TCACTCTCAGCAGCAGCAGG-3';

Cebador hacia adelante de Ad2: 5' -CCTAGGCAGGAGGGTTTTTC-3',

Cebador reverso de Ad2: 5'-ATAGCCCGGGGAATACATA-3'

Cebador hacia adelante de β -actina de ratón: 5' -GATCTTCATGGTGCTAGGAG-3',

Cebador reverso de β -actina de ratón: 5'-ACGTTGACATCCGTAAAGAC-3'.

10 Control de PCR negativo: agua. Control de PCR positivo: ADN de células A549 de Ad36 o Ad2. Se desnaturizó ADN por 2 minutos a 95°C y se sometió a 35 ciclos de PCR (94°C por 1 minuto, 55°C por 1 min, 72°C por 2 minutos seguido de incubación a 72°C por 5 minutos. Se extrajo ARN usando el mini kit RNeasy según las instrucciones del fabricante (Qiagen, # 74101). Se eliminó ADN residual usando desoxirribonucleasa de grado de amplificación I (Invitrogen, # 18068-015). 1 μ g de ARN total se transcribió en modo reverso a ADNc usando el kit de síntesis de
15 ADNc iscript™ (BioRad, #170-8890) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El sistema básico de PCR II (Promega, # M7665) fue usado para la amplificación de ADNc.

d. Ensayo de tolerancia de glucosa:

Después de un ayuno por 16 horas, ratones despiertos se inyectaron con D-Glucosa (2.5 mg/g de peso corporal) por vía intraperitoneal. Se recogió sangre de la vena de la cola antes de inyectar la glucosa (tiempo 0) y a 10, 20, 30, 60,
20 120 y 150 minutos después de la inyección. Se determinó glucosa en la sangre usando un glucómetro (Contour, Bayer).

e. Análisis de Western blot:

Inmunoprecipitación: para inmunoprecipitación de IR, IRS1 y IRS2, se homogeneizaron muestras tisulares en un regulador de pH que contenía HEPES de 50mM (pH 7.4), ortovanadato de sodio de 2mM, fluoruro de sodio de 10
25 mM, EDTA de 2 mM, NP-40 al 1%, deoxicolato de sodio al 0.25% e inhibidores de proteasa. Los homogeneizados (250 μ g) se inmunoprecipitaron luego con 3 μ g de anticuerpo primario. Las muestras se sometieron a SDS-PAGE usando geles de gradiente de 4-20% y se transfirieron a una membrana de PVDF. Las membranas se sometieron a inmunoblotting con anticuerpos anti-fosfo. Se usaron anticuerpos para tyr-1322-IR- β fosforilado (Millipore, # 04-300) y receptor total de IR- β (Millipore, # 05-1104), IRS1 total (Santacruz, # Sc-559) y pIRS1-(tyr-989) (Santacruz, # Sc-17200), pIRS1-(ser307) (Cell signaling, # 2381), IRS2 de (Millipore, # 06-506) y p-IRS2 (tyr-612) de (Santacruz, # Sc-17195-R).

Western Blot: se cuantificaron concentraciones de proteína por medio de ensayo de ácido bicinonínico y se cargaron al 4-20% o gel de poliacrilamida en cantidades iguales. Luego se transfirieron las proteínas a una
35 membrana de PVDF. Las membranas se bloquearon en PBS Tween-20 que contenía BSA al 3% y se incubaron con anticuerpos policlonales o monoclonales que reconocían anticuerpos de AKT total (Cell signaling, # 4691), p-AKT(ser-473) (Cell signaling, # 9271), Ras (Cell signaling, # 3965), Glut1 (Abcam, # 35826), Glut4 (Abcam, # 14683), Glut2 (Santacruz, # 9117), Glucosa 6-fosfatasa (Santacruz, # 7291), AMPK α total (Cell signaling, # 2603), p-AMPK α (Thr-172) (Cell signaling, # 2535) y leptina (Abcam, # 2095) respectivamente. Seguido de anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de caballo rábano, se detectaron señales mediante quimioluminiscencia
40 mejorada. Las bandas específicas fueron cuantificadas con densitometría de barrido usando software analizador AlphaEaseFC y se evaluó una carga igual mediante normalización a abundancia de GAPDH (Ambion, # 4300).

Análisis de diferentes formas oligoméricas de adiponectina: 30 μ g de la proteína aislada del tejido adiposo fueron tratados con regulador de pH 5X no reductor sin DTT, β -mercaptoetanol y se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente. Las muestras fueron corridas en gel 4-20% Tris-Glicina SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de
45 PVDF. Se realizó Western blotting usando anticuerpo de dominio antiglobular de adiponectina (Millipore, # MAB3608, Temmeccula, CA).

f. Histoquímica:

Se realizó tinción de glucógeno en muestras de hígado congeladas de modo instantáneo de 3 ratones cada una de Ad36, Ad2, y se infectaron de modo simulado ratones alimentados con dieta alta en grasa y se infectó de modo
50 simulado un ratón alimentado con producto estándar en calidad de control tal como se reporta en (41). Las muestras tisulares se incrustaron en medio de montaje OCT y se cortaron a un grosor de 8 μ m. Se tintó glucógeno usando

tinción de ácido periódico – Schiff (PAS). Se fijaron muestras de hígado para mejorar la preservación de glucógeno y para ayudar a prevenir el efecto distorsionante de la corriente en el fijador de Carnoy (6 partes de etanol, 3 partes de cloroformo, y 1 parte de ácido acético glacial) por 10 minutos a 4 °C. Después de fijar, se lavaron las secciones en agua destilada con varios enjuagues y luego se incubaron en una solución al 1% de ácido periódico por 5 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar con agua destilada se adicionó el reactivo de Schiff y se incubó por 11 minutos. Todas las láminas se guardaron en agua corriente, fría, de acueducto, durante 10 minutos. Las láminas se secaron al aire y se aplicó un cubreobjetos usando Permount. La tinción de glucógeno da un color magenta a la sección y una tinción más oscura indica más glucógeno.

El líquido deja la muestra durante la fijación y de esa manera, el área en blanco, de color blanco, sobre la lámina, indica gotas de lípido (96). Se hicieron imágenes con un Zeiss Axioskop 40 FL. Se analizaron tres especímenes por muestra y tres imágenes por espécimen usando Image J para cuantificación de glucógeno y lípido. Las imágenes se convirtieron a 8 bit y el umbral se determinó donde solamente era visible la tinción específica de glucógeno y se calculó la cantidad de glucógeno como pixel2 en este umbral. Este número fue sustraído del área total para obtener el área del espacio en blanco para cuantificación de lípido tal como se reporta en (96).

Ejemplo 1

Ad36 y humanos

Se monitorearon muestras de cuatro grupos humanos para anticuerpos de Ad36 como un indicador de infección pasada. Los grupos humanos fueron: A) estudio de familia de HERITAGE (49) (n=671, hombres y mujeres blancos y negros) B) estudio del PBRC (Pennington Biomedical Research Center) (206 hombres y mujeres blancos y negros), C) estudio del MET (50, 51) (n=45 niños y niñas blancos y negros pre púberes), D) estudio de VIVA LA FAMILIA (52) (585 niños y niñas hispanos). La prevalencia de anticuerpos de Ad36 fue de 13%, 18%, 22% y 7% en los estudios de HERITAGE, PBRC, MET y Viva La Familia, respectivamente. Las diversas medidas de un mejor control glucémico (incluyendo sensibilidad a insulina o índice de desecho) estuvieron asociadas de modo significativo con infección de Ad36 en estos grupos humanos, de manera independiente de la edad, sexo, raza y adiposidad (por ejemplo, las tablas 1 y 2 muestran los grupos humanos de PBRC y MET). De manera importante, la asociación de Ad36 con un mejor control glucémico fue extraordinariamente consistente a través de estos grupos humanos de diversas edades y razas de más de 1500 individuos. Estos datos sugirieron que la infección de Ad36 puede mejorar el control glucémico en humanos.

Tabla 1: estudio de PBRC (n=206; negros/blancos/otros 74/118/14) media (95% CI), ajustada para edad, sexo, raza y masa de grasa corporal. *p<0.05 o mejor. **Normalizada a densidad del bazo. Valor superior de HU equivale a contenido de lípido inferior.

	Ad36-	Ad36+
N=45	N=35	N=10
Glucosa en ayuna (mg/dL)	74.5 (71.6-77.4)	68.7* (62.9-74.6)
Insulina en ayunas (mU/ml)	3.1 (2.4-4.1)	1.8* (1.1-3.0)
HOMA IR	0.51 (0.39-0.69)	0.28* (0.16-0.48)
Lípido intra-hepático (% de pico de agua)	0.005 (0.002-0.006)	0.003* (0.004-0.008)

Tabla 2: estudio de MET, niños y niñas pre-púberes (n=45; negros/blancos/otros; 10/32/3).

Media^a (95%CI) ajustada para sexo y masa de grasa corporal. ^a Media aritmética para glucosa; media geométrica para insulina HOMA-IR y lípido intra-hepático.

Ejemplo 2:

Ad36 horas sensibilidad a insulina en ratones alimentados con producto estándar

Ratones hembras C57BL/6J de edad, peso y grasa corporal emparejados, se infectaron de modo simulado o se infectaron con Ad36 o Ad2 y se mantuvieron en una dieta con producto estándar. Ratones hembras C57B6/6J de cuatro semanas de edad fueron adquiridos de The Jackson Laboratories (Bar Harbour, Maine, USA). Después de 1 semana de aclimatación, se determinó la grasa corporal total mediante el analizador Bruker Minispec mq 10 RMN (resonancia magnética nuclear). Los ratones se dividieron en tres grupos emparejados por el peso corporal y la grasa corporal y se inocularon intra-nasalmente, oralmente intra-peritonealmente con 107PFU de Ad36 (N=3) o Ad2 (un adenovirus humano común usado como control; N=4) o infectados de modo simulado con medios de cultivo tisular (n=6). Los ratones estaban en un ciclo de luz y oscuridad de 12 horas a 25 °C y hospedados en jaulas micro-aislantes en una contención de nivel de bioseguridad 2 en una habitación y se les ofrecía agua a su gusto (ad libitum) y alimento estándar para roedores (Purina LabDiet 5001).

Los tres grupos de ratones no mostraron diferencia en el peso corporal total durante un experimento de 12 semanas.

- 5 Anticuerpos neutralizantes a adenovirus, y/o análisis de PCR para ADN y/o ARNm viral en diversos tejidos de ratón confirmaron la infección simulada o la infección por el virus esperado (tabla 3). A pesar de los niveles separables de glucosa e insulina en suero en ayunas entre los tres grupos de ratones en la línea base antes de la infección, estos niveles disminuyeron progresivamente solamente en los ratones infectados con Ad36 durante el transcurso del experimento (Figura 1A y B). Además, en la post-infección de 12 semanas (pi), las masas de la almohadilla de grasa retroperitoneal y el hígado de los ratones infectados con Ad36 fueron dos veces más altas ($p < 0.03$) o 10% más bajas ($p < 0.04$), respectivamente, que los ratones infectados de modo simulado (Tabla 4, Figura 1). De esta manera, en los ratones alimentados con alimento estándar, la infección con Ad36, pero no la infección con Ad2, mejoró el control glucémico sistémico reduciendo niveles de glucosa e insulina en ayunas.
- 10

Tabla 3: Porcentaje de los ratones que muestran anticuerpos virales, ADN y ARN virales.

Grupo	Anticuerpo Ad36 / Ad32	ADN viral / ARN viral			
		Hígado	Tejido adiposo	Pulmón	Riñón
Experimento 2: ratones alimentados con producto estándar					
Simulado		0/0		0/0	
Ad36		100 / 100		100 / 100	
Ad32		100 / 100		100 / 100	
Experimento 3: ratones con dieta alta en grasa					
Simulado	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / NA	0 / NA
Ad36	100 / 0	60 / 60	70 / 40	50 / NA	10 / NA
Ad32	0 / 40	0 / 0	0 / 0	100 / NA	50 / NA

NA: ARN viral no determinado en estas muestras

Tabla 4: Línea base y características finales de ratones alimentados con producto estándar. Media \pm SE.

	Simulado	Ad36	Ad2	p
N	6	3	4	
Peso corporal (g) - semana 0	16.3 \pm 1.1	16.9 \pm 0.21	16.2 \pm 0.44	NS
Grasa corporal (g) semana 0	2.1 \pm 0.2	2.3 \pm 0.2	2.0 \pm 0.1	
Peso corporal (g) semana 12	22.3 \pm 0.8	23.8 \pm 1.7	22.5 \pm 1.5	NS
Grasa retroperitoneal (g) semana 12	0.18 \pm 0.06	0.37 \pm 0.15*	0.25 \pm 0.13	* $p < .05$ vs simulado
Hígado (g)	1.00 \pm 0.09	0.9 \pm 0.1*	0.99 \pm 0.21	* $p < .05$ vs simulado

- 15 Los pesos corporales se midieron una vez a la semana y las muestras de sangre se obtuvieron del seno retrobulbar intraorbital de ratones anestesiados en ayunas durante 4 horas. Los ratones fueron muertos 12 semanas después de la infección. Se recogió sangre del tronco y se separó el suero. Se separaron cuidadosamente el hígado y los depósitos de grasa retroperitoneal, se pesaron y se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta usarse. El suero se usó para determinar glucosa e insulina.
- 20 Las diferencias en pesos corporales, hígado, pesos de almohadilla de grasa y niveles de glucosa e insulina se analizaron mediante la prueba 't' de Student. Los niveles de probabilidad se establecieron en $p < 0.05$.

Ejemplo 3:

Ad36 mejora hiperglicemia en ratones alimentados con dieta alta en grasa

- 25 Este experimento investigó si Ad36 tiene efectos similares en ratones hechos diabéticos con una dieta alta en grasa (AG, 60 kcal%) que causa hiperglicemia inducida por dieta.

- 30 Ratones machos C57BL/6J de edad, peso y grasa corporal emparejados (14 semanas de edad), alimentados con una dieta AG durante las 8 semanas previas, desarrollaron un estado diabético según se evidenció por los niveles altos de glucosa en suero en ayunas (>200 mg/dL). En este punto, los ratones se infectaron de modo simulado o se infectaron con Ad36, o Ad2. A las 20 semanas después de la infección, todos los tres grupos presentaron captación acumulativa de alimento, así como también peso corporal total y masas de almohadilla de grasa similares (Tabla 5, Figura 2). Se adquirieron ratones e57B6/6J machos de 14 semanas de edad del The Jackson Laboratory (Bar Harbour, Maine, USA), los cuales habían sido alimentados con una dieta alta en grasa (60% kcal) (Research Diets Inc. D12492i) a partir de las seis semanas de edad. Después de 1 semana de la climatización, se determinó la grasa

corporal de línea de base mediante RMN y los ratones se dividieron en tres grupos (n=10 por grupo) emparejados en grasa corporal y peso corporal. Los grupos fueron infectados con Ad36 (0.6x10⁶PFU), Ad2 (3x10⁶ PFU) o infectados de modo simulado por vía intranasal, intra-peritoneal y oral, y continuaron con la dieta alta en grasa (60% kcal) por 20 semanas más. Los ratones estuvieron en un ciclo de luz-obscuridad de 12 horas a 25 °C y hospedados individualmente en jaulas micro-aislantes en contención de nivel de bioseguridad 2 en una habitación. La desaparición del alimento y los pesos corporales se midieron una vez por semana durante 16 semanas y se obtuvieron muestras de sangre del seno intra orbital retrobular, en ratones anestesiados. Se recogieron muestras en ayunas después de retirar alimento por 4 horas. Los ratones fueron muertos 20 semanas después de la inoculación en un estado con alimento libre. Se recogió sangre del tronco y el suero fue separado. Se separaron cuidadosamente el hígado, los depósitos de grasa del epidídimo y retro-peritoneo, se pesaron y se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

Después de un período post-infección de 20 semanas se evaluó el control glucémico de diferentes maneras determinando glucosa e insulina en ayunas, la prueba de tolerancia a glucosa y también determinando niveles de glucosa en estado con alimento libres. Tal como se esperaba, debido a la resistencia a insulina inducida por dieta AG, los ratones infectados de modo simulado presentaron un incremento en los niveles de glucosa e insulina de suero en ayunas aunque estos incrementos estuvieron atenuados de modo significativo en los ratones infectados con Ad36 A las 8 semanas después de infección o 4 semanas después de infección, respectivamente (figuras 3 C & D y 4A). Los ratones infectados con Ad36 también presentaron un despeje de glucosa en la sangre significativamente más rápido en respuesta a un ensayo de tolerancia de glucosa intra-peritoneal (ipGTT) a 12 semanas después de la infección (figura 3E) y niveles más bajos de glucosa en suero con alimento libre a 20 semanas después de infección (figura 3F y 4B). De hecho, a las 20 semanas post-infección, los niveles de glucosa en suero con alimento libre de todos los ratones infectados con Ad36 estaban en el percentil 50 más bajo de aquellos medidos en ratones infectados de modo simulado (figura 4B) (prueba chi p= 0.01). A pesar de la dosis 5 veces más alta usada para Ad2 versus Ad36 en este experimento, los ratones infectados con Ad2 no pudieron mostrar disglucemia significativamente mejorada en comparación con los ratones de control infectados de modo simulado. Por lo tanto, la infección con Ad36 mejora igualmente de manera específica las respuestas leucémicas en ratones diabéticos en condiciones de ayuno y de alimentación.

Tabla 5: Línea de base y características finales de ratones alimentados con dieta AG. Media ± SE.

	Simulado	Ad36	Ad2	p
N	10	10	10	
Peso corporal (g) semana 0	36.2 ± 0.9	36.1 ± 1.1	37.3 ± 1.0	NS
Peso corporal (g) semana 20	51.5 ± 0.8	48.3 ± 2.1	50.7 ± 1.2	NS
Captación de alimento acumulativa (g) (medida por 16 semanas post-infección)	186 ± 9.2	186 ± 13.3	184 ± 13.7	
Grasa corporal total (g) semana 0	10.5 ± 0.8	10.7 ± 0.7	11.5 ± 1.0	NS
Grasa corporal (g) semana 20				
Epididimal	1.4 ± 0.05	1.4 ± 0.1	1.5 ± 0.2	NS
Retroperitoneal	0.5 ± 0.02	0.5 ± 0.05	0.5 ± 0.03	NS
Hígado (g)	2.7 ± 0.1	2.3 ± 0.1*	2.4 ± 0.2	* p<.05 vs simulado
Triglicéridos en suero (mg/dL)				
Semana 0	71.6 ± 1.7	71.2 ± 0.9	71.5 ± 1.2	*p<.05 vs semana 0 de Ad36
Semana 8	70.4 ± 2.1	68.3 ± 1.2*	69.3 ± 1.0	

Los análisis de Western blot (WB) realizados con ratones del ejemplo 2 revelaron que de acuerdo con datos in vitro (76, 12), Ad36 aumentó la vía \Ras-PI3K tal como se indica por la mayor abundancia de Ras y fosfo-Akt, en músculo esquelético, tejido adiposo e hígado en comparación con los ratones infectados de modo simulado a las 20 semanas post infección (pi) (Figura 5). Para ratones infectados con Ad36, la mayor abundancia de proteína de Glut4 y Glut1 en músculo esquelético y tejido adiposo sugirió un mecanismo por el cual Ad36 incrementa captación de glucosa en estos tejidos, mientras que la menor abundancia de Glut2 y Glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa) en el hígado sugirió que Ad36 reduce la liberación de glucosa hepática (Figura 5C), lo cual a su vez puede contribuir a mejor control glucémico. Tal como se espera, las secciones de hígado de los ratones alimentados con dieta AG presentaron menos glucógeno y más lípido que aquellas de los ratones alimentados con alimento estándar (Figura 6A). Entre los ratones alimentados con dieta AG, sin embargo, los hígados de los ratones infectados con Ad36 presentaron protección superior ante los efectos patológicos de la dieta AG, tal como se evidencia por el contenido incrementado de glucógeno y más bajo de lípido en comparación con los ratones infectados de modo simulado (Figura 6 A-C) (p<0.02). El efecto protector mediado por Ad36 sobre la patología hepática inducida por la dieta AG es consistente con nuestros datos humanos que muestran acumulación más baja de lípido hepático tanto en adultos como en los jóvenes pre-púberes infectados con Ad36. De esta manera, los hallazgos presentados aquí soportan un modelo por

el cual Ad36 incrementa la captación de glucosa por el músculo esquelético y tejido adiposo y reduce la liberación de glucosa por el hígado, lo cual mejora de manera significativa el control glucémico sistémico en animales.

5 Se analizaron las diferencias en la captación de alimento, los pesos corporales, hígado, pesos de almohadilla de grasa y en los niveles de glucosa e insulina mediante la prueba 't' de Student. Los niveles de probabilidad se establecieron en $p < 0.05$.

Ejemplo 4:

Ad36 mejora marcadores del perfil metabólico de tejido adiposo

10 Se corrieron Western blots tal como se describe previamente usando proteínas de tejido adiposo de ratones alimentados con dieta AG, muertos en estado de alimentación libre 20 semanas post-infección (3 ratones/grupo). Se usó GAPDH como control de carga. Ad36 parece aumentar la vía de PI3K y la captación de glucosa corriente abajo tal como se indica por una fosforilación mayor de AKT, y mayor abundancia de Glut4 y Glut1. En respuesta a la infección, el tejido adiposo en el grupo de Ad2, pero no en el de Ad36, tuvo mayor infiltración de macrófago ($p < .05$), en comparación con el grupo simulado. De manera importante, el grupo de Ad36 hubo una abundancia significativamente mayor de adiponectina (Figura 4A), un sensibilizador de insulina clave y promotor de captación de glucosa (53) y protector frente a esteatosis hepática (54) (55). La adiponectina existe en formas de peso molecular (PM) superior, medio e inferior, aunque la forma de TM superior está ligada de la manera más fuerte a la sensibilidad de insulina (56,57). Ad36 incrementó de modo significativo en los niveles de todas las formas de adiponectina en el tejido adiposo de ratones alimentados con dieta AG (figura 7B). El aumento de adiponectina por parte de Ad36 se observó de manera consistente, incluyendo su ARNm y abundancia de proteína significativamente mayores en explantes de tejido adiposo humano infectados con Ad36 (12). Estos cambios indican de modo colectivo que Ad36 mejora la calidad metabólica del tejido adiposo. Considerando los efectos hepáticos fuertes de adiponectina (54, 55), se cree que la adiponectina es un mediador clave del efecto anti-esteatosis de Ad36.

Ejemplo 5:

Ad36 atenúa la esteatosis y mejora perfil metabólico en el hígado

25 Las secciones de hígado de los ratones alimentados con dieta AG presentaron menos glucógeno y más lípido que las de los ratones alimentados con producto estándar (Figura 6A). Entre los ratones alimentados con dieta AG, sin embargo, los hígados de los ratones infectados con Ad36 presentaron protección superior frente a los efectos adversos de la dieta AG, tal como se evidencia por el contenido de glucógeno incrementado y bajo de lípido en comparación con el grupo simulado (Figura 6A) ($p < .02$). La abundancia inferior de Glut2 y Glucosa-6-fosfatasa (G6Pase) en los hígados del grupo Ad36 (Figura 8) sugirió liberación de glucosa hepática reducida, lo cual a su vez puede contribuir a un mejor control glucémico. Los hígados del grupo Ad36, pero no del grupo Ad2, presentaron mayor fosforilación de AMPK, una diana conocida de adiponectina para proteger el hígado frente a esteatosis (54).

35 ARNm de hígado: se ensayaron expresiones de genes seleccionados de los hígados de ratones con dieta estándar (Figura 9) o ratones alimentados con dieta AG (Figura 10). Aunque estas moléculas también desempeñan roles solapados en múltiples vías, consideramos a FAS (sintasa de ácido graso), SREBP1c (elemento de respuesta de esteroide que enlaza proteína 1c) y FOXO1 (Forkhead Box 01 o caja de cabeza de horquilla) como moduladores de la lipogénesis (58), CPTI (carnitina palmitilo acilo transferasa), LXR (receptor de hígado X) y PPAR α para indicar oxidación de lípido (59-61) y MTP (proteína de transferencia de triglicérido microsómico) y ApoB (apolipoproteína B) como indicación de exportación de lípido (62-66). Puesto que la esteatosis hepática acoplada con inflamación puede dar señal de progreso a NASH, se determinaron marcadores de inflamación. Las expresiones de gen hepático se determinaron 12-20 semanas después de inoculación (tabla 3). Mientras que un período tan largo y una dieta AG pueden enmascarar algunos cambios, las expresiones de gen de los ratones alimentados con producto estándar y alimentados con dieta AG sugieren de modo colectivo que Ad36 reduce la lipogénesis, aumenta la oxidación y exportación de lípido y reduce la inflamación en el hígado (Tabla 6).

	Lipogenesis			Oxidación de lípido					Exportación de lípido		Inflamación			
Dieta	FAS	SREBPIC	FOXO1	AdipoR1	AdipoR2	CPT1	LXR	PPAR α	ApoB	MTP	IL6	IL10	INF γ	TNF α
Estándar	NS	NS	↑*	↑*	↑*	↑*	NS	↑*	↑*	↑*	↓ (.06)	NS	NS	NS
AG	NS	↑ (.08)	↑ (.07)	NS	NS	NS	NS	NS	↑*	NS	↓*	NS	↓*	↓*

Tabla 6: datos qRT-PCR de expresión de genes en hígados de ratones alimentados con dieta estándar o dieta AG. Las flechas indican la dirección de los cambios inducidos por Ad36 en comparación con el grupo infectados de manera simulada *p<.05 o mejor. Para indicar una tendencia, el valor p también se señala si se encuentra entre .05 y 0.1. NS: no hay diferencia significativa.

5

Ejemplo 6:

E4orf1 de Ad36 atenúa la esteatosis hepática sin pérdida de peso

En experimentos separados, las células de HepG2, o hepatocitos primarios de ratón fueron transfectados con E4orf1 o el vector vacío de ADNpc. La oxidación de palmitato y la secreción de apoB por parte de las células de HepG2 y la salida de glucosa basal y estimulada por glucagón por parte de los hepatocitos primarios fueron determinadas 48 horas después de transfección.

10

En comparación con las células transfectadas con el vector nulo, E4orf1 incrementó la oxidación de grasa dos veces (p<0.0001), y la secreción de apoB 1.5 veces (p<0.003) y redujo la salida de glucosa basal y estimulada por glucagón en 45% (p=0.0008) y 22% (p<0.02), respectivamente.

15

Esta transfección in vitro de hepatocitos muestra que E4orf1 media los efectos de Ad36 en el metabolismo hepático. Los datos muestran que en hepatocitos E4orf1 de Ad36 incrementa la oxidación de grasa y el transporte de grasa afuera del hígado y reduce la liberación de glucosa.

Ejemplo 7:

E4orf1 induce PPAR γ

20

PPAR γ es el regulador maestro de adipogénesis, el proceso por el cual el cuerpo hace células grasas. Ad36 aumenta PPAR γ , induce adipogénesis, incrementa adiponectina y mejorar el control glucémico. Este estudio investigó si la expresión de adiponectina puede desacoplarse de la inducción de PPAR γ o adipogénesis.

Los siguientes tipos de célula se infectaron con adenovirus humano Ad36, o Ad2, o se infectaron de modo simulado: a) fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) 3T3-L1 con PPAR γ intacto; b) MEF NIH/3T3 que tienen expresión afectada de PPAR γ ; y c) MEF de ratones con eliminación de PPAR γ (MEF -/-). A pesar de la disminución o ausencia de PPAR γ , Ad36 mejoró la captación de glucosa celular, la abundancia de adiponectina, de proteína Glut4 y Glut1, versus las células infectadas de modo simulado o con Ad2. Como se esperaba, la inducción adipogénica incrementó lípido en 3T3-L1 pero no en NIH/3T3 o MEF -/-. Esto indica que Ad36 incrementa la captación de glucosa y la secreción de adiponectina sin involucrar PPAR γ o promover la adipogénesis. En humanos, la infección natural con Ad36 tal como se determina por la presencia de anticuerpos Ad36, predijo niveles de adiponectina más altos sugiriendo relevancia terapéutica de estos efectos. Esto refuerza aún más nuestra propuesta de que es posible mejorar captación de glucosa por E4orf1, sin aumentar grasa corporal a diferencia de la acción de TZDs.

25

30

Ejemplo 8

Proteína E4orf1 promueve el desecho de glucosa

5 Una línea celular 3T3-L1 estable que expresa de manera inducible E4orf1 en respuesta a la doxiciclina (3T3-E4) fue desarrollada para estudiar señalización celular y para ensayar si Ad36 requiere su proteína E4orf1 para aumentar la captación de glucosa en preadipocitos de 3T3-L1. En comparación con células infectadas de modo simulado, Ad36 incrementó la captación de glucosa basal en 3 veces, lo cual fue abolido cuando E4orf1 fue bloqueada con ARNsi. Esto mostró que Ad36 promueve la captación de glucosa celular a través de E4orf1. En comparación con células con vector nulo, las células 3T3-E4 incrementaron la captación de glucosa de una manera dependiente de inducción. E4orf1 incrementó la abundancia y la activación de Ras que es la molécula obligatoria en la captación de glucosa inducida por Ad36. En particular, E4orf1 activa la isoforma de H-Ras. De esta manera, E4orf1 restringe los efectos anti-hiperglucémicos de Ad36 a una sola proteína.

Ejemplo 9

E4orf1 modula desecho de glucosa en adipocitos y hepatocitos

15 En experimentos separados, los adipocitos o preadipocitos de 3T3-L1, mioblastos de C2C12 o hepatocitos de HepG2 fueron transfectados con plásmidos etiquetados V-5 que expresan E4orf1 (ADNpc-V5-AD36-E4orf1) o un vector nulo (ADNpc-V5-DEST).

20 Considerando que la captación de glucosa por tejido adiposo y músculo esquelético y la salida de glucosa por el hígado contribuyen al control glucémico sistémico, fue determinado el efecto de E4orf1 de Ad36 en el desecho de glucosa basal y estimulado por insulina por parte de las líneas celulares que representan estos tejidos. El desecho de glucosa en adipocitos o preadipocitos de 3T3-L1, mioblastos de C2C12 o hepatocitos de HepG2 transfectados con E4orf1 que expresa plásmido fue comparado con las células transfectadas con un vector nulo.

25 La expresión de E4orf1 incrementó la captación basal de 2DG en preadipocitos de 3T3-L1, adipocitos y mioblastos de C2C12 (FIGS. 11 A-C). En adipocitos, E4orf1 incrementó además la captación de 2DG estimulada por insulina ($p=0.003$). En preadipocitos y mioblastos, que no responden completamente a la insulina, E4orf1 no promovió la captación de 2DG estimulada por insulina.

30 Aunque múltiples funciones metabólicas del hígado, tales como la captación de glucosa, la síntesis de glucógeno, la glucogenólisis, contribuyen al control glucémico sistémico, la salida de glucosa hepática con frecuencia no se controla debido a la resistencia a insulina y puede ser un contribuidor clave de la alta glucosa sanguínea en diabetes tipo 2. Por lo tanto, el foco estuvo en determinar el efecto de E4orf1 en la liberación de glucosa por parte de hepatocitos. La transfección de E4orf1 redujo significativamente la salida de glucosa por parte de las células HepG2 por debajo la línea basal así como también las condiciones de estimulación de insulina ($p<0.000001$ y <0.001 , respectivamente; FIG. 5D).

Este experimento muestra que E4orf1 de Ad36 influencia el desecho de glucosa por parte del tejido adiposo, el músculo esquelético y el hígado.

35 Referencias

- 1 Fabbrini E, Magkos F, Mohammed BS et al. Intrahepatic fat, not visceral fat, is linked with metabolic complications of obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:15430-15435.
- 2 Deivanayagam S, Mohammed BS, Vitola BE et al. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with hepatic and skeletal muscle insulin resistance in overweight adolescents. *Am J Clin Nutr* 2008;88:257-262.
- 40 3 Targher G, Bertolini L, Padovani R et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and its association with cardiovascular disease among type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2007;30:1212-1218.
- 4 Bellentani S, Scaglioni F, Marino M, Bedogni G. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Dis* 2010;28:155-161.
- 45 5 Parekh S, Anania FA. Abnormal lipid y Glucosa metabolism in obesity: implications for nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2007;132:2191-2207.
- 6 Adams LA, Lymp JF, St Sauver J et al. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. *Gastroenterology* 2005; 129: 113-121.
- 7 Ekstedt M, Franzen LE, Mathiesen UL et al. Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. *Hepatology* 2006;44:865-873.

- 8 Gupta AK, Bray GA, Greenway FL, Martin CK, Johnson WD, Smith SR. Pioglitazone, but not metformin, reduces liver fat in Type-2 diabetes mellitus independent of weight changes. *J Diabetes Complications* 2009.
- 9 Sanyal AJ, Chalasani N, Kowdley KV et al. Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med* 2010;362:1675-1685.
- 5 10 Duvnjak M, Tomasic V, Gomercic M, Smircic Duvnjak L, Barsic N, Lerotic I. Therapy of nonalcoholic fatty liver disease: current status. *J Physiol Pharmacol* 2009;60 Suppl 7:57-66.
- 11 Mishra P, Younossi ZM. Current treatment strategies for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Curr Drug Discov Technol* 2007;4:133-140.
- 10 12 Rogers PM MN, Rathod MA, Dubuisson O, Wang ZQ, Dasuri K, Babin S, Gupta A, Markward N, Cefalu WT, Dhurandhar NV. Metabolically Favorable Remodeling of Human Adipose Tissue by Human Adenovirus Ad-36. *Diabetes* 2008;57:2321-2331.
- 13 Pasarica M, Mashtalir, N, McAllister, EJ, Kilroy, GE, Koska, J, Permana, P, de Courten, B, Yu, M, Ravussin, E, Gimble, JM, Dhurandhar, NV .. Adipogenic human adenovirus Ad-36 induces commitment, differentiation and lipid accumulation in human adipose-derived stem cells. *Stem Cells* 2008 26:969-978.
- 15 14 Nawrocki AR, Rajala MW, Tomas E et al. Mice lacking adiponectin show decreased hepatic insulin sensitivity and reduced responsiveness to peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J Biol Chem* 2006;281:2654-2660.
- 15 Lutchman G, Promrat K, Kleiner DE et al. Changes in serum adipokine levels during pioglitazone treatment for nonalcoholic steatohepatitis: relationship to histological improvement. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006;4: 1048-1052.
- 20 16 Shen Z, Liang X, Rogers CQ, Rideout D, You M. Involvement of adiponectin-SIRT1-AMPK signaling in the protective action of rosiglitazone against alcoholic fatty liver in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010;298:G364-374.
- 17 Habib ZA, Havstad SL, Wells K, Divine G, Pladevall M, Williams LK. Thiazolidinedione use and the longitudinal risk of fractures in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:592-600.
- 25 18 Ramos-Nino ME, MacLean CD, Littenberg B. Association between cancer prevalence and use of thiazolidinediones: results from the Vermont Diabetes Information System. *BMC Med* 2007;5:17.
- 19 Lipscombe LL, Gomes T, Levesque LE, Hux JE, Juurlink DN, Alter DA. Thiazolidinediones and cardiovascular outcomes in older patients with diabetes. *JAMA* 2007;298:2634-2643.
- 30 20 Fernyes-Santos C, Evangelista Carneiro R, de Souza Mendonca L, Barbosa Aguilã M, Myarim-de-Lacerda CA. Rosiglitazone aggravates nonalcoholic Fatty pancreatic disease in C57BL/6 mice fed high-fat and high-sucrose diet. *Pancreas* 2009;38:e80-86.
- 21 Fernyes-Santos C, Carneiro RE, de Souza Mendonca L, Aguilã MB, Myarim-de-Lacerda CA. Pan-PPAR agonist beneficial effects in overweight mice fed a high-fat high-sucrose diet. *Nutrition* 2009;25:818-827.
- 35 22 Todd MK, Watt MJ, Le J, Hevener AL, Turcotte LP. Thiazolidinediones enhance skeletal muscle triacylglycerol synthesis while protecting against fatty acid-induced inflammation and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;292:E485-493.
- 23 Kuda O, Stankova B, Tvrzicka E et al. Prominent role of liver in elevated plasma palmitoleate levels in response to rosiglitazone in mice fed high-fat diet. *J Physiol Pharmacol* 2009;60: 135-140.
- 40 24 Trovato GM, Martines GF, Garozzo A et al. Ad36 adipogenic adenovirus in human non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 2009.
- 25 Mengshol JA, Golden-Mason L, Rosen HR. Mechanisms of Disease: HCV-induced liver injury. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2007;4:622-634.
- 26 Tsai WL, Chung RT. Viral hepatocarcinogenesis. *Oncogene* 2010;29:2309-2324.
- 45 27 Hanlon GW. Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *Int J Antimicrob Agents* 2007 ;30: 118-128.

- 28 Bischoff JR, Kim DH, Williams A et al. An adenovirus mutant that replicates, selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science* 1996;274:373-376.
- 29 Crompton AM, Kim DH. From ONYX-015 to armed vaccinia viruses: the education and evolution of oncolytic virus development. *Curr Cancer Drug Targets* 2007;7:133-139.
- 5 30 Pan Q, Liu B, Liu J, Cai R, Wang Y, Qian C. Synergistic induction of tumor cell death by combining cisplatin with an oncolytic adenovirus carrying TRAIL. *Mol Cell Biochem* 2007.
- 31 Libertini S, Iacuzzo I, Ferraro A et al. Lovastatin Enhances the Replication of the Oncolytic Adenovirus d11520 and its Antineoplastic Activity Against Anaplastic Thyroid Carcinoma Cells. *Endocrinology* 2007.
- 10 32 Heiker JT, Kosel D, Beck-Sickinger AG. Molecular advances of adiponectin and adiponectin receptors. *Biol Chem* 2010.
- 33 Kim JY, van de Wall E, Laplante M et al. Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. *J Clin Invest* 2007;117:2621-2637.
- 34 Xu A, Wang Y, Keshaw H, Xu LY, Lam KS, Cooper GJ. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J Clin Invest* 2003;112:91-100.
- 15 35 Vitola BE, Deivanayagam S, Stein RI, Mohammed BS, Magkos F, Kirk EP, et al. Weight loss reduces liver fat and improves hepatic and skeletal muscle insulin sensitivity in obese adolescents. *Obesity (Silver Spring)* 2009; 17: 1744-1748.
- 20 36 Wang ZQ CW, Zhang XH, Yongmei Y, Qin J, Son L, Rogers PM, Mashtalir N, Bordelon JR, Ye J, Dhurandhar NV. Human adenovirus type 36 enhances Glucosa uptake in diabetic and non-diabetic human skeletal muscle cells independent of insulin signaling. *Diabetes* 2008; 57 1805-1813.
37. Pasarica M, Shin AC, Yu M, Ou Yang HM, Rathod M, Jen KL, et al. Human adenovirus 36 induces adiposity, increases insulin sensitivity, and alters hypothalamic monoamines in rats. *Obesity (Silver Spring)* 2006; 14: 1905-1913.
- 25 38 Kantartzis K, Schick F, Haring HU, Stefan N. Environmental and genetic determinants of fatty liver in humans. *Dig Dis* 2010; 28: 169-178.
- 39 Magkos F, Fabbrini E, Mohammed BS, Patterson BW, Klein S. Increased Whole-Body Adiposity Without a Concomitant Increase in Liver Fat is Not Associated With Augmented Metabolic Dysfunction. *Obesity (Silver Spring)* 2010.
- 30 40 Foy HM, Grayston IT. Adenoviruses. "Viral infections of humans: Epidemiology and control". Evans Alfred S. Ed .. Plenum Medical. : New York, 1976, pp 53-70.
- 41 Horvath 1, Palkonyay L, Weber 1. Group C adenovirus DNA sequences in human lymphoid cells. *Virology* 1986; 59: 189-192.
- 42 Hierholzer IC, Wigand R, Yerson LI, Adrian T, Gold IW. Adenoviruses from patients with AIDS: a plethora of serotypes and a description of five new serotypes of subgenus D (types 43-47). *Infect Dis* 1988; 158: 804-813.
- 35 43 Wigand R, Gelderblom H, Wadell G. New human adenovirus (candidate adenovirus 36), a novel member of subgroup D. *Arch Virol* 1980; 64: 225-233.
- 44 Dhurandhar NV, Israel BA, Kolesar JM, Mayhew G, Cook ME, Atkinson RL. Transmissibility of adenovirus-induced adiposity in a chicken model. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001; 25: 990-996.
- 40 45 Dhurandhar NV, Israel BA, Kolesar JM, Mayhew GF, Cook ME, Atkinson RL. Increased adiposity in animals due to a human virus. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000; 24: 989-996.
- 46 Dhurandhar NV, Whigham LD, Abbott DH, Schultz-Darken NI, Israel BA, Bradley SM, et al. Human adenovirus Ad-36 promotes weight gain in male rhesus and marmoset monkeys. *J Nutr* 2002; 132: 3155-3160.
- 47 Pasarica M, Loiler S, Dhurandhar NV. Acute effect of infection by adipogenic human adenovirus Ad36. *Archives of Virology* 2008; 153 (11): 2097-2102.
- 45 48 Atkinson R, Dhurandhar N, Allison D, Bower R, Israel B. Evidence for an association of an obesity virus with human obesity at three sites in the United States. *Int J Obes* 1998; 22: S57.

- 49 Bouchard C, Leon AS, Rao DC, Skinner IS, Wilmore JH, Gagnon J. The HERITAGE family study. Aims, design, and measurement protocol. *Med Sci Sports Exerc* 1995; 27: 721-729.
- 50 Tompkins CL, Cefalu W, Ravussin E, Goran M, Soros A, Volaufova J, et al. Feasibility of intravenous Glucosa tolerance testing prior to puberty. *Int J Pediatr Obes* 2010; 5: 51-55.
- 5 51 Larson-Meyer DE, Newcomer BR, VanVrancken-Tompkins CL, Sothem M. Feasibility of assessing liver lipid by proton magnetic resonance spectroscopy in healthy normal and overweight prepubertal children. *Diabetes Technol Ther* 2010; 12: 207-212.
- 52 Butte NF, Cai G, Cole SA, Wilson TA, Fisher JO, Zakeri IF, et al. Metabolic and behavioral predictors of weight gain in Hispanic children: the Viva la Familia Study. *Am J Clin Nutr* 2007; 85: 1478-1485.
- 10 53 Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, et al. Adiponectin stimulates Glucosa utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 2002; 8: 1288-1295.
- 54 You M, Considine RV, Leone TC, Kelly DP, Crabb DW. Role of adiponectin in the protective action of dietary saturated fat against alcoholic fatty liver in mice. *Hepatology* 2005; 42: 568-577.
- 55 Pajvani UB, Scherer PE. Adiponectin: systemic contributor to insulin sensitivity. *Cuff Diab Rep* 2003; 3: 207-213.
- 15 56 Waki H, Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Uchida S, Kita S, et al. Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin. *J Biol Chem* 2003; 278:40352-40363.
- 57 Schraw T, Wang ZV, Halberg N, Hawkins M, Scherer PE. Plasma adiponectin complexes have distinct biochemical characteristics. *Endocrinology* 2008; 149: 2270-2282.
- 20 58 Zhang W, Patil S, Chauhan B, Guo S, Powell DR, Le J, et al. FoxO1 regulates multiple metabolic pathways in the liver: effects on gluconeogenic, glycolytic, and lipogenic gene expression. *J Biol Chem* 2006; 281: 10105-10117.
- 59 Yoon M. The role of PP ARalpha in lipid metabolism and obesity: focusing on the effects of estrogen on PPARalpha actions. *Pharmacol Res* 2009; 60:151-159.
- 25 60 Louet JF, Le May C, Pegorier JP, Decaux JF, Girard J. Regulation of liver carnitine palmitoyltransferase I gene expression by hormones and fatty acids. *Biochem Soc Trans* 2001; 29: 310-316.
- 61 Kotokorpi P, Ellis E, Parini P, Nilsson LM, Strom S, Steffensen KR, et al. Physiological differences between human and rat primary hepatocytos in response to liver X receptor activation by 3-[3-[N-(2-chloro-3-trifluoromethylbenzyl)-(2,2-diphenylethyl)amino]propyl oxy]phenylacetic acid hydrochloride (GW3965). *Mol Pharmacol* 2007;72: 947-955.
- 30 62 Liao W, Kobayashi K, Chan L. Adenovirus-mediated overexpression of microsomal triglyceride transfer protein (MTP): mechanistic studies on the role of MTP in apolipoprotein B-100 biogenesis, by. *Bioquímica* 1999; 38: 10215.
- 63 Liao W, Kobayashi K, Chan L. Adenovirus-mediated overexpression of microsomal triglyceride transfer protein (MTP): mechanistic studies on the role of MTP in apolipoprotein B-100 biogenesis. *Bioquímica* 1999; 38: 7532-7544.
- 35 64 Tietge UJ, Bakillah A, Maugeais C, Tsukamoto K, Hussain M, Rader DJ. Hepatic overexpression of microsomal triglyceride transfer protein (MTP) results in increased in vivo secretion of VLDL triglycerides and apolipoprotein B. *J Lipid Res* 1999; 40: 2134-2139.
- 65 Dixon JL, Ginsberg HN. Regulation of hepatic secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins: information obtained from cultured liver cells. *J Lipid Res* 1993; 34: 167-179.
- 40 66 Davidson NO, Shelness GS. APOLIPOPROTEIN B: mRNA editing, lipoprotein assembly, and pre secretory degradation. *Annu Rev Nutr* 2000; 20: 169- 193.
- 67 Polyzos SA, Kountouras J, Zavos C, Tsiaousi E. The role of adiponectin in the pathogenesis y treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes Obes Metab* 2010; 12: 365-383.
- 68 Gao Z, Yin J, Zhang J, He Q, McGuinness OP, Ye J. Inactivation of NF-kappaB p50 leads to insulin sensitization in liver through post-translational inhibition of p70S6K. *J Biol Chem* 2009; 284: 18368-18376.
- 45 69 Xu F, Gao Z, Zhang J, Rivera CA, Yin J, Weng J, et al. Lack of SIRT1 (Mammalian Sirtuin 1) activity leads to liver steatosis in the SIRT1 +/- mice: a role of lipid mobilization and inflammation. *Endocrinology* 2010; 151: 2504-2514.

- 70 Vangipuram SD, Sheele J, Atkinson RL, Holly TC, Dhurandhar NV. A human adenovirus enhances preadipocyte differentiation. *Obes Res* 2004; 12: 770-777.
- 5 71 Gao Z, Wang Z, Zhang X, Butler AA, Zuberi A, Gawronska-Kozak B, et al. Inactivation of PKC θ leads to increased susceptibility to obesity and dietary insulin resistance in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 292: E84-91.
- 72 Cefalu WT, Wang ZQ, Bell-Farrow A, Ralapati S. Liver and kidney tissue membranes as tissue markers for nonenzymatic glycosylation. *Diabetes* 1991; 40: 902-907.
- 73 Lupo MA, Cefalu WT, Pardridge WM. Kinetics of lactate transport into rat liver in vivo. *Metabolism* 1990; 39: 374-377.
- 10 74 Hillyard LA, Lin CY, Abraham S. Lipogenic enzyme activities in primary cultures of adult mouse hepatocitos. *Lipids* 1988; 23: 242-247.
- 75 Amatruda JM, Danahy SA, Chang CL. The effects of glucocorticoids on insulin-stimulated lipogenesis in primary cultures of rat hepatocitos. *Biochem J* 1983; 212: 135-141.
- 15 76 C. W. Wang ZQ, Zhang XH, Yongmei Y, Qin J, Son L, Rogers PM, Mashtalir N, Bordelon JR, Ye J, Dhurandhar NV., *Diabetes* 57 1805 (2008).
- 77 G. Sesti, M. Federici, D. Lauro, P. Sbraccia, R. Lauro, *Diabetes Metab Res Rev* 17, 363 (Sep-Oct, 2001).
- 78 G. Sesti et al., *FASEB J* 15,2099 (Oct, 2001).
- 79 R. K. Semple et al., *Diabetes Care* 31,977 (May, 2008).
- 80 R. K. Semple et al., *J Clin Invest* 119, 315 (Feb, 2009).
- 20 81 J. E. Pessin, A. R. Saltiel, *J Clin Invest* 106, 165 (Jul, 2000).
- 82 L. J. Goodyear et al., *J Clin Invest* 95,2195 (May, 1995).
- 83 M. J. Pagliassotti, J. Kang, J. S. Thresher, C. K. Sung, M. E. Bizeau, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282, E170 (Jan, 2002).
- 84 N. G. Boule et al., *Diabetes Care* 28, 108 (Jan, 2005).
- 25 85 N. F. Butte, G. Cai, S. A. Cole, A. G. Comuzzie, *Am J Clin Nutr* 84, 646 (Sep, 2006).
- 86 C. C. Cowie et al., *Diabetes Care* 32, 287 (Feb, 2009).
- 87 G. Zhou et al., *J Clin Invest* 108, 1167 (Oct, 2001).
- 88 G. D. Cartee, J. F. Wojtaszewski, *Appl Physiol Nutr Metab* 32, 557 (Jun, 2007).
- 89 Z. Gao et al., *J Biol Chem* 277, 48115 (Dec 13, 2002).
- 30 90 E. Maury, S. M. Brichard, *Mol Cell Endocrinol* 1314, 1 (Jan 15).
- 91 M. Qatanani, M. A. Lazar, *Genes Dev* 21, 1443 (Jun 15,2007).
- 92 R. L. Atkinson et al., *Int J Obes (Lond)* 29, 281 (Mar, 2005).
- 93 P. An et al., *Metabolism* 52,246 (Feb, 2003).
- 94 R. C. Boston et al., *Diabetes Technol Ther* 5, 1003 (2003).
- 35 95 S. Bajpeyi et al., *J Appl Physiol* 106, 1079 (Apr, 2009).
- 96 F. Aoki et al., *Biosci Biotechnol Biochem* 71,206 (Jan, 2007).
- 97 A. Raben, N. Haulrik, N. Dhurandhar, R. Atkinson, A. Astrup, *Int J Obes* 25 (Supp12), S46 (2001).

Reivindicaciones

1. Proteína E4orf1 de adenovirus-36 o variante funcional de la misma, o un ácido nucleico que codifica E4orf1 de adenovirus-36 o variante funcional del mismo, o un análogo de E4orf1 de adenovirus-36 para uso en un método para tratar o prevenir la enfermedad de hígado graso no alcohólico en un individuo.
- 5 2. Proteína E4orf1 de adenovirus-36 o variante funcional de la misma para uso en un método para reducir grasa excesiva del hígado en un individuo.
3. Proteína E4orf1 de adenovirus 36 o variante funcional de la misma para uso en un método para tratar o prevenir disfunción hepática, caracterizada por hígado graso y resistencia a insulina, en un individuo.
- 10 4. Proteína E4orf1 de adenovirus-36 o variante funcional de la misma para uso de acuerdo con la reivindicación 3, en cuyo caso el mejoramiento de la acumulación de grasa de hígado se caracteriza por oxidación incrementada de lípido o transporte incrementado de lípido desde el hígado.
5. Proteína E4orf1 de adenovirus 36 o variante funcional de la misma para uso en un método para reducir o prevenir esteato-hepatitis no alcohólica (NASH) en un individuo.
- 15 6. Proteína E4orf1 de adenovirus-36 o variante funcional de la misma para uso de acuerdo con la reivindicación 1, 2, 3, o 5, en cuyo caso se administra una proteína E4orf1 de adenovirus-36 y la secuencia de aminoácidos de la proteína E4orf1 de adenovirus-36 es SEQ ID NO:2 o variante funcional de la misma.
7. Proteína E4orf1 de adenovirus-36 o variante funcional de la misma para uso de acuerdo con la reivindicación 1, 2, 3 o 5, en cuyo caso se administra un ácido nucleico que codifica la proteína E4orf1 de adenovirus-36 introduciendo al mamífero una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína E4orf1 de adenovirus-36, de una manera que permite la expresión de la proteína E4orf1 de adenovirus-36.
- 20 8. Proteína E4orf1 de adenovirus-36 o variante funcional de la misma para uso de acuerdo con la reivindicación 7, en cuyo caso la secuencia de ácido nucleico se introduce por un método seleccionado del grupo consistente en electroporación, transfección de dextrano DEAE, transfección de fosfato de calcio, fusión de liposoma catiónico, fusión de protoplasto, creación de un campo eléctrico in vivo, bombardeo de microproyectiles recubiertos con ADN, inyección con virus sin capacidad de replicación recombinante, recombinación homóloga, terapia de genes in vivo, terapia de genes ex vivo, vectores virales y transferencia de ADN desnudo.
- 25 9. Proteína E4orf1 de adenovirus-36 o variante funcional de la misma para uso de acuerdo con la reivindicación 7, en cuyo caso la secuencia de ácido nucleico comprende SEQ ID NO:1 o variante funcional de la misma.
10. Proteína E4orf1 de adenovirus-36 o variante funcional de la misma para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3 y 5, en cuyo caso el individuo es un humano.
- 30 11. Uso de la proteína E4orf1 de adenovirus-36 o variante funcional de la misma, o de un ácido nucleico que codifica E4orf1 de adenovirus-36 o variante funcional de la misma, o un análogo de E4orf1 de adenovirus-36, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de enfermedad de hígado graso no alcohólico en un individuo, reduciendo grasa excesiva del hígado en un individuo, incrementando sensibilidad a insulina en un individuo, tratando o previniendo disfunción hepática caracterizada por hígado graso y resistencia a insulina en un individuo, y/o reduciendo o previniendo esteato-hepatitis no alcohólica (NASH) en un individuo
- 35 12. Uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el cual se administra una proteína E4orf1 de adenovirus-36, o se prepara para administración, y la secuencia de aminoácidos de la proteína E4orf1 de adenovirus-36 es SEQ ID NO:2 o variante funcional de la misma.
- 40 13. Uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el cual se administra un ácido nucleico que codifica la proteína E4orf1 de adenovirus-36, o se prepara para administración, introduciendo al mamífero una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína E4orf1 de adenovirus-36 de una manera que permite la expresión de la proteína E4orf1 de adenovirus-36.
- 45 14. Uso de acuerdo con la reivindicación 13, en el cual se introduce la secuencia de ácido nucleico, o se prepara para introducción, mediante un método seleccionado del grupo consistente en electroporación, transfección de dextrano DEAE, transfección de fosfato de calcio, fusión de liposoma catiónico, fusión de protoplasto, creación de un campo eléctrico in vivo, bombardeo de micro-proyectiles recubiertos con ADN, inyección con virus sin capacidad de replicación recombinante, recombinación homóloga, terapia de genes in vivo, terapia de genes ex vivo, vectores virales y transferencia de ADN desnudo.
- 50 15. Uso de acuerdo con la reivindicación 13, en el cual dicho individuo es un humano.

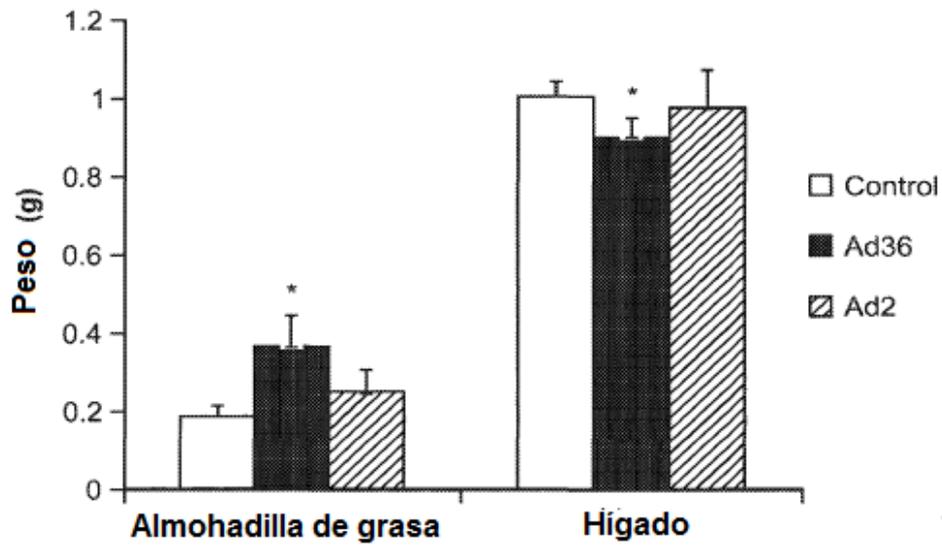


FIG. 1

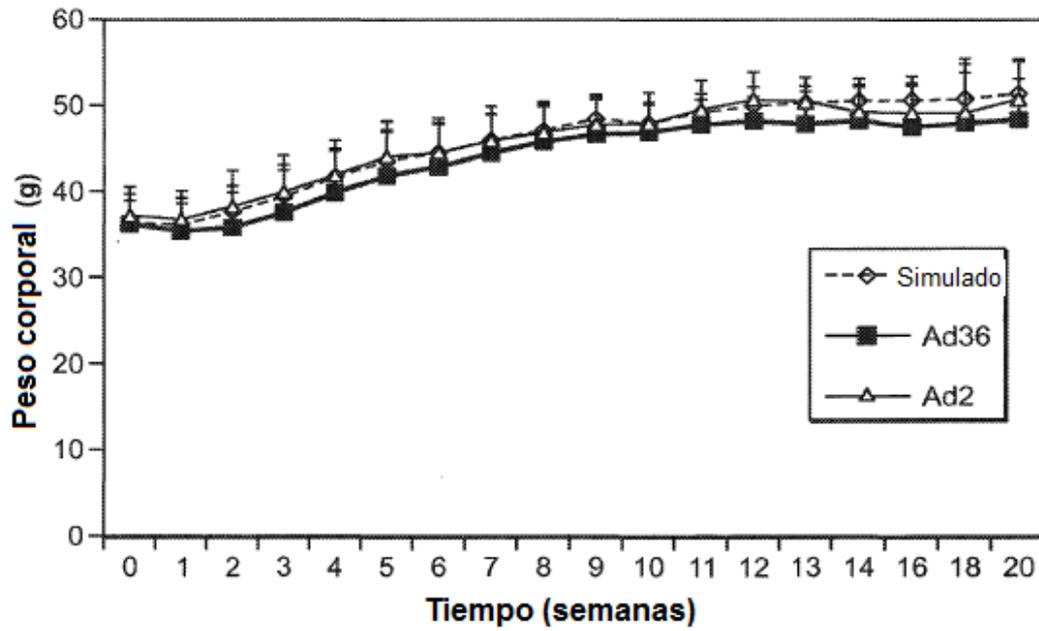


FIG. 2

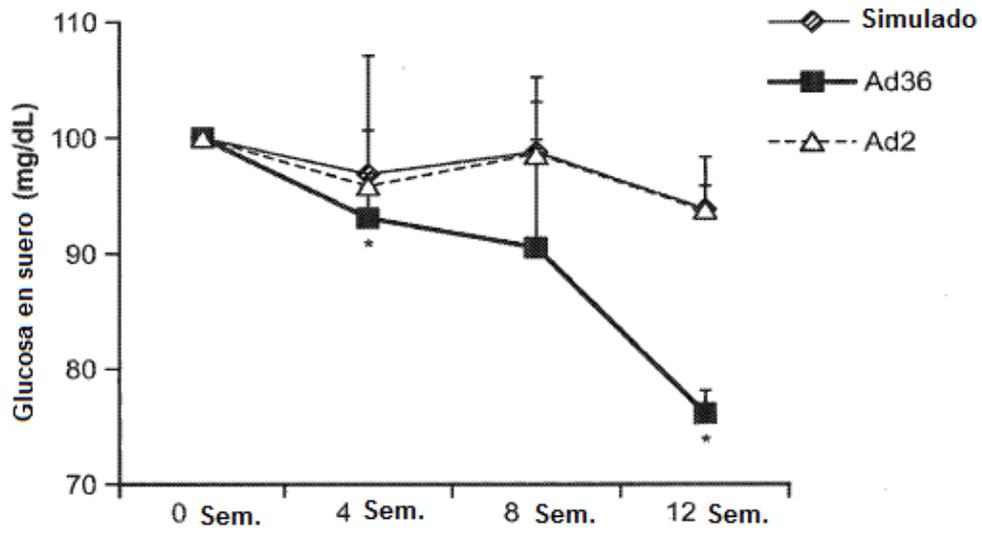


FIG. 3A

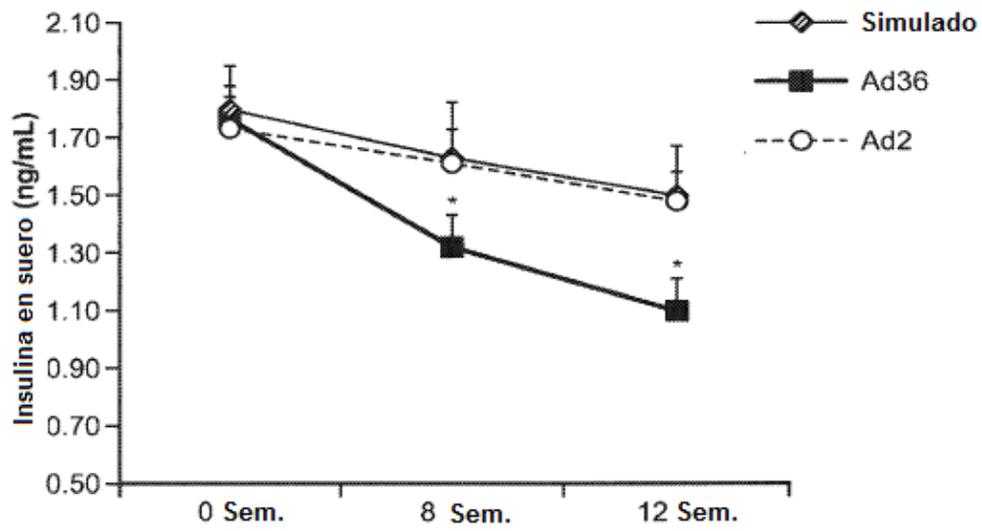


FIG. 3B

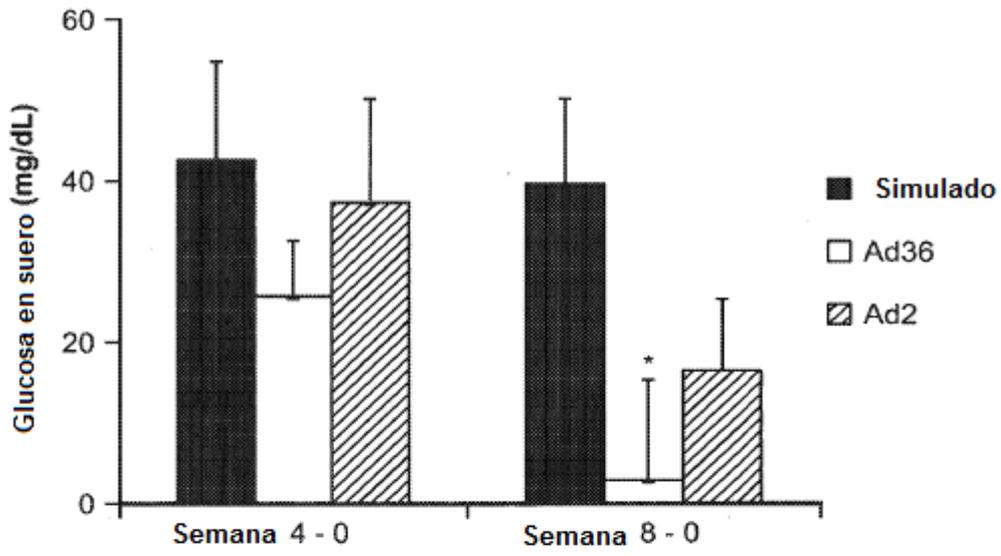


FIG. 3C

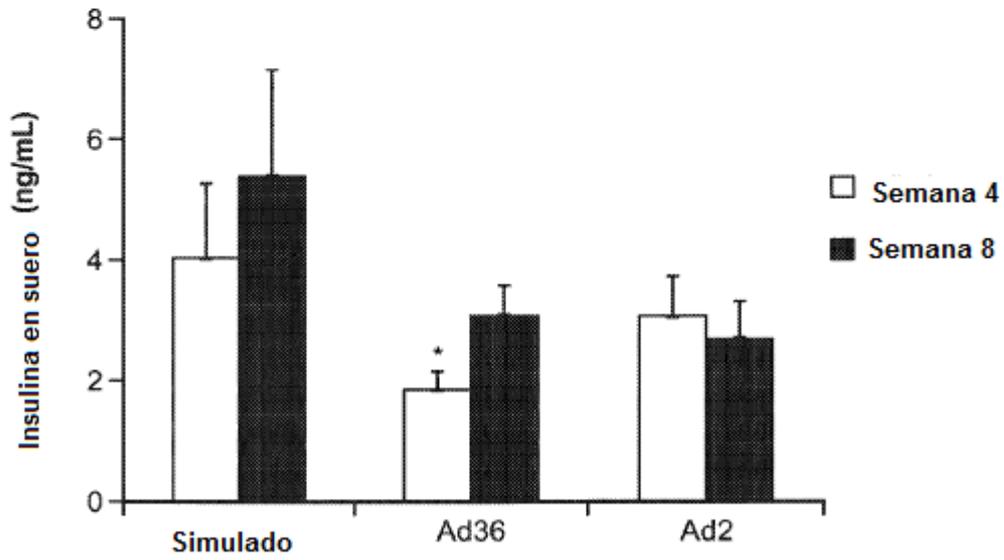


FIG. 3D

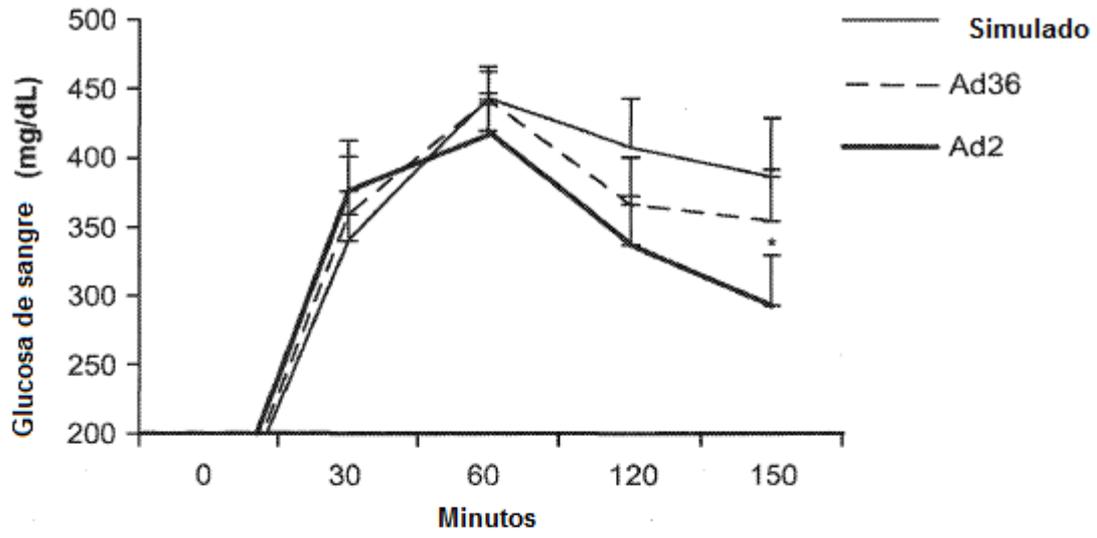


FIG. 3E

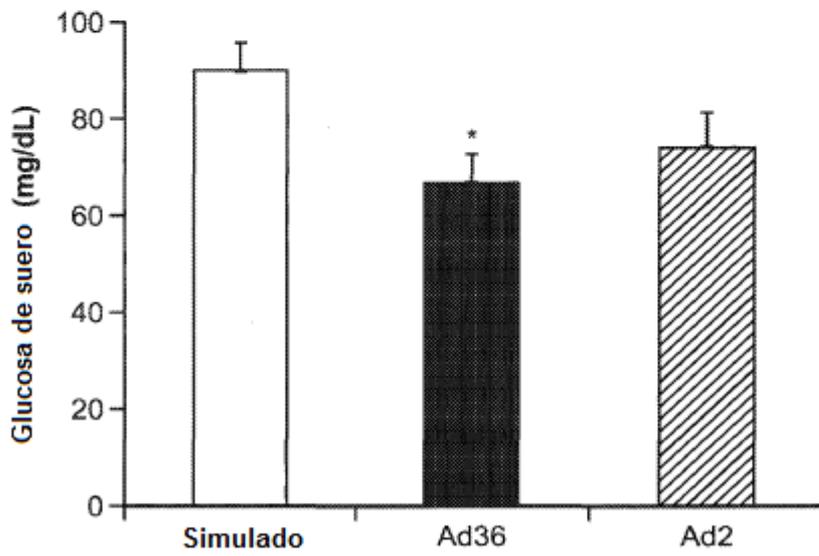


FIG. 3F

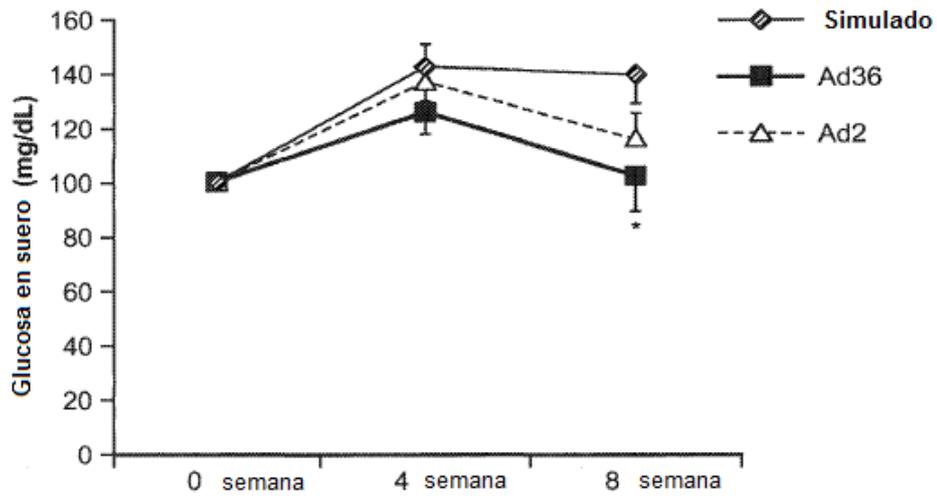


FIG. 4A

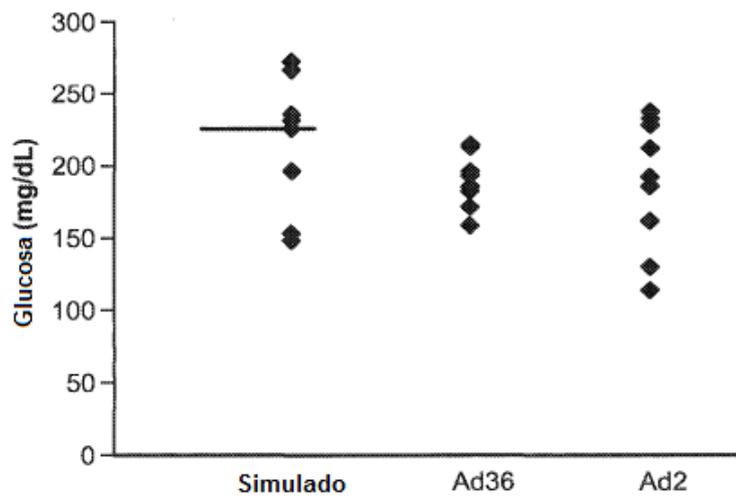


FIG. 4B

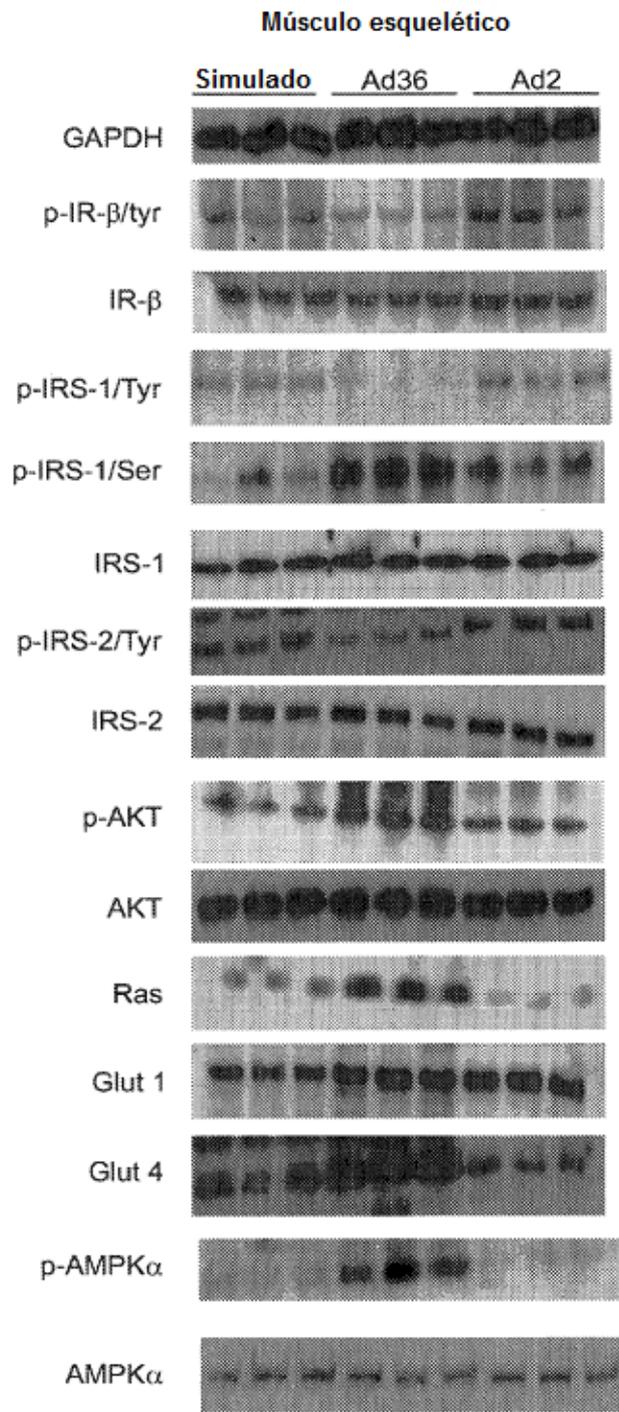


FIG. 5A

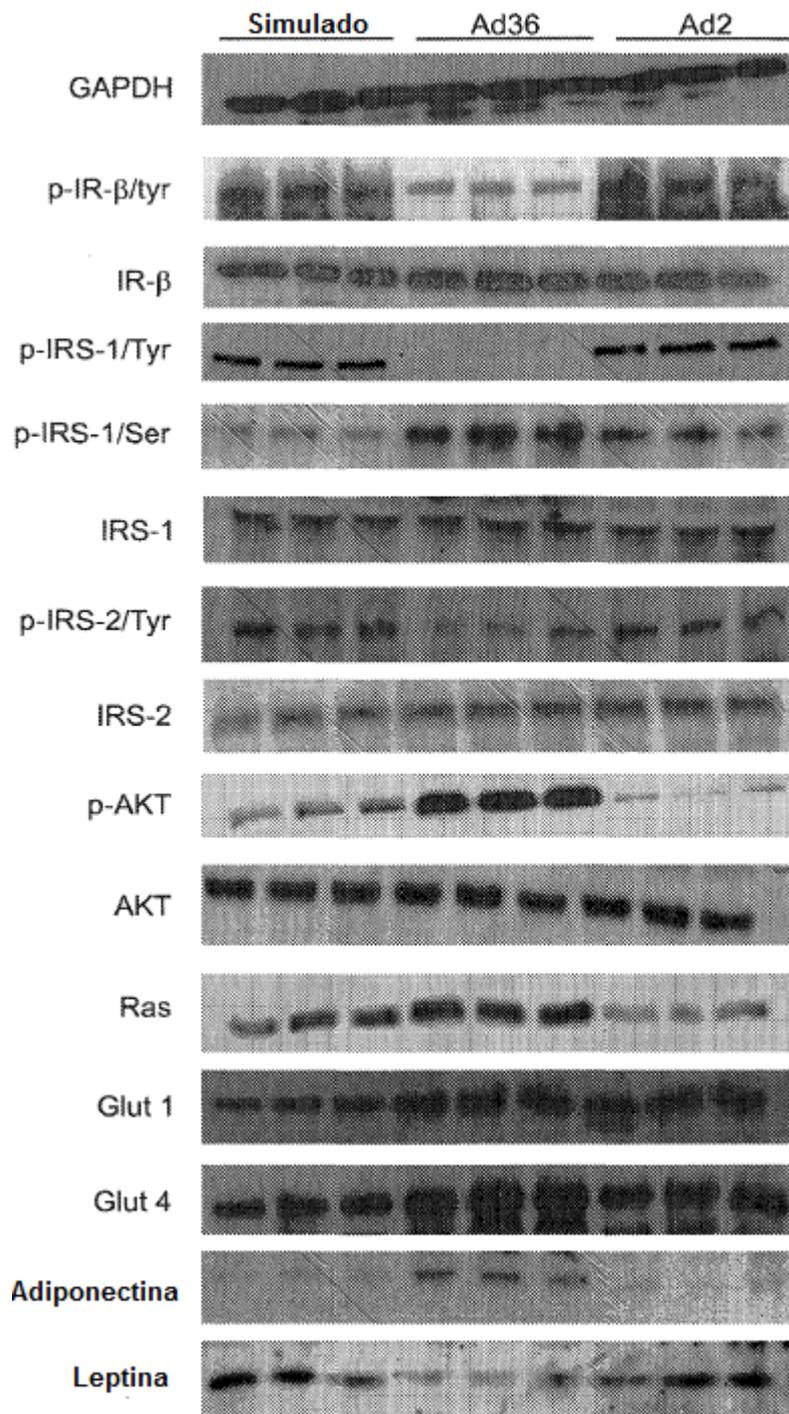


FIG. 5B

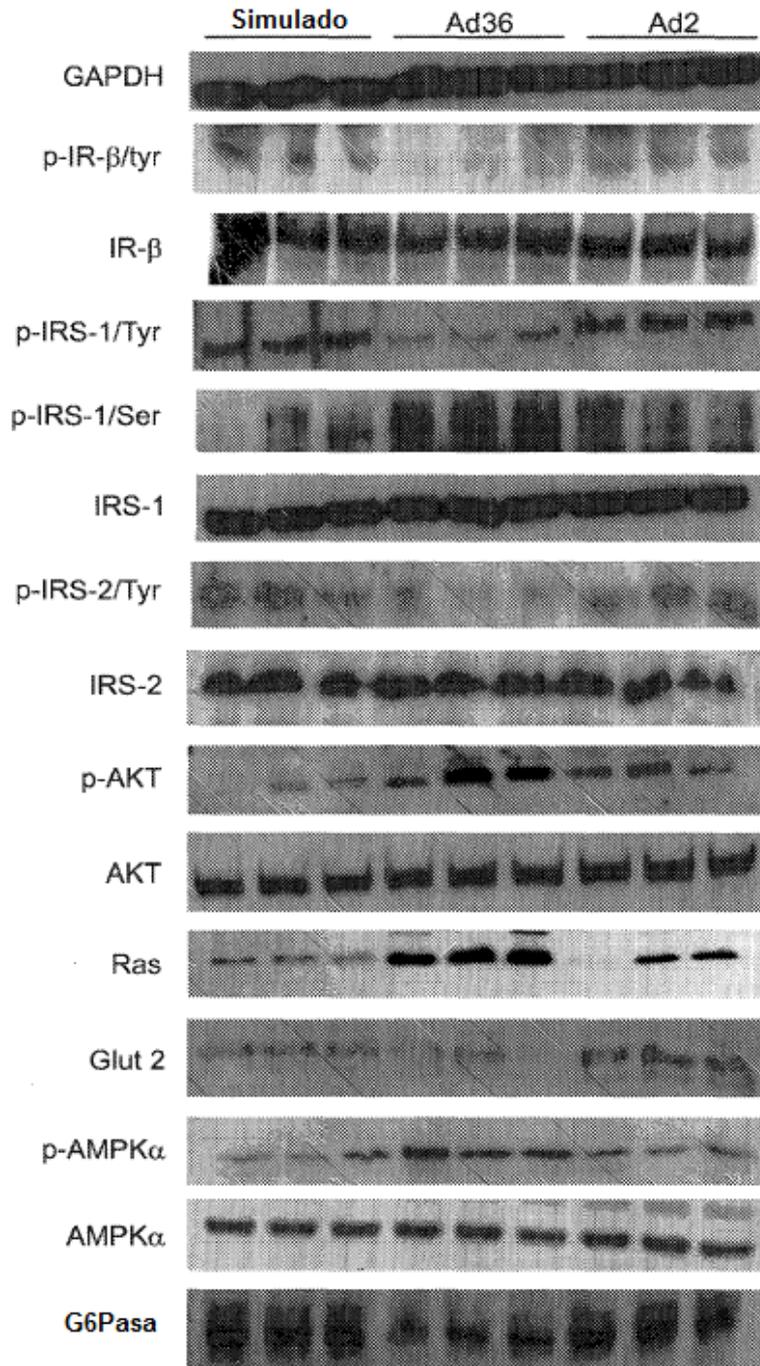
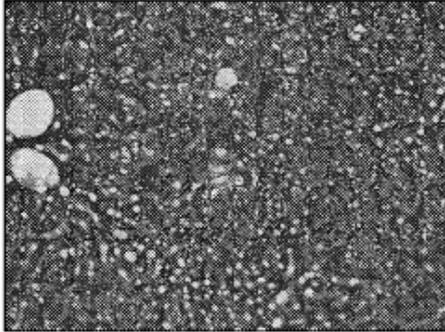
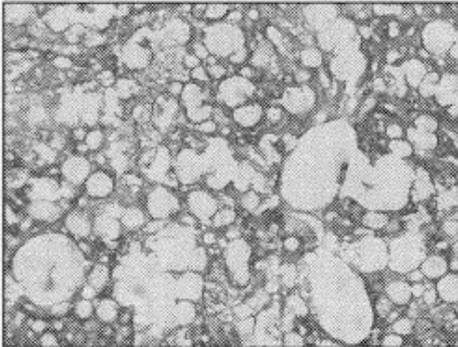
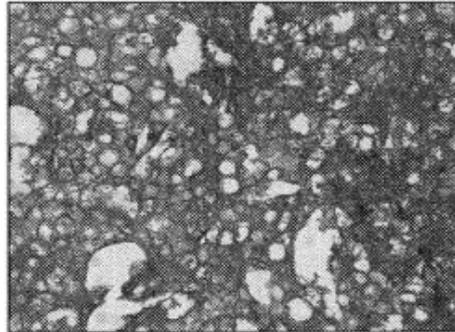


FIG. 5C

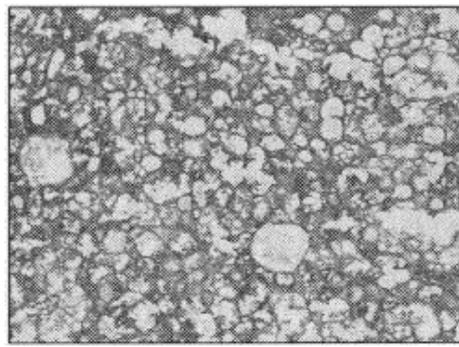
Alimentados con producto estándar



Dieta AG de grupo de Ad36



Dieta AG de grupo Ad2



Dieta AG de grupo simulado

FIG. 6A

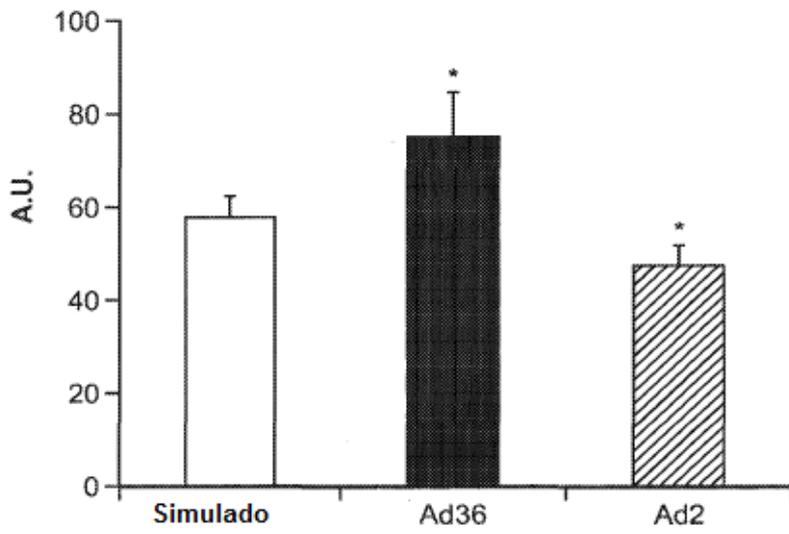


FIG. 6B

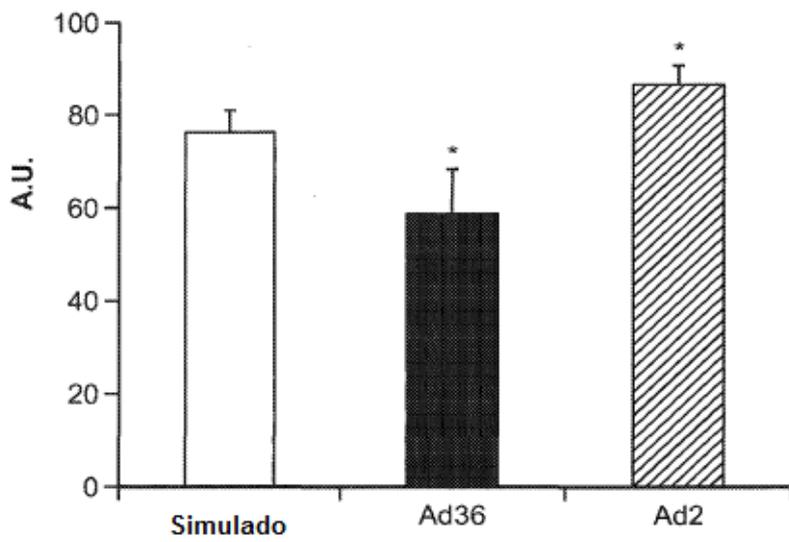


FIG. 6C

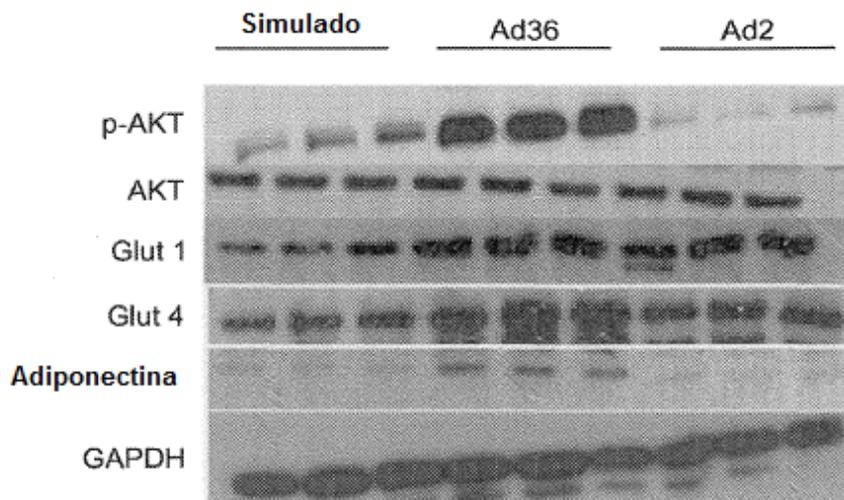


FIG. 7A

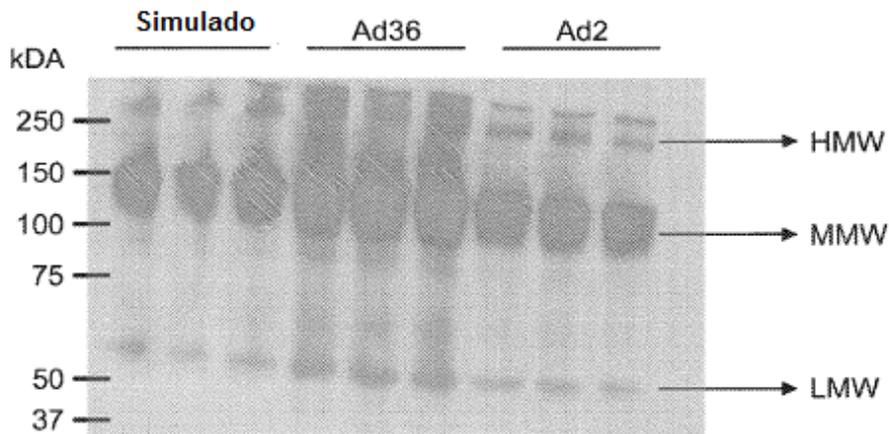


FIG. 7B

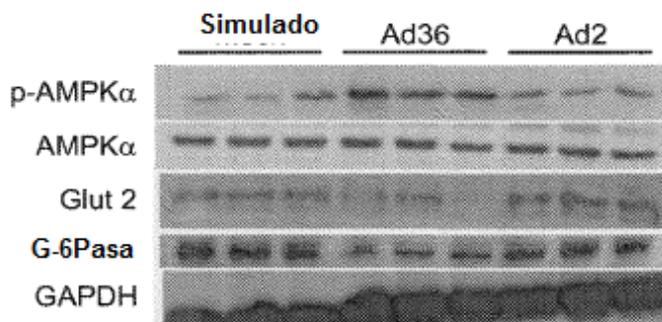


FIG. 8

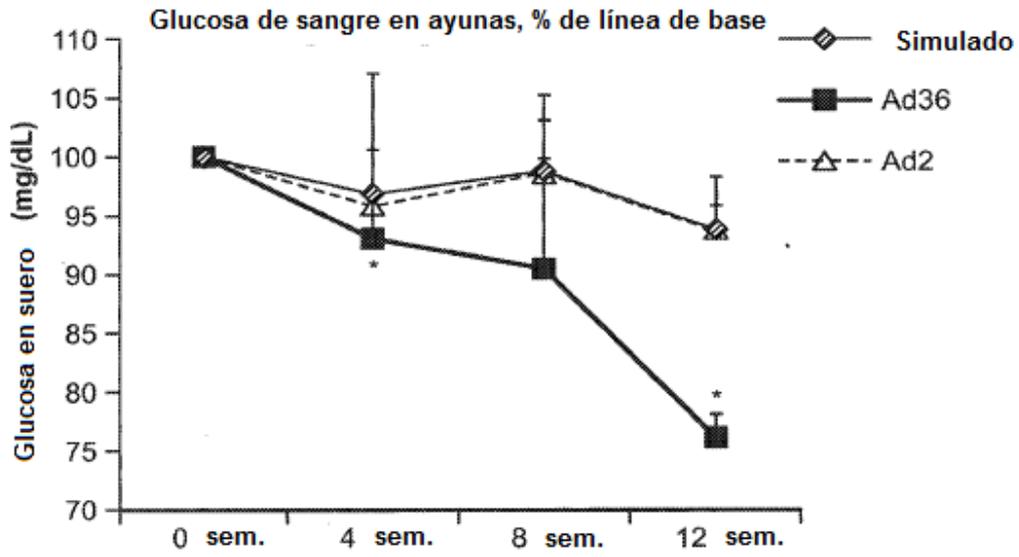


FIG. 9A

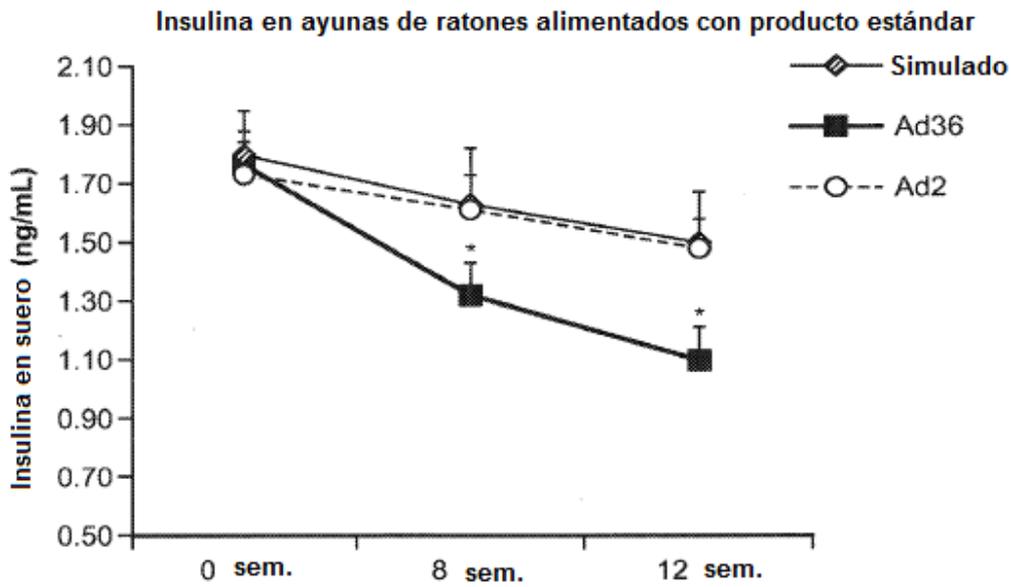


FIG. 9B

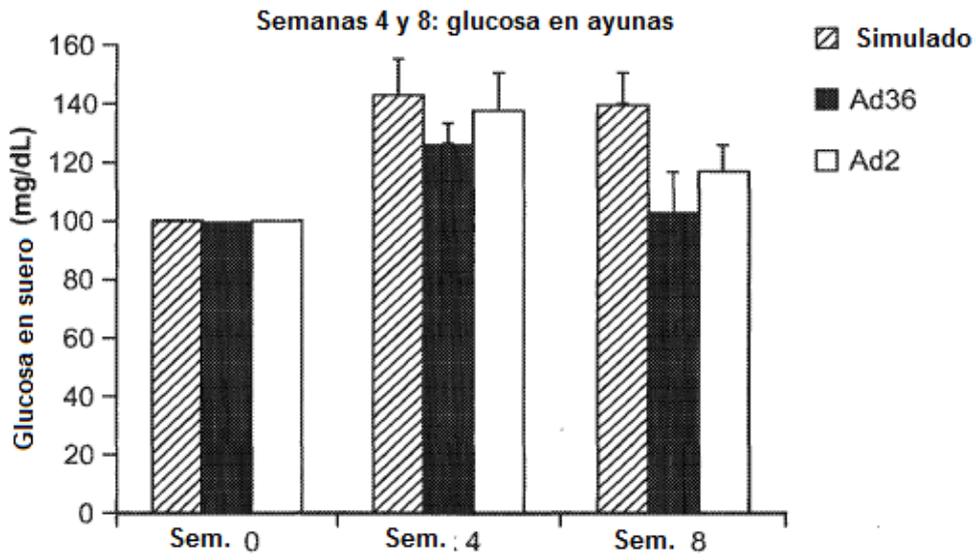


FIG. 10A

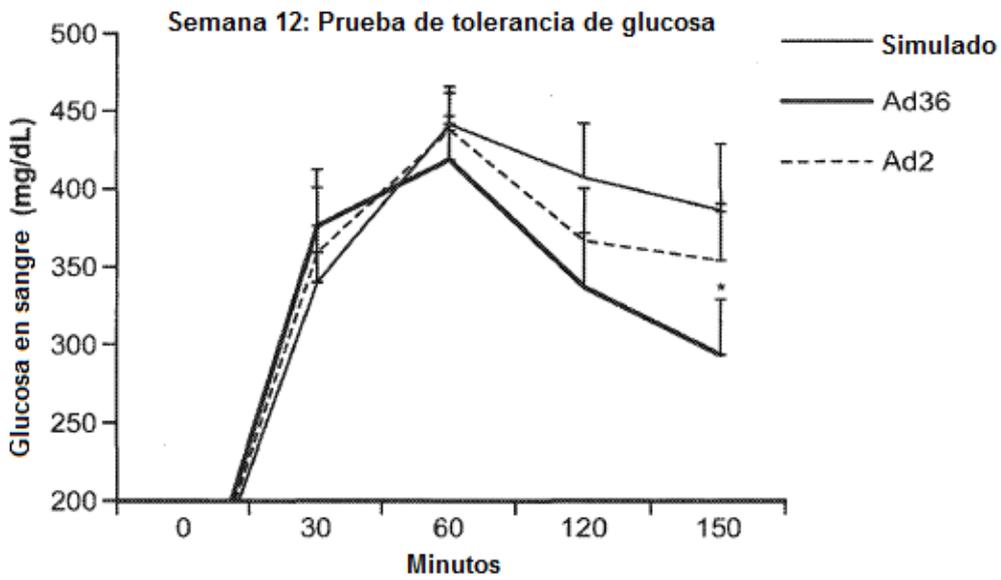


FIG. 10B

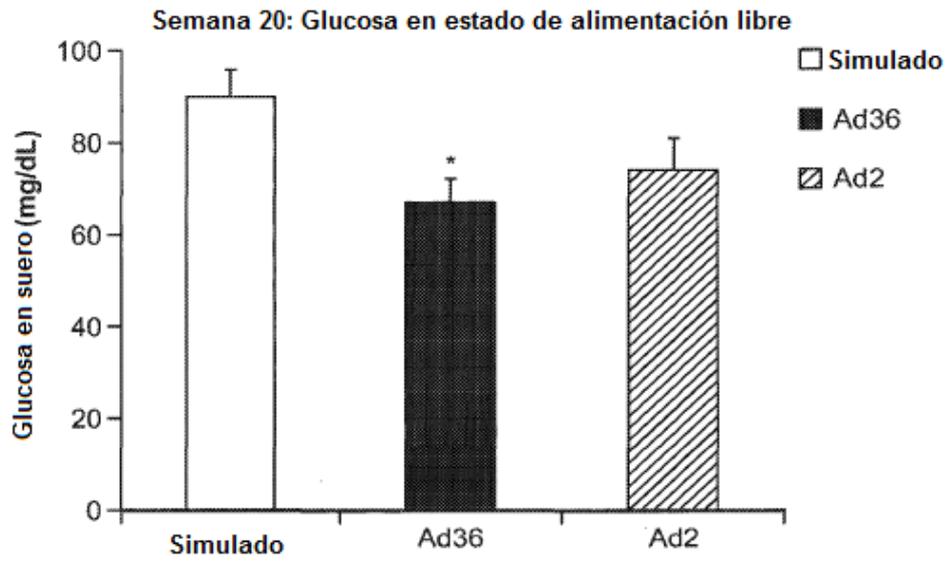


FIG. 10C

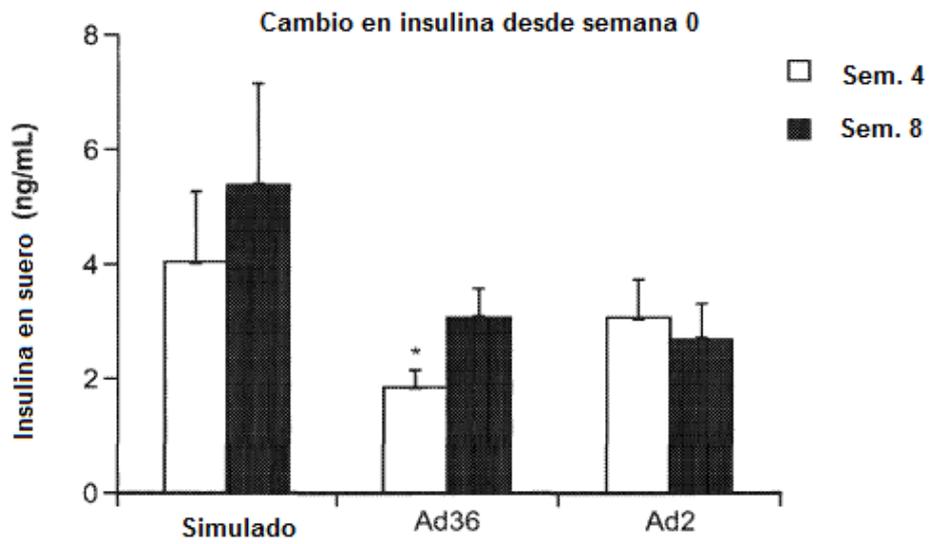


FIG. 10D

