



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년02월23일

(11) 등록번호 10-1831638

(24) 등록일자 2018년02월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 38/16 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-7001869

(22) 출원일자(국제) 2011년07월08일

심사청구일자 2016년01월28일

(85) 번역문제출일자 2013년01월24일

(65) 공개번호 10-2013-0100262

(43) 공개일자 2013년09월10일

(86) 국제출원번호 PCT/US2011/043338

(87) 국제공개번호 WO 2012/006512

국제공개일자 2012년01월12일

(30) 우선권주장

61/362,443 2010년07월08일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

WO2007064836 A1\*

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

보드 오브 슈퍼바이저스 오브 루이지애나 스테이트 유니버시티 앤드 애그리컬추얼 앤드 메카니컬 컬리지

미국 루이지애나주 70893 배턴 루지 피.오. 박스 16070

(72) 발명자

두란드하르, 닉힐

미국, 루이지애나 70810, 배턴 루지, 사우스 레이크사이드 오크스 에비뉴 11152

(74) 대리인

강명구, 이경민

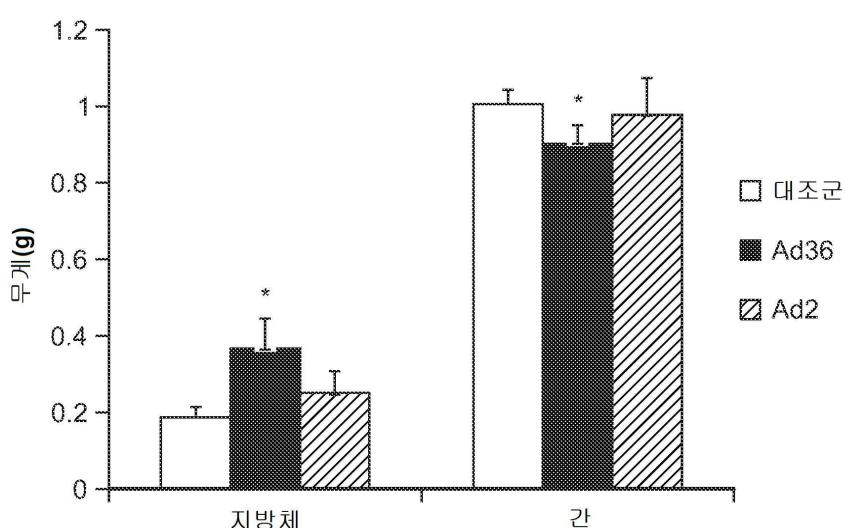
전체 청구항 수 : 총 22 항

심사관 : 이수정

(54) 발명의 명칭 비-알코올성 지방간 질환의 예방 및 치료를 위한 아데노바이러스 AD36 E40RF1 단백질

**(57) 요약**

본 발명은 일반적으로 비-알코올성 지방간 질환의 증상을 치료하거나 예방하기 위한 방법, 간에서 과도한 지방을 감소시키기 위한 방법, 혈당조절을 개선하는 방법, 및 간 기능장애를 치료하거나 예방하기 위한 방법에 관한 것이며, 이는 치료적 유효량의 아데노바이러스 36 E4orf1 단백질 또는 이의 기능적 변이체를 투여하는 단계를 포함한다.

**대 표 도 - 도1**

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

개체내 비-알코올성 지방간 질환의 증상의 치료 또는 예방을 위한 제약학적 조성물에 있어서, 상기 조성물은 치료적 유효량의 아데노바이러스-36 E4orf1 단백질, 또는 아데노바이러스-36 E4orf1 단백질를 인코딩하는 핵산을 포함하는 것을 특징으로 하는, 개체내 비-알코올성 지방간 질환의 증상의 치료 또는 예방을 위한 제약학적 조성물.

#### 청구항 2

제 1항에 있어서, 아데노바이러스-36 E4orf1 단백질의 아미노산 서열은 서열번호: 2인 것을 특징으로 하는, 개체내 비-알코올성 지방간 질환의 증상의 치료 또는 예방을 위한 제약학적 조성물.

#### 청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 조성물은 아데노바이러스-36 E4orf1 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 것을 특징으로 하는, 개체내 비-알코올성 지방간 질환의 증상의 치료 또는 예방을 위한 제약학적 조성물.

#### 청구항 4

제 3항에 있어서, 핵산 서열은 서열번호:1을 포함하는 것을 특징으로 하는, 개체내 비-알코올성 지방간 질환의 증상의 치료 또는 예방을 위한 제약학적 조성물.

#### 청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 개체는 인간인 것을 특징으로 하는, 개체내 비-알코올성 지방간 질환의 증상의 치료 또는 예방을 위한 제약학적 조성물.

#### 청구항 6

개체내 간에서 과도한 지방을 감소시키기 위한 제약학적 조성물에 있어서, 상기 제약학적 조성물은 치료적 유효량의 아데노바이러스-36 E4orf1 단백질을 포함하는 것을 특징으로 하는, 개체내 간에서 과도한 지방을 감소시키기 위한 제약학적 조성물.

#### 청구항 7

제 6항에 있어서, 아데노바이러스-36 E4orf1 단백질의 아미노산 서열은 서열번호:2인 것을 특징으로 하는, 개체내 간에서 과도한 지방을 감소시키기 위한 제약학적 조성물.

#### 청구항 8

제 6항에 있어서, 상기 조성물은 아데노바이러스-36 E4orf1 단백질을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 개체내 간에서 과도한 지방을 감소시키기 위한 제약학적 조성물.

#### 청구항 9

제 8항에 있어서, 핵산 서열은 서열번호:1을 포함하는 것을 특징으로 하는, 개체내 간에서 과도한 지방을 감소시키기 위한 제약학적 조성물.

#### 청구항 10

제 6항에 있어서, 상기 개체는 인간인 것을 특징으로 하는, 개체내 간에서 과도한 지방을 감소시키기 위한 제약학적 조성물.

#### 청구항 11

삭제

### 청구항 12

삭제

### 청구항 13

삭제

### 청구항 14

삭제

### 청구항 15

삭제

### 청구항 16

개체에서 지방간 및 인슐린 저항성으로 특징지어지는 간 기능장애의 치료 또는 예방을 위한 제약학적 조성물에 있어서, 상기 제약학적 조성물은 치료적 유효량의 Ad36 E4orf1 단백질을 포함하는 것을 특징으로 하는, 지방간 및 인슐린 저항성으로 특징지어지는 간 기능장애의 치료 또는 예방을 위한 제약학적 조성물.

### 청구항 17

제 16항에 있어서, 상기 치료 또는 예방은 증가된 지질 산화 또는 간으로부터 지질의 증가된 이동으로 특징지어지는 간 지방 축적의 개선인 것을 특징으로 하는, 지방간 및 인슐린 저항성으로 특징지어지는 간 기능장애의 치료 또는 예방을 위한 제약학적 조성물.

### 청구항 18

제 16항에 있어서, 상기 조성물은 아데노바이러스-36 E4orf1 단백질을 포함하고, 아데노바이러스-36 E4orf1 단백질의 아미노산 서열은 서열번호:2인 것을 특징으로 하는, 지방간 및 인슐린 저항성으로 특징지어지는 간 기능장애의 치료 또는 예방을 위한 제약학적 조성물.

### 청구항 19

제 16항에 있어서, 상기 조성물은 아데노바이러스-36 E4orf1 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 것을 특징으로 하는, 지방간 및 인슐린 저항성으로 특징지어지는 간 기능장애의 치료 또는 예방을 위한 제약학적 조성물.

### 청구항 20

제 19항에 있어서, 핵산 서열은 서열번호:1을 포함하는 것을 특징으로 하는, 지방간 및 인슐린 저항성으로 특징지어지는 간 기능장애의 치료 또는 예방을 위한 제약학적 조성물.

### 청구항 21

제 16항에 있어서, 상기 개체는 인간인 것을 특징으로 하는, 지방간 및 인슐린 저항성으로 특징지어지는 간 기능장애의 치료 또는 예방을 위한 제약학적 조성물.

### 청구항 22

개체에서 비-알코올성 지방-간염 (NASH)의 치료 또는 예방을 위한 제약학적 조성물에 있어서, 상기 조성물은 치료적 유효량의 Ad36 E4orf1 단백질을 포함하는 것을 특징으로 하는, 비-알코올성 지방-간염 (NASH)의 치료 또는 예방을 위한 제약학적 조성물.

### 청구항 23

제 22항에 있어서, 상기 조성물은 간 기능장애가 원인인 고혈당증을 치료하거나 예방하는 것을 특징으로 하는, 비-알코올성 지방-간염 (NASH)의 치료 또는 예방을 위한 제약학적 조성물.

**청구항 24**

제 22항에 있어서, 상기 조성물은 아데노바이러스-36 E4orf1 단백질을 포함하고 아데노바이러스-36 E4orf1 단백질의 아미노산 서열은 서열번호:2인 것을 특징으로 하는, 비-알코올성 지방-간염 (NASH)의 치료 또는 예방을 위한 제약학적 조성물.

**청구항 25**

제 22항에 있어서, 상기 조성물은 아데노바이러스-36 E4orf1 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 것을 특징으로 하는, 비-알코올성 지방-간염 (NASH)의 치료 또는 예방을 위한 제약학적 조성물.

**청구항 26**

제 25항에 있어서, 핵산 서열은 서열번호:1을 포함하는 것을 특징으로 하는, 비-알코올성 지방-간염 (NASH)의 치료 또는 예방을 위한 제약학적 조성물.

**청구항 27**

제 22항에 있어서, 상기 개체는 인간인 것을 특징으로 하는, 비-알코올성 지방-간염 (NASH)의 치료 또는 예방을 위한 제약학적 조성물.

**발명의 설명****기술 분야****[0001] 관련된 출원에 대한 교차-참조**

본 출원은 2010년 7월 8일에 제출된, "비-알코올성 지방간 질환의 예방 및 치료를 위한 아데노바이러스 Ad36 E4orf1 단백질"이라는 제목의 미국 특허 출원 일련번호 61/362,443의 이익을 주장하며, 상기 문헌은 모든 목적에 대해 이의 전체로 참조로서 본 명세서에 편입된다.

**[0003] 정부 재정지원**

본 발명의 개발은 국립보건원, 승인번호 제 R01 DK066164호로부터 보조하에 정부에 의해 부분적으로 재정지원을 받았다. 정부는 본 발명에 대해 특정 권리를 갖는다.

**배경 기술****[0005] 배경기술**

[0006] 간은 지방 대사에서 지배적인 역할이 있고 보통 지질 (지방)을 축적하지만, 단지 "정상 수준"까지 축적한다. 간 세포에서 과도한 지질 축적은 간 지방증을 야기하며, 이는 대사작용적으로 해로우며 감소된 베타-산화 또는 감소된 지방단백질의 분비와 같은, 여러 가지 간 기능장애가 원인이 될 수 있다. 또 다른 간의 많은 기능은 순환 내로 글루코오스를 방출하는 것이다. 건강한 개체에서, 간세포는 혈중 글루코오스 레벨을 조절하기 위해 글루코오스를 정기적으로 방출한다. 이와 대조적으로, 당뇨병을 앓는 개체에서, 간세포는 걷잡을 수 없게 글루코오스를 방출하며, 이는 혈중 글루코오스 수준을 증가시킨다. 따라서, 간의 세포 (간세포)로부터 글루코오스 방출을 감소시키는 것은 당뇨병을 조절하는데 매우 유효할 수 있다.

[0007] 간에서 과도한 지질 축적은 인슐린 저항성에 기여할 수 있고, 따라서 불량한 혈당조절에 기여할 수 있다. 지방의 조직 (지방조직)에 의해 분비되는 단백질인, 아디포넥틴(adiponectin)은 많은 방식으로 인슐린 감수성을 개선한다. 아디포넥틴은 AMPK 및 PPAR $\alpha$  경로를 활성화하기 위해 (32), 전신적 및 간 인슐린 저항성을 감소시키기 위해, 및 간 염증 및 섬유증을 약화시키기 위해 (32) 아디포넥틴 수용체 AdipoR1 및 AdipoR2를 통하여 작용한다. 아디포넥틴 KO 또는 과발현의 쥐 모델에 의해 나타나는 바와 같이, 간 지질 함유량의 강한 결정요인이다 (14, 33). 아디포넥틴은 AMPK-매개 간 지질 산화의 상향조절에 의해 간 지방증을 낮춘다 (34).

[0008] 비-알코올성 간 지방 질환 (NAFLD)는 미국에서 최대 20%까지의 성인에서 발생하고 간에서 지방의 과도한 축적 (간 지방증)을 포함한다. 비만 및 인슐린 저항성과 종종 연관된다 (1, 2). NAFLD의 유병률은 제 2형 당뇨 또는 비만을 앓는 성인에서 약 70-80% (3-5), 모든 어린이에서 3-10%, 및 비만 어린이에서 최대 40-70%까지이다 (4). NAFLD는 더 큰 전반적인 및 간-관련 사망률과 연관된다 (6, 7). 지방증에 더하여, 염증 및 섬유증이 발생할 수

있고 NAFLD가 비-알코올성 지방-간염 (NASH), 간경변, 간부전 및 간세포암종으로 발전될 수 있다. 지방증은 잠재적으로 원상회복이 가능하지만, 일단 NASH로 발전되면, 확실한 치료법은 없으며, 소수의 사용가능한 약물은 제한된 성과를 보인다 (8, 9). 따라서, 간 지방증의 시기적절한 예방 및/또는 치료가 중요하다. 하지만, NAFLD에 대해서라도, 약물요법은 미미한 성과를 가지며 (10), 음식물의 지방 섭취 및 비만을 감소시키는 것이 치료법의 중심이다 (11). 분명한 건강 혜택에도 불구하고, 식이 또는 비만에서 지속적인 개선을 성취하기 위한 생활 방식 변화의 준수가 일반적인 모집단에 대한 난제를 입증하였다.

[0009] 과도한 지방과다증 또는 고지방 (HF)-식이는 NAFLD에 대해 위험 요소이지만, 아데노바이러스 36 (Ad36)은 계속되는 HF-식이에도 불구하고 쥐에서 내장의 또는 피하의 지방과다증에서의 감소없이, 간 지방증을 약화시킨다. Ad36은 HF-식이 유도 간 지방증을 약화시키기 위해 존재하는 지방조직을 질적으로 조작하는 것으로 나타난다. Ad36에 의한 지방조직의 물질대사 질의 이 변화는 더 많은 흡수 및 감소된 지방산의 방출 및 더 많은 아디포넥틴 분비를 포함한다 (12, 13). Ad36의 이 특별한 능력은 과도한 지방과다증 또는 과도한 음식물의 지방 섭취의 부작용을 감소시킬 필요없이, 독창적으로 무효화하기 위한 주목할 만한 모델을 제공한다. 또한 약물의 티아졸리딘다이온 (TZD) 종류는 지방조직의 물질대사 질을 개선할 수 있고, 아디포넥틴을 상향조절할 수 있고, 및 간 지방증을 개선할 수 있다 (14-16). TZD의 심각한 부작용이 보고되어왔다 (17-19).

[0010] Ad36은 동물에서 질병율이나 의도하지 않은 사망률을 야기하지 않는다. 게다가, Ad36은 특히 HF-식이의 존재에서, TZD의 작용에 걸쳐 분명한 이점을 갖는 것으로 나타난다. TZD와는 다르게, Ad36은 HF-공급 쥐에서 지방과다증을 증가시키지 않는다 (20, 21). HF-식이의 존재에서, TZD는 혈당조절을 개선할 수 있지만, 이들은 동시에 간을 포함한 여러 가지 기관에 지질 저장을 촉진한다 (20, 22, 23). 지방 섭취가 감소되지 않는다면, 이것은 TZD의 범위를 제한한다. 이의 음식물-지방 및 지방과다증-독립 효과 때문에, 다수의 물질대사 경로에서 Ad36의 잠재적인 작용은 임상적으로 더욱 흥미롭고, 따라서 잠재적으로 더욱 효과적인 신규한 항-지방증 접근법을 제공할 수 있다.

[0011] 이로운 목적을 위해 바이러스의 특정한 특성을 이용하는 것은 여러 해 동안 독창적으로 이용되어왔으며, 이는 박테리오파지 바이러스의 박테리아성 특성의 용도(27), 돌연변이 아데노바이러스의 온콜리티c(oncolytic) 능력 (28), 또는 다양한 상조적인 약물과 함께, 또는 단독으로(30, 31) 암의 치료를 위한 헤르페스 심플렉스 바이러스(Herpes simplex virus) 및 여러 가지 기타 바이러스의 용도 (29)를 포함한다.

[0012] 따라서, 지방과다증 또는 음식물의 지방 섭취와는 관계없는 간 지방증을 줄이기 위한 작용제는 매우 흥미롭고 실용적인 이득일 것이다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0013] 본 발명의 요약

[0014] 본 발명은 Ad36 감염이 간 병리 및 기능장애의 감소된 발생도와 연관이 있고, Ad36 E4orf1 단백질이 유전자 발현 및 생물화학적 경로를 변경하는데 이용되어 개선된 간 기능을 야기할 수 있다는 발견에 관한 것이다.

[0015] 일반적으로 본 발명은 개체내 비-알코올성 지방간 질환의 증상을 치료하거나 예방하는 방법에 관한 것이다. 몇몇 측면에서, 상기 방법은 개체에 치료적 유효량의 아데노바이러스-36 E4orf1 단백질을 투여하는 단계를 포함하며, 개체의 증상은 상기 투여에 따라 개선된다.

[0016] 본 발명은 개체내 간에서 과도한 지방을 감소시키는 방법에 관한 것이다. 몇몇 측면에서, 상기 방법은 개체에 치료적 유효량의 아데노바이러스-36 E4orf1 단백질을 투여하는 단계를 포함하며, 간에서 지방은 상기 투여에 따라 낮아진다.

[0017] 또한 본 발명은 개체내 혈당조절을 개선하는 방법에 관한 것이다. 몇몇 측면에서, 상기 방법은 개체에 치료적 유효량의 Ad36 E4orf1 단백질을 투여하는 단계를 포함하며, 인슐린 감수성은 상기 투여에 따라 증가된다.

[0018] 또한 본 발명은 지방간 및/또는 인슐린 저항성으로 특징지어지는 간 기능장애를 치료하거나 예방하는 방법에 관한 것이다. 몇몇 측면에서, 상기 방법은 개체에 치료적 유효량의 Ad36 E4orf1 단백질을 투여하는 단계를 포함하며, 간 지방 축적은 상기 투여에 따라 개선된다. 간 지방 축적의 개선은 증가된 지질 산화 또는 간으로부터 지질의 증가된 이동에 의해 특징지어질 수 있다.

[0019] 본 발명은 NASH를 감소시키거나 예방하는 방법에 관한 것이다. 몇몇 측면에서, 상기 방법은 개체에 치료적 유효

량의 Ad36 E4orf1 단백질을 투여하는 단계를 포함하며, 간 기능장애가 원인인 고혈당증이 감소된다.

[0020] 아데노바이러스-36 E4orf1 단백질의 아미노산 서열은 서열번호:2 또는 이의 기능적 변이체가 될 수 있다. 아데노바이러스-36 E4orf1은 서열번호:1 또는 이의 기능적 변이체를 포함할 수 있다. 개체는 인간이 될 수 있다.

[0021] 아데노바이러스-36 E4orf1 단백질은 아데노바이러스-36 E4orf1 단백질의 발현을 가능하게 하는 방식으로, 개체내로 아데노바이러스-36 E4orf1 단백질을 암호화하는 핵산 분자를 도입함으로써 개체에 투여될 수 있다. 핵산 서열은 임의의 적합한 방법을 이용함으로써 도입될 수 있다. 많은 적합한 방법은 전기천공법(electroporation), DEAE 텍스트란 형질감염(DEAE Dextran transfection), 칼슘 포스페이트 형질감염(calciun phosphate transfection), 양이온성 리포좀 융합(cationic liposome fusion), 원형질체 융합(protoplast fusion), 생체내 전기장의 형성(creation of an in vivo electric field), DNA-코팅된 미사발사체 충돌(DNA-coated microprojectile bombardment), 재조합 복제-결합 바이러스의 주사(injection with recombinant replication-defective virus), 상동 재조합(homologous recombination), 생체내 유전자 치료(in vivo gene therapy), 생체외 유전자 치료(ex vivo gene therapy), 나노입자 전달(nanoparticle delivery) 바이러스 벡터(viral vector), 및 네이키드 DNA 전이(naked DNA transfer)와 같이, 해당 분야에서 관습적이다.

### 과제의 해결 수단

[0022] 상세한 설명

[0023] 개요

[0024] 본 발명은 Ad36 감염이 간 병리 및 기능장애의 감소된 발생도와 연관이 있고, Ad36 E4orf1 단백질이 유전자 발현 및 생물화학적 경로를 변경하는데 이용되어 개선된 간 기능을 야기할 수 있다는 발견에 관한 것이다. 이를 발견에 기초하여, 비-알코올성 지방간 질환(NAFLD)은 개체에 Ad36 또는 단리된 또는 재조합 Ad36 E4orf1 단백질을 투여함으로써 치료되거나 심지어 예방될 수 있다. NAFLD가 NASH로 종종 발전되고 따라서 NAFLD의 병의 과정을 치료하거나 감소시킴으로써, NASH에 대한 진행이 감소되거나 예방될 수 있다는 것이 해당 분야에서 잘 알려져 있다. 이에 따라, 본 발명은 또한 NASH를 감소시키거나 예방하기 위한 방법을 포함한다. 많은 바이러스가 심각한 간 손상을 야기하지만(25, 26), 놀랍게도 Ad36 및 Ad36 E4orf1은 다수의 물질대사 경로를 바람직하게 조절함으로써 간을 보호하며, 그렇게 함으로써 간 지방증 및 간 기능에 이로운 효과를 갖는다.

[0025] 본 명세서에서 사용된 바와 같은, "혈당조절"은 정상 범위 내에서 글루코오스 수준을 유지하기 위한 신체의 능력을 나타낸다. 혈당조절은 인슐린 감수성이 증가될 때 개선된다. 인슐린 저항성은 혈당조절에 반대효과를 갖는다.

[0026] 본 명세서에서 사용된 바와 같은, "글루코오스 흡수"는 세포가 이의 환경으로부터 흡수할 글루코오스의 양을 나타낸다. 일반적으로 근육세포 또는 지방의 세포(지방세포 및 지방전구세포)에 의한 더 높은 글루코오스 흡수량은 순환에서 글루코오스를 제거하고 고혈당증(혈중 정상 글루코오스보다 높음)을 개선하기 때문에, 이롭다.

[0027] 인간의 자연적 Ad36 감염과 더 나은 혈당조절 및 더 낮은 간 지질 사이의 관련성이 발견되었다. 이 관련성은 동물 모델에서 추가로 조사되었고, 예상치 못하게 Ad36 감염이 간 지질 수준을 낮추고 혈당조절을 개선하였다는 결과를 확인하였다. 추가적 조사는 Ad36 효과가 Ad36 E4orf1 단백질에 의해 매개된다는 것을 밝혀냈다. 본 명세서에서 설명된 바와 같이, 실시된 본 연구의 결과는 Ad36 E4orf1 단백질이 간에서 지방 산화를 증가시키고, 간으로부터 지방의 이동을 증가시키고 그리고 간으로부터 글루코오스 방출을 감소시켰다는 것을 입증한다. 따라서, 본 발명자는 바이러스 단백질인, Ad36 E4orf1이 NAFLD에서 Ad36의 보호적 효과, 및 간 기능 및 혈당조절에서 이로운 효과의 원인이 된다는 것을 발견하였다. Ad36 E4orf1 구조 및 특정 물질대사 기능은 2007년 6월 7일, 국제 공개공보 제 WO 2007/064836으로 발행된 국제 출원 제 PCT/US2006/045919에서 설명된다.

[0028] 본 명세서에서 보여준 바와 같이, Ad36의 E4orf1 단백질은 간 지방증에서 Ad36 바이러스의 보호적 효과의 매개체이다. Ad36 감염 줄이는 그들의 간에서, 심지어 감염 후 5개월에도 E4orf1 유전자를 계속 발현한다. 이를 간은 더 적은 지질 축적, 및 지질 산화와 지질 유출(expert)를 촉진하는 유전자의 더 높은 발현을 실질적으로 보여준다. 게다가, Ad36 E4orf1은 아디포넥틴을 상향조절하고, Ad36 E4orf1로 HepG2 세포(간세포주)의 형질감염은 Glut2 존재도(abundance), 및 글루코오스 방출을 하향조절한다.

[0029] 어느 한 특정 이론에 한정됨 없이, 아디포넥틴은 간 지방증의 주요 효과기이고 지방조직에 의해 분비된다는 것으로 간주된다. Ad36 E4orf1 단백질 단독의 발현은 세포에 의한 아디포넥틴 분비를 확고하게 증가시킨다. 이것은 Ad36이 아디포넥틴의 E4orf1 매개 상향조절을 통하여 간 지질 축적을 낮춘다는 것을 입증한다. 또한, Ad36

E4orf1은 Glut2 존재도, 및 글루코오스 방출을 하향조절하며, 이는 간에서 지질 축적을 줄이는데 기여할 수 있다. 따라서, Ad36은 간세포에 직접적 효과로써 및 아디포네틴을 통한 간접적 효과를 통하여 간 지방증으로부터 보호한다는 것, 및 E4orf1 단백질은 이를 효과의 매개체라는 것이 간주된다.

#### [0030] 치료적 방법

[0031] 본 발명은 NAFLD를 치료하거나 예방하기 위한, 간에서 과도한 지방을 줄이기 위한, 혈당조절을 개선하기 위한 및 간 기능장애를 치료하거나 예방하기 위한 치료적 방법을 제공한다.

[0032] 한가지 측면에서, 본 발명은 비-알코올성 지방간 질환 (NAFLD)의 증상의 치료법 및 예방법에 대한 방법을 제공한다. 치료적 유효량의 Ad36 조성물이 NAFLD를 치료하거나 예방하기 위해 이를 필요로 하는 개체 (가령, 인간 또는 기타 영장류와 같은 포유류)에 투여된다.

[0033] 한가지 측면에서, 본 발명은 NASH의 예방을 위한 방법을 제공한다. 치료적 유효량의 Ad36 조성물이 간 기능장애가 원인인 고혈당증을 감소시킴으로써 NASH를 예방하기 위해 이를 필요로 하는 개체 (가령, 인간 또는 기타 영장류와 같은 포유류)에 투여된다.

[0034] 한가지 측면에서, 본 발명은 개체 (가령, 인간 또는 기타 영장류와 같은 포유류)의 간에서 과도한 지방을 감소시키기 위한 방법을 제공한다. 치료적 유효량의 Ad36 조성물이 개체의 간에서 과도한 지방을 감소시키기 위해 이를 필요로 하는 개체에 투여된다.

[0035] 한가지 측면에서, 본 발명은 개체 (가령, 인간 또는 기타 영장류와 같은 포유류)내 혈당조절을 개선하기 위한 방법을 제공한다. 치료적 유효량의 Ad36 조성물이 개체내 혈당조절을 개선하기 위해 개선을 필요로하는 개체에 투여된다.

[0036] 한가지 측면에서, 본 발명은 지방간 및/또는 인슐린 저항성으로 특징지어지는 간 기능장애를 치료하거나 예방하기 위한 방법을 제공한다. 치료적 유효량의 Ad36 조성물이 지방간 및/또는 인슐린 저항성으로 특징지어지는 간 기능장애를 치료하거나 예방하기 위해 이를 필요로 하는 개체 (가령, 인간 또는 기타 영장류와 같은 포유류)에 투여된다.

[0037] 본 명세서에서 설명된 상기 방법 중 어느 하나의 바람직한 실시양태에서, 투여된 Ad36 조성물은 단리된 또는 재조합 Ad36 E4orf1 단백질 또는 이의 기능적 변이체이다. 본 명세서에서 설명된 상기 방법 중 어느 하나의 다른 바람직한 실시양태에서, 투여된 Ad36의 조성물은 Ad36 E4orf1 단백질 또는 이의 기능적 변이체를 인코딩하는 단리된 또는 재조합 핵산이다.

#### [0038] Ad36 조성물

[0039] 본 발명에 따라 투여된 Ad36 조성물은 다양한 형태를 가질 수 있다. 바람직하게는, 상기 조성물은 E4orf1 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다. 예를 들어, Ad36 조성물은 Ad36 바이러스 또는 약화된 변이체, 또는 가열-살균 (heat-killed)된 또는 표백-살균(bleach-killed)된 Ad36 또는 복제 결핍 재조합 Ad36과 같은 Ad36의 불활성화 형태일 수 있다. Ad36 조성물은 단리된 또는 재조합 Ad36 단백질, 바람직하게는 E4orf1 단백질 또는 이의 기능적 변이체를 포함할 수 있다. Ad36 조성물은 E4orf1 단백질 또는 이의 기능적 변이체를 인코딩하는 핵산을 포함할 수 있다. Ad36 조성물은 E4orf1 단백질의 유사체, 예를 들어 화학적 유사체 또는 구조적 유사체를 포함할 수 있다.

#### [0040] 단백질 및 펩티드

[0041] Ad36 조성물은 단리된 또는 재조합 Ad36 단백질, 바람직하게는 E4orf1 단백질 또는 이의 기능적 변이체를 포함할 수 있다.

[0042] "단리된"으로서 본 명세서에 언급된 단백질 또는 폴리펩티드는 이들이 감염된 포유류 세포에 존재하는 것이 아닌 상태로 정제된 단백질 또는 폴리펩티드이다. E4orf1 및 이의 기능적 변이체를 포함한 Ad36 단백질은 재조합 발현 및 정제, 화학적 합성 (가령, 합성 펩티드)과 같은, 잘 알려진 방법을 이용하여 또는 생물학적 및 화학적 방법의 조합에 의해 및 단리된 재조합 단백질 또는 폴리펩티드에 의해, 생성될 수 있다. 단백질은 최소한 약 50 중량%, 바람직하게는 최소한 약 75 중량%의 단리된 상태에서 그리고 더 바람직하게는, 본질적으로 순수한 형태에서 얻어질 수 있다. "재조합"으로서 본 명세서에 언급된 단백질 또는 폴리펩티드는 재조합 핵산의 발현에 의해 생성된 단백질 또는 폴리펩티드이다.

[0043] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 "Ad36 E4orf1"은 아데노바이러스 36에서 자연적으로 발생한 또는 내생의

E4orf1 단백질, 자연적으로 발생한 또는 내생의 상응 Ad36 E4orf1의 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 갖는 단백질 (가령, 재조합 단백질), 및 전술한 것 각각의 기능적 변이체 (가령, 돌연변이 유발 및/또는 재조합 기술을 통하여 생성된 기능적 단편 및/또는 돌연변이)를 나타낸다. 이에 따라, 본 명세서에서 정의된 바와 같은, 용어는 성숙 Ad36 E4orf1, 글리코실화 또는 비글리코실화 Ad36 E4orf1 단백질, 다형성 또는 대립형질 변이체, 및 Ad36 E4orf1의 기타 이소폼 (가령, 선택적 스플라이싱(alternative splicing) 또는 기타 세포 공정), 및 기능적 단편을 포함한다.

[0044] Ad36 E4orf1의 "기능적 변이체"는 기능적 단편, 기능적 돌연변이 단백질, 및/또는 기능적 융합 단백질을 포함한다. 일반적으로 본 발명에 포함된 Ad36 E4orf1의 단편 또는 부분은 성숙 Ad36 E4orf1 (N-말단, C-말단 또는 내부 결실과 같은)에 관하여 아미노산 (즉, 하나 이상의 아미노산)의 결실 (즉, 하나 이상의 결실)을 갖는 이들을 포함한다. Ad36 E4orf1에 관하여 단지 근접한 아미노산이 결실된 또는 비-근접한 아미노산이 결실된 단편 또는 부분이 또한 계획된다. 일반적으로, 본 발명에 포함된 Ad36 E4orf1의 돌연변이 또는 유도체는 하나 이상의 근접한 또는 비-근접한 아미노산 잔기의 첨가, 결실 및/또는 치환, 또는 하나 이상의 잔기가 변형된 개질된 폴리펩티드, 및 하나 이상의 변형된 잔기를 포함하는 돌연변이에 의해 달라지는 자연적 또는 인공적 변이체를 포함한다. 바람직한 돌연변이는 하나 이상의 근접한 또는 비-근접한 아미노산 잔기의 첨가, 결실 및/또는 치환에 의해 달라지는 Ad36 E4orf1의 자연적 또는 인공적 변이체이다.

[0045] Ad36 E4orf1의 "기능적 단편 또는 부분"은 간 지방증 약화, 글루코오스 처리 증진, 및/또는 혈당조절 개선과 같은 최소한 하나의 Ad36 E4orf1의 특성, 활성도 및/또는 기능 특징을 갖는 단리된 및/또는 재조합 단백질 또는 올리고펩티드를 나타낸다.

[0046] 일반적으로, Ad36 E4orf1 또는 기능적 변이체는 변이체의 길이에 걸쳐 서열번호:2 또는 서열번호:4와 최소한 약 85% 유사한, 최소한 약 90% 유사한, 최소한 약 95% 유사한, 최소한 약 96% 유사한, 최소한 약 97% 유사한, 최소한 약 98% 유사한, 또는 최소한 약 99% 유사한 아미노산 서열을 갖는다.

[0047] 몇몇 실시양태에서, 서열번호:1 또는 서열번호:3은 Ad-36 E4orf1의 정제된 단백질을 만들기 위해, 예를 들어, 현재 사용가능한 재조합 단백질 생성물을 이용하여 사용된다. 아미노산 서열 동일성은 디폴트 파라미터(default parameter)를 이용한, CLUSTAL W와 같은 적합한 아미노산 서열 배열 알고리즘을 이용하여 결정될 수 있다 (Thompson J. D. et al., Nucleic Acids Res. 22:4673-4680 (1994)).

#### 핵산 및 벡터

[0049] Ad36 조성물은 Ad36의 단백질, 바람직하게는 E4orf1 단백질 또는 이의 기능적 변이체를 암호화하는 단리된 또는 재조합 핵산 또는 벡터를 포함할 수 있다.

[0050] Ad36 E4orf1 단백질 또는 이의 기능적 변이체를 인코딩하는 서열을 갖는 단리된 및/또는 재조합 (가령, 본질적으로 순수한 것을 포함) 핵산은 원위치(*in situ*)에서 Ad36 E4orf1 생성을 야기하기 위해 투여될 수 있다. "단리된"으로서 본 명세서에서 언급된 핵산은 그들 원천지(가령, 라이브러리(library)와 같은 세포 또는 핵산의 혼합물에서 존재하는 것처럼)의 유전체 DNA 또는 세포성 RNA의 핵산을 떠나 분리된 핵산이며, 그리고 추가적 공정을 받을 수 있다. "단리된" 핵산은 본질적으로 순수한 핵산, 화학적 합성에 의해, 생물학적 및 화학적 방법의 조합에 의해 생성된 핵산 및 단리된 재조합 핵산을 포함하는, 본 명세서에서 설명된 방법, 유사한 방법 또는 기타 적절한 방법으로 얻은 핵산을 포함한다. "재조합"으로서 본 명세서에 언급된 핵산은 중합효소 연쇄 반응 (PCR) 및/또는 제한 효소를 이용하여 벡터 내로 클로닝(cloning)과 같은 인공 재조합의 방법에 의존한 절차에 의해 발생된 이들 핵산을 포함한 재조합 DNA 방법론에 의해 생성된 핵산이다. 또한 "재조합" 핵산은 자연적 메커니즘을 통해 발생된 재조합 사건이 원인이 되는 것들이지만, 바람직한 재조합 사건을 허용하고 일어나게끔 하기 위해 설계된 세포의 핵산으로 도입 후 선택된다.

[0051] 이들 기준을 만족하는 단리된 및/또는 재조합 핵산은 자연적으로 발생한 Ad36 E4orf1 및 이의 부분, 또는 자연적으로 발생한 서열의 기능적 변이체를 인코딩하는 서열과 동일한 서열을 갖는 핵산을 포함한다. 이러한 변이체는 하나 이상의 잔기의 첨가 결실 또는 치환, 하나 이상의 잔기가 변형된 개질된 핵산 (가령, DNA 또는 RNA 유사체), 및 하나 이상의 변형된 잔기를 포함한 돌연변이에 의해 달라지는 돌연변이를 포함한다. 서열은 개체에서 발현을 위해 코돈-최적화 또는 코돈 비-최적화일 수 있다.

[0052] 한가지 측면에서, Ad36 E4orf1 및 기능적 변이체는 변이체의 길이에 걸쳐 서열번호:1 또는 서열번호 3과 최소한 약 85% 유사한, 최소한 약 90% 유사한, 최소한 약 95% 유사한, 최소한 약 96% 유사한, 최소한 약 97% 유사한, 최소한 약 98% 유사한, 또는 최소한 약 99% 유사한 핵산 서열을 갖는다. 핵산 서열 동일성은 디폴트 파라미터를

이용한, CLUSTAL W와 같은 적합한 핵산 서열 배열 알고리즘을 이용하여 결정될 수 있다 (Thompson J. D. et al., Nucleic Acids Res. 22:4673-4680 (1994)).

[0053] 핵산은 DNA, RNA의 형태로 존재할 수 있으며, 단일 또는 이중 가닥 중 하나로 존재할 수 있다. 일반적으로, 핵산은 복제 개시점, 프로모터, 및 증폭자와 같은 발현 조절 서열과 작동가능하게 연결된다 (가령, Queen, et al., Immunol. Rev. 89:49-68, 1986을 참고). 바람직한 세포에서 재조합 단백질의 발현을 위한 많은 수의 적절한 벡터는 해당 분야에서 기존의 것이며 잘 알려져 있다. 적절한 벡터는 하나 이상의 다음을 포함하지만 이에 제한되지 않는 많은 수의 조성물을 포함할 수 있다: 복제 개시점; 선택적 마커 유전자; 전사 조절 요소 (가령, 프로모터, 증폭자, 종결자)와 같은 하나 이상의 발현 조절 요소, 및/또는 하나 이상의 번역 신호; 및 선택된 숙주세포에서 분비 경로를 표적하기 위한 신호서열 또는 선도서열. 바람직한 경우, 벡터는 탐지할 수 있는 마커를 포함한다.

[0054] 특정 실시양태에서, 발현 벡터는 유전자 치료에 이용된다. 발현은 벡터에서 제공되는, 및 숙주세포내 관심 유전자의 발현을 유도하는 바이러스의 및 포유류의 공급원 둘 모두에서 증폭자/프로모터와 같은 다양한 조절 요소를 포함하는 적절한 신호를 요구한다. 또한 숙주세포내 전령 RNA 안정성 및 변환성을 최적화하기 위해 설계된 요소가 알려져 있다.

[0055] 발현 벡터가 세포 내로 도입될 수 있는 많은 수의 방식이 있다. 본 발명의 특정 실시양태에서, 발현 구조체는 바이러스 또는 바이러스 유전체에서 파생된 조작된 구조체를 포함한다. 수용체-매개 엔도사이토시스 (endocytosis)를 통하여 세포로 들어가기 위한, 숙주세포 유전체 내로 통합되기 위한, 그리고 바이러스 유전자를 안정되게 및 유효하게 발현하기 위한 특정 바이러스의 능력은 이들을 포유류 세포 내로 외래 유전자의 전달을 위한 흥미로운 후보자로 만들었다 (Ridgeway, 1988; Nicolas and Rubinstein, In: *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*, Rodriguez and Denhardt, eds., Stoneham: Butterworth, pp. 494-513, 1988.; Baichwal and Sugden, Baichwal, In: *Gene Transfer*, Kucherlapati R, ed., New. York, Plenum Press, pp. 117-148, 1986. 1986; Temin, In: *Gene Transfer*, Kucherlapati, R. ed., New York, Plenum Press, pp. 149-188, 1986). 바람직한 유전자 치료 벡터는 일반적으로 바이러스 벡터이다.

#### Ad36 E4orf1 투여

[0057] 투여의 다양한 루트(route)는 비경구 (가령, 정맥내, 동맥내, 근육내, 피하 주사), 경구 (가령, 음식물), 국부, 흡입 (가령, 기관지내, 비내 또는 경구 흡입, 비내 액적), 또는 직장을 포함하지만, 이에 반드시 제한되지 않는 것으로 가능하다.

[0058] 아데노바이러스-36 E4orf1 단백질은 아데노바이러스-36 E4orf1 단백질의 발현을 가능하게 하는 방식으로, 포유류 내로 아데노바이러스-36 E4orf1 단백질을 인코딩하는 핵산 서열 도입함으로써 투여될 수 있다. 이러한 방법에서, 핵산 서열은 전기천공법, DEAE 텍스트란 형질감염, 칼슘 포스페이트 형질감염, 양이온성 리포좀 융합, 원형질체 융합, 생체내 전기장의 형성, DNA-코팅된 미사발사체 충돌, 재조합 복제-결합 바이러스의 주사, 상동 재조합, 생체내 유전자 치료, 생체외 유전자 치료, 바이러스 벡터, 및 네이키드 DNA 전이로 구성된 그룹에서 선택된 방법으로 도입될 수 있다.

[0059] 투여될 Ad36 조성물의 제제는 선택된 투여의 루트 (가령, 용액, 에멀젼(emulsion), 캡슐(capsule)) 및 치료될 개체에 따라서 달라질 것이다. 투여될 화합물을 포함하는 적절한 조성물은 생리적으로 허용가능한 비히클 (vehicle) 또는 담체로 제조될 수 있다. 용액 및 에멀젼의 경우, 적합한 담체는 식염수 및 완충액 배지를 포함한, 예를 들어, 수성 또는 알콜성/수성 용액, 에멀젼 또는 혼탁액을 포함한다. 비경구 비히클은 소듐 클로라이드 용액, 링거 텍스트로오스, 텍스트로오스와 소듐 클로라이드, 유산을 첨가한(lactated) 링거액 또는 고정유 (fixed oil)를 포함할 수 있다. 정맥내 비히클은 다양한 첨가제, 보존제, 또는 유체, 영양분 또는 전해질 보충제를 포함할 수 있다 (일반적으로, Remington's Pharmaceutical Science, 16th Edition, Mack, Ed. 1980을 참고). 흡입의 경우, 화합물은 가용화되고 투여를 위해 적합한 디스펜서 (가령, 애토마이저(atomizer), 네뷸라이저(nebulizer) 또는 가압 에어로졸 디스펜서(pressurized aerosol dispenser))내로 로딩되거나, 또는 호흡할 수 있는 건조 분말로 조제된다.

[0060] Ad36 조성물은 단일 분량 또는 다수의 분량으로 투여될 수 있다. 치료적 유효량이 투여된다. 치료적 유효량은 투여조건 하에 의도된 효과를 초래하는데 충분한 양이다. 예를 들어, 지방 산화를 증가시키고, 간 밖으로 지방의 이동을 증가시키고, 간에서 Glut2 존재도를 낮추고, 간에서 G6Pase를 감소시키고, 아디포넥틴, 및/또는 Glut4를 증진시키고, 혈당조절을 개선하고 및/또는 간 기능을 개선하는데 충분한 양이 투여될 수 있다. 적절한

용량은 해당 분야에서 알려진 방법을 이용하여 일반적인 기술의 임상의에 의해 결정될 수 있으며, 상기 용량은 개체의 연령, 약물에 대한 감수성, 내성 약물, 질환의 심각성 및 전반적인 웰빙(well-being), 그리고 기타 요인을 고려한다. 적합한 용량은 치료마다 체중 kg당 약 0.1 내지 약 10.0 mg일 수 있다.

[0061] Ad36 조성물이 투여된 개체는 치료가 효과적인지 아닌지 확인하기 위해, 예를 들어, 초음파를 이용한 비-침습성 검사를 통해 선별될 수 있다. 몇몇 측면에서, 개체는 초음파를 이용하여 선별될 것이다. 몇몇 측면에서, 개체는 간 효소를 측정하기 위해 간 기능검사를 받을 것이다.

[0062] 본 명세서에서 인용된 모든 문헌의 전체적인 교시는 참조로서 본 명세서에 편입된다.

Ad36 E4orf1 서열

[0064] Ad-36 E4 orf 1 DNA 서열 (서열번호:1)

```
ATGGCTGAATCTCTGTATGCTTCATAGATAGCCCTGGAGG
GATCGCTCCCGTCCAGGAAGGGCTAGCAATAGATATCTTCTTTG
CCCCGAATCTTCCACATTCCCTCCGCATGGGTGATATTGCTTCACCTC
AGAGTGAGCGTGCTGGTCCTACTGGATATCAGGGCAGATTATGCC
TTGAATGACTACCAGCCAGGGCATACTAACCCAGTCCGATGTGATA
TTGCCGGGAGAAGACATGATCTCTGTGCTGCTCTTAACCACACGG
ACCGATTGTATGTCCCGAGGGCCACCCAGTGGAAACCCTGCTGC
TGGAGAGAGT GATTTTCCTTCAGTGAGAATAGCCACCCCTGGTTAG
```

[0065]

[0066] Ad-36 E4 orf 1 단백질 변역 (서열번호:2)

```
MAESLYAFIDSPGGIAPVQEGASNRYIFFCPESFHIPPHGV
ILLHLRVSVLVPTGYQGRFMALNDYHARGILTQSDVIFAGRHHDSLVLF
NHTDRFLYVREGHPVGTLLEERVIFPSVRIATLV
```

[0067]

[0068] Ad-36 E4 orf 1 △PDZ DNA 서열 (서열번호:3)

```
ATGGCTGAATCTCTGTATGCTTCATAGATAGCCCTGGAGG
GATCGCTCCCGTCCAGGAAGGGCTAGCAATAGATATCTTCTTTG
CCCCGAATCTTCCACATTCCCTCCGCATGGGTGATATTGCTTCACCTC
AGAGTGAGCGTGCTGGTCCTACTGGATATCAGGGCAGATTATGCC
TTGAATGACTACCAGCCAGGGCATACTAACCCAGTCCGATGTGATA
TTGCCGGGAGAAGACATGATCTCTGTGCTGCTCTTAACCACACGG
ACCGATTGTATGTCCCGAGGGCCACCCAGTGGAAACCCTGCTGC
TGGAGAGAGT GATTTTCCTTCAGTGAGAATATAG
```

[0069]

[0070] Ad-36 E4 orf 1 △PDZ 단백질 변역 (서열번호:4)

```
MAESLYAFIDSPGGIAPVQEGASNRYIFFCPESFHIPPHGV
ILLHLRVSVLVPTGYQGRFMALNDYHARGILTQSDVIFAGRHHDSLVLF
NHTDRFLYVREGHPVGTLLEERVIFPSVRI
```

## 도면의 간단한 설명

### [0072] 도면의 간단한 설명

도 1은 음식-공급(chow-fed) 쥐에서 복막후 지방체(fat pad) 및 간의 무게를 보여주는 그래프이다.

도 2는 고지방 (HF)-공급 쥐의 체중을 보여주는 그래프이다.

도 3A는 음식-공급 쥐의 공복시 혈청 글루코오스를 보여주는 그래프이다. 도 3B는 음식-공급 쥐의 혈청 인슐린을 보여주는 그래프이다. 도 3C는 HF-공급 쥐에서 공복시 혈청 글루코오스의 변화를 보여주는 그래프이다. 도 3D는 HF-공급 쥐에서 공복시 혈청 인슐린의 변화를 보여주는 그래프이다. 도 3E는 HF-공급 쥐에서 감염 후 12주에 글루코오스 내성 검사의 결과를 보여주는 그래프이다. 도 3F는 HF-공급 쥐에서 감염 후 20주에 무공급 혈청 글루코오스를 보여주는 그래프이다.

도 4A는 HF-공급 쥐의 공복시 혈청 글루코오스를 보여주는 그래프이다. 도 4B는 감염 후 20주에 HF-공급 쥐의 무공급 혈청 글루코오스를 보여주는 그래프이다.

도 5A는 HF-공급 쥐의 골격근에서 단백질 존재도를 보여주는 웨스턴 블롯(Western blot)이다. 도 5B는 HF-공급 쥐의 지방조직에서 단백질 존재도를 보여주는 웨스턴 블롯이다. 도 5C는 HF-공급 쥐의 간에서 단백질 존재도를 보여주는 웨스턴 블롯이다.

도 6A는 C57B1/6J 쥐의 간 조직의 과요오드산-쉬프 염색(Periodic acid-Schiff stain)의 패널이다. 어두운 염색은 글리코겐을 나타내고 흰색 영역은 지질 축적을 명시한다. 음식 공급 대조군 쥐는 최소한의 지질 축적을 나타낸다. HF-공급 그룹은 더 많은 지질 축적을 나타내었다. 하지만, Ad36은 더 적은 지질 축적 및 더 많은 글리코겐에 의해 나타나는 바와 같이, HF-식이 유도 지방증을 실질적으로 약화시켰지만, Ad2는 그렇지 않았다 (HF-공급 모의 감염 대 HF-공급 Ad36 감염; p<0.02). 도 6B는 HF-공급 쥐의 간 절편의 글리코겐 함유량을 보여주는 그래프이다. 도 6C는 HF-공급 쥐의 간 절편의 지질 함유량을 보여주는 그래프이다.

도 7은 감염 후 20 주에 무공급 상태에서 죽인 HF-공급 쥐로부터의 지방조직을 이용한 웨스턴 블롯을 보여준다 (3마리 쥐/그룹). 도 7A: GAPDH는 로딩한 대조군이었다. 모의와 비교하여, 포스포-AKT, Glut 1, Glut 4 및 아디포넥틴은 Ad36 그룹에 대하여 더 커졌지만 (p<0.05), Ad2에 대해서는 그렇지 않았다. 도 7B: 모의와 비교하여, 비-감소, 비-변성 조건 하에 분석된 아디포넥틴 올리고머 각각은 Ad36에 대하여 더 커졌지만 (p<0.03), Ad2에 대해서는 그렇지 않았다.

도 8은 HF-공급 쥐의 간 단백질을 이용한 웨스턴 블롯을 보여준다. 모의와 비교하여, Ad36에 대하여 p-AMPK는 더 커지고, Glut2 및 G6pase는 더 낮았지만 (p<0.05), Ad2에 대해서는 그렇지 않았다.

도 9A 및 9B는 음식-공급 쥐에서 기선 (0주) 및 감염 후 최대 12 주까지 공복시 혈중 글루코오스 (A) 및 공복시 혈청 인슐린 (B)을 보여주는 그래프이다. \*p<0.05 대 모의.

도 10A-D는 HF 식이 상에서 쥐의 감염 후 Ad36, Ad2 또는 모의 그룹에서 혈청 글루코오스 및 인슐린 시간 경과를 보여주는 그래프이다. (A) 4 및 8 주: 기선에 조정된 공복시 혈청 글루코오스 (0주). (B): 12주: 2.5 mg/g 체중 후 복강내(i.p.) 글루코오스 내성 검사. (C): 20주: 무공급 글루코오스. (D): 0주에서부터 공복시 인슐린의 변화. 각 연구의 모의와 비교하여, \*p<0.05 또는 더 작음.

도 11A-C는 E4orf1 발현이 3T3-L1 (A) 지방전구세포, (B) 지방세포 및 (C) C2C12 근아세포에서 기초 2DG 글루코오스 흡수를 실질적으로 증가시켰다는 것을 보여주는 그래프이다. 도 11D는 E4orf1 발현이 기초 그리고 인슐린 자극 조건 하에 HepG2 세포에 의한 글루코오스 산출량을 실질적으로 감소시켰다는 것을 보여주는 그래프이다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

### [0073] 예시

본 명세서에 개시된 연구의 결과는 인간에서 Ad36 감염과 더 낮은 간 지질 수준 및 더 나은 혈당조절 사이에 연관성이 있다는 것을 밝혀냈다. 또한 상기 결과는 Ad36 E4orf1 단백질이 Ad36 바이러스의 보호 효과의 매개자이며 상기 효과는 아디포넥틴 및 Glut2 존재도를 포함하여 여러 가지 유전자의 발현을 변경하는 것을 통해 매개되기 쉽다는 것을 입증한다. 따라서, 본 명세서에 개시된 이들 연구는 Ad36, Ad36 E4orf1, 및 이의 기능적 변이체가 NAFLD를 치료하거나 예방하고, 포유류의 간에서 과도한 지방을 감소시키고, 혈당조절을 개선하고, 그리고 간

기능장애를 치료하거나 예방하는데 이용될 수 있다는 것을 보여준다.

[0075] a. 기술 및 분석:

[0076] 바이러스 제조: Ad-36은 앞서 설명된 및 이용된 바와 같은 A549 세포 (인간 폐암 세포주)에서 정제된 및 번식된 아메리칸 타입 컬쳐 컬렉션(American Type Culture collection) (ATCC Cat# VR913) 플라크에서 얻어졌다 (45, 44). 또한 Ad-2는 ATCC (Cat #VR846)에서 얻어졌으며 A549 세포에서 번식되었다. 바이러스 역가는 플라크 분석 (45) 및 플라크 형성 단위 (PFU)로서 발현된 접종에 의해 측정되었다.

[0077] b. 생물학적 분석:

[0078] 글루코오스: 각 쥐에서의 2 μL의 혈청이 Raichem 글루코오스 옥시다아제 방법 (R80038)을 이용하여 96-웰 플레이트 포맷에서 측정되었다. 흡광도는 500nm에서 판독되었다. 인슐린: 초고감도 쥐 인슐린 ELISA 키트 (Crystal Chem, # 90090)가 인슐린을 측정하는데 이용되었다. 트리글리세라이드는 카디오체크 리피드 패널 검사 스트립 (Cardiocheck Lipid panel test strip)을 이용하여 측정되었다.

[0079] qRT-PCR: mRNA는 제조자의 지시에 따라 RNeasy 미니 키트(RNeasy Mini kit) (Qiagen, # 74101)를 이용하여 고-지방 공급 쥐의 지방조직에서 추출되었다. 잔여 DNA는 앰플리케이션 그레이드 테옥시리보뉴클레아제 I(Amplification grade Deoxyribonuclease I) (Invitrogen, # 18068-015)를 이용함으로써 제거되었다. 1 μg의 전체 RNA는 제조자의 프로토콜에 따라 iScriptTM cDNA 합성 키트 (BioRad, # 170-8890)를 이용하여 cDNA로 역전사되었다. PCR 코어 시스템 II(PCR core system II) (Promega, # M7665)의 cDNA의 증폭을 위해 이용되었다. GAPDH (글리세르알데하이드 3 포스페이트 디하이드로게나아제; Applied Biosystems, # Mm99999915\_g1)와 비교하여 정량적 RT-PCR은 유전자 TNF α (종양因子인자 알파, Applied Biosystems, # Mm00443259\_g1), 레스틴 (Resistin) (Applied Biosystems, # Mm00445641\_m1), MCP-1(대식세포 주화성 단백질; Applied Biosystems, # Mm00441243\_g1) CD68 (Applied Biosystems, # Mm03047343\_m1), TLR4 (탈 유사 수용체 4; Applied Biosystems, # Mm00445274\_m1), MCSF (대식세포 접락 자극인자; Applied Biosystems # Mm00432688\_m1), 및 IL6 (인터루킨 6; Applied Biosystems, # Mm00446191\_m1)의 상대적인 발현 수준을 검사하기 위해 수행되었다. 평균은 T-테스트에 의해 비교되었다. 유의성은 p<0.05에서 설정되었다.

[0080] c. 감염 확인:

[0081] 항체 역가:

[0082] 혈청내 중화항체의 존재는 '불변 바이러스-감소 혈청(constant virus-decreasing serum)' 방법 - 세부사항 (92)에서 설명된 바와 같이 항체를 중화시키는 것을 확인하기 위한 민감한, 특이적 및 금 표준 분석에 의해 확인되었다. 간단히, 열 불활성 검사 혈청은 96-웰 플레이트에서 1:2 내지 1:512로 연속으로 희석 (2배)되었다. 100 TCID-50 (조직 배양 감염도 분량 50) 전체의 각 아데노바이러스 작용 스톡(work stock)은 웰 각각에 첨가되었고, 그 다음 37 °C에서 1시간의 인큐베이션(incubation) 후 A549 세포가 첨가되었다. 각 검사 혈청은 중복으로 이루어졌다. 혈청 대조군 (혈청 및 세포, 하지만 바이러스는 없음), 세포 대조군(세포 단독, 바이러스 없음, 혈청 없음), 및 바이러스 대조군 (세포 및 바이러스, 혈청 없음)이 각 분석에 포함되었다. 플레이트는 13일 동안 37 °C에서 인큐베이션되었고 CPE (세포병변 효과)의 존재가 주목되었다. 1:8 또는 그 이상의 희석에서 CPE가 없는 혈청 샘플은 각 바이러스에 대한 중화항체의 존재에 대하여 양성인 것으로 그리고 그 바이러스로의 사전 감염의 증거로 간주되었다. 1:8보다 낮은 역가를 가진 샘플은 바이러스 항체의 존재에 대하여 음성인 것으로 간주되었다. 바이러스 역적정이 질적 검사로서 각 분석으로 실시되었다.

[0083] 바이러스 DNA 및 RNA에 대한 선별:

[0084] DNA 단리: DNA는 QIAMP DNA 미니 키트 (# 51306)를 이용하여 단리되었다. 프라이머는 Ad36, Ad2의 E4 유전자에 대하여 그리고 또한 쥐 β-액틴에 대하여 설계되었다. DNA는 PCR에 의해 증폭되었다. 프라이머 서열은 다음과 같다:

[0085] Ad36 정방향 프라이머: 5'-GGCATACTAACCGAGTCCGATG-3',

[0086] Ad36 역방향 프라이머: 5'-TCACTCTCAGCAGCAGCAGG-3';

[0087] Ad2 정방향 프라이머: 5'-CCTAGGCAGGAGGGTTTC-3',

[0088] Ad2 역방향 프라이머: 5'-ATAGCCCAGGGAAATACATA-3',

- [0089] 쥐  $\beta$ -액틴 정방향 프라이머: 5'-GATCTTCATGGTGCTAGGAG-3',
- [0090] 쥐  $\beta$ -액틴 역방향 프라이머: 5'-ACGTTGACATCCGTAAAGAC-3'.
- [0091] 음성 PCR 대조군: 물. 양성 PCR 대조군: Ad36 또는 Ad2 감염된 A549 세포로부터의 DNA. DNA는 95°C에서 2분 동안 변성되었고 35 회전의 PCR 대상이 되었다 (1분 동안 94°C, 1분 동안 55°C, 2분 동안 72°C 그 다음 5분 동안 72°C에서 인큐베이션). RNA는 제조자의 지시에 따라 RNeasy 미니 키트(RNeasy Mini kit) (Qiagen, # 74101)를 이용하여 추출되었다. 잔여 DNA는 앤플리케이션 그레이드 데옥시리보뉴클레아제 I(Amplification grade Deoxyribonuclease I) (Invitrogen, # 18068-015)를 이용함으로써 제거되었다. 1  $\mu$ g의 전체 RNA는 제조자의 프로토콜에 따라 iscriptTM cDNA 합성 키트 (BioRad, #170-8890)를 이용하여 cDNA로 역전사되었다. PCR 코어 시스템 II(PCR core system II) (Promega, # M7665)이 cDNA의 증폭을 위해 이용되었다.
- [0092] d. 글루코오스 내성 검사:
- [0093] 16시간 단식 후에, 의식이 있는 쥐는 D-글루코오스 (체중의 2.5 mg/g)로 복강내 주사되었다. 혈액이 글루코오스 주사 전 (시간 0) 및 주사 후 10, 20, 30, 60, 120 및 150분에 꼬리 정맥으로부터 수집되었다. 혈중 글루코오스는 글루코미터(glucometer)를 이용하여 측정되었다 (Contour, Bayer).
- [0094] e. 웨스턴 블롯 분석:
- [0095] 면역침강법: IR, IRS1 및 IRS2의 면역침강법을 위해, 조직 샘플이 50mM HEPES (pH 7.4), 2mM 소듐 오쏘바나데이트, 10 mM 소듐 플로라이드, 2 mM EDTA, 1% NP-40, 0.25% 소듐 데옥시콜레이트 및 프로테아제 억제제를 함유한 완충액에서 균질화되었다. 이후 균질화물 (250  $\mu$ g)은 3  $\mu$ g의 일차 항체로 면역침강되었다. 샘플은 4-20% 구배 겔을 이용하여 SDS-PAGE로 처리되었고 PVDF 막으로 이동되었다. 상기 막은 항-포스포 항체로 면역블로팅되었다. 인산화-tyr-1322-IR- $\beta$  (Millipore, # 04-300) 및 전체 IR- $\beta$  수용체 (Millipore, # 05-1104), 전체 IRS1 (SantaCruz, # Sc-559) 및 pIRS1-(tyr-989) (SantaCruz, # Sc-17200), pIRS1-(ser307) (Cell signaling, # 2381), (Millipore, # 06-506)으로부터의 IRS2 및 (SantaCruz, # Sc-17195-R)로부터의 p-IRS2 (tyr-612)에 대한 항체가 이용되었다.
- [0096] 웨스턴 블롯: 단백질 농도는 바이신코니닉 산(bicinchoninic acid) 분석에 의해 수량화되었고 4-20%까지 또는 동일한 양으로 폴리아크릴아마이드 겔에 로딩되었다. 이후 단백질은 PVDB 막으로 이동되었다. 막은 3% BSA를 함유한 PBS 트윈-20로 차단되었고 전체 AKT (Cell signaling, # 4691), p-AKT(ser-473) (Cell signaling, # 9271), Ras (Cell signaling, # 3965), Glut1 (Abcam, # 35826), Glut4 (Abcam, # 14683), Glut2 (SantaCruz, # 9117), 글루코오스 6-포스파타아제 (SantaCruz, # 7291), 전체 AMPK  $\alpha$  (Cell signaling, # 2603), p-AMPK  $\alpha$  (Thr-172) (Cell signaling, # 2535) 및 렙틴 (Abcam, # 2095) 항체 각각을 인식하는 다클론 또는 단일클론 항체와 함께 인큐베이션되었다. 겨자무과산화수소와 이차항체가 접합된 다음에, 증대된 화학발광에 의해 신호가 탐지되었다. 특정 밴드는 AlphaEaseFC 분석기 소프트웨어를 이용하여 밀도계측을 스캔닝(scanning)하여 수량화되었고, 동일한 로딩이 GAPDH (Ambion, # 4300) 존재도에 대한 정규화에 의해 평가되었다.
- [0097] 아디포넥틴의 상이한 올리고머 형태의 분석: 지방조직에서 단리된 30  $\mu$ g의 단백질은 DTT,  $\beta$ -мер캅토에탄올 없이 5X 비-감소 완충액으로 처리되었고 상온에서 1시간 동안 인큐베이션되었다. 샘플은 4-20% 트리스-글리신 SDS-PAGE 겔로 검사되었고 PVDF 막으로 이동되었다. 웨스턴 블로팅은 아디포넥틴의 항구상 도메인(antiglobular domain) 항체를 이용하여 수행되었다 (Millipore, # MAB3608, Temecula, CA).
- [0098] f. 조직화학:
- [0099] Ad36, Ad2, 및 모의 감염 고지방 공급 쥐에서 3마리 쥐 각각 및 보고된 바와 같은 대조군으로서 한 마리의 모의 감염 음식 공급 쥐의 급속 냉동 간 샘플에 글리코겐 염색이 수행되었다 (41). 조직 샘플은 OCT 봉입제에 임베딩(embedding)되었고 8um 두께로 잘라졌다. 글리코겐은 과요오드산-쉬프 염색 (PAS)을 이용하여 염색되었다. 간 샘플은 글리코겐 보존을 증진시키고 및 카르누아 고정액(6부의 에탄올, 3부의 클로로폼, 및 1부의 빙초산)에서 인공물의 유동을 방지하는 것을 돋기위해 4°C에서 10분 동안 고정되었다. 고정하자마자, 절편은 여러 가지 린스가 들어있는 중류수로 세척되었고 이후 상온에서 5분 동안 1% 과요오드산 용액에서 인큐베이션되었다. 중류수로 세척 후, 쉬프 시약이 첨가되었고 11분 동안 인큐베이션되었다. 모든 슬라이드는 10분 동안 흐르는 찬 수돗물에 행궈졌다. 슬라이드는 공기 건조되었고 투과물질을 이용하여 커버 슬립(cover slip)이 적용되었다. 글리코겐 염색은 절편에 마젠타색을 나타내며, 더 어두운 염색은 더 많은 글리코겐을 명시한다.
- [0100] 지질은 고정 중에 샘플을 떠나고, 따라서 슬라이드 상의 흰색의 비어있는 영역은 지질체(lipid droplet)를 명시

한다 (96). 이미지는 Zeiss Axioskop 40 FL로 만들어졌다. 샘플당 3개의 표본 및 표본당 3개의 이미지는 글리코겐 및 지질의 정량화를 위해 이미지 J(Image J)를 이용하여 분석되었다. 이미지는 8비트로 전환되었고, 글리코겐 특정 염색만이 가시적인 경우 한계값이 측정되었고 글리코겐의 양은 이 한계값에서 픽셀 2로 계산되었다. 보고된 바와 같은 지질 정량화를 위한 비어있는 공간의 면적을 얻기 위해 이 수는 전체 면적에서 뺄셈되었다 (96).

#### [0101] 실시예 1

#### [0102] Ad36 및 인간

4개의 집단으로부터의 혈청 샘플을 과거 감염의 지표로서 Ad36 항체에 대해 선별하였다. 상기 집단은 다음과 같다: A) HERITAGE 가족 연구 (49) ( $n=671$ , 백인 및 흑인 남성 및 여성), B) PBRC (Pennington Biomedical Research Center) 연구 (206명의 백인 및 흑인 남성 및 여성), C) MET 연구 (50, 51) ( $n=45$  사춘기 전의 백인 및 흑인 소년 및 소녀), D) VIVA LA FAMILIA 연구 (52) (585명의 히스페닉 소년 및 소녀). Ad36 항체의 보급율은 HERITAGE, PBRC, MET 및 Viva La Familia 연구에서 각각, 13%, 18%, 22% 및 7%였다. 더 나은 혈당조절 (인슐린 감수성 또는 배치지수를 포함한)의 다양한 측정은 이들 집단에서, 연령, 성별, 인종 및 지방과다증과 관계없이, Ad36 감염과 유의적으로 연관되었다 (가령, 표 1 및 2는 PBRC 및 MET 집단을 보여준다). 중요하게는, 더 나은 혈당조절과의 Ad36의 연관성은 1,500명 이상 개체의 다양한 연령대 그룹 및 인종의 이들 집단에 걸쳐 현저하게 일관성 있었다. 이들 데이터는 Ad36 감염이 인간에서 혈당조절을 개선할 수 있다는 것을 제시하였다.

**표 1**

	Ad36-	Ad36+
N=206	N=169	N=37
공복시 글루코오스 (mg/dL)	96.9 (92.6, 101.3)	92.3* (87.1, 97.6)
공복시 인슐린 ( $\mu$ U/ml)	11.6 (9.6, 14.0)	9.4* (7.1, 12.4)
HOMA IR	2.7 (2.2, 3.3)	2.1* (1.6, 2.8)
간 밀도** (HU)	10.7 (8.5, 13.4)	13.0* (9.9, 17.2)

표1: PBRC 연구 ( $n=206$ ; 흑인/백인/기타 74/118/14) 연령, 성별, 인종 및 체지방 질량에 대해 조정된, 평균 (95% CI). \* $p<0.05$  또는 더 높음. \*\*비장 밀도에 대해 정규화됨. 더 높은 HU 값은 더 낮은 지질 함량과 동일 시한다.

**표 2**

	Ad36-	Ad36+
N=45	N=35	N=10
공복시 글루코오스 (mg/dL)	74.5 (71.6-77.4)	68.7* (62.9-74.6)
공복시 인슐린 ( $\mu$ U/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)
간내 지질(% 물 피크)	0.005 (0.002-0.006)	0.003* (0.004-0.008)

표 2: MET 연구, 사춘기 전의 소년 및 소녀 ( $n=45$ ; 흑인/백인/기타; 10/32/3). 성별 및 체지방 질량에 대해 조정된 평균<sup>a</sup> (95%CI). 글루코오스에 대한 <sup>a</sup>산술 평균; 인슐린 HOMA-IR 및 간내 지질에 대한 기하평균.

#### [0108] 실시예 2

#### [0109] Ad36은 음식-공급 쥐에서 인슐린 감수성을 개선한다

연령, 무게, 및 체지방 대응 암컷 C57BL/6J 쥐는 Ad36 또는 Ad2로 모의 감염 또는 감염시켰고 표준 음식 식이요법으로 유지하였다. The Jackson Laboratory (Bar Harbour, Maine, USA)로부터 4주령 암컷 C57B6/6J 쥐를 구입하였다. 1주일의 순화 후, 전체 체지방을 Bruker Minispec mq10 NMR (Nuclear Magnetic Resonance) 분석기로 측정하였다. 체중 및 체지방에 대응하여 쥐를 3개의 그룹으로 나누었고 비내, 경구 및 복강내로 Ad36 ( $n=3$ ) 또는 Ad2의 107PFU로 접종 (대조군으로서 흔한 인간 아데노바이러스를 이용함;  $n=4$ )시키거나 조직 배양 배지에 모의 감염시켰다 ( $n=6$ ). 25 °C에서 12시간 명암 주기에 쥐를 두었고 한 공간내 생물학적 안정성 레벨 2 봉쇄하에 미세-분리기 우리에 수용하였으며 그리고 물과 설치류 음식에 무제한 접근하도록 하였다 (Purina LabDiet

5001).

[0111] 3개 그룹의 쥐는 12주 실험 동안에 전체 체중에서 상이함을 보여주지 않았다.

[0112] 아데노바이러스에 대한 중화항체, 및/또는 DNA에 대한 PCR 분석 및/또는 다양한 쥐 조직에서의 mRNA에서 모의 감염 또는 예상된 바이러스에 의한 감염을 확인하였다 (표3). 감염에 앞서 기선에서 3 그룹의 모든 쥐 사이의 비교할 만한 공복시 혈청 글루코오스 및 인슐린 수준에도 불구하고, 이들 수준은 실험 경과에 걸쳐 단지 Ad36-감염 쥐에서만 점진적으로 감소되었다 (도 1A 및 B). 더욱이, 감염 후 12주 (pi), Ad36-감염 쥐의 복막후 지방체 및 간의 질량은 모의 감염 쥐보다, 각각 2배 더 높아졌거나 ( $p<0.03$ ) 또는 10% 더 낮아졌다 ( $p<0.04$ ) (표 4, 도 1). 따라서, 표준 음식-공급 쥐에서, Ad36 감염은 공복시 글루코오스 및 인슐린 수준을 감소시킴으로써 전신적인 혈당조절을 개선하였지만 Ad2 감염은 그렇지 않았다.

### 표 3

바이러스 항체, 바이러스 DNA 및 RNA를 보여주는 쥐의 백분율.

그룹	항체 Ad36 / Ad2	바이러스 DNA / 바이러스 RNA			
		간	지방조직	폐	신장
<b>실험 2: 음식-공급 쥐</b>					
모의		0/0		0/0	
		100 / 100		100 / 100	
		100 / 100		100 / 100	
<b>실험 3: 고지방 식이 중인 쥐</b>					
모의	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / NA	0 / NA
Ad36	100 / 0	60 / 60	70 / 40	50 / NA	10 / NA
Ad2	0 / 40	0 / 0	0 / 0	100 / NA	50 / NA

[0114] NA: 이들 샘플에서 측정된 바이러스 RNA

### 표 4

음식-공급 쥐의 기선 및 최종 특성. 평균±SE.

	모의	Ad36	Ad2	p
N	6	3	4	
체중 (g) - 0주	16.3±1.1	16.9±0.21	16.2±0.44	NS
체지방 (g) 0주	2.1±0.2	2.3±0.2	2.0±0.1	
체중 (g) 12주	22.3±0.8	23.8±1.7	22.5±1.5	NS
복막후 지방 (g) 12주	0.18±0.06	0.37±0.15*	0.25±0.13	* p<0.05 대 모의
간 (g)	1.00±0.09	0.9±0.1*	0.99±0.21	* p<0.05 대 모의

[0116] 일주일에 한번 체중을 측정하였고, 4시간 동안 단식한 마취시킨 쥐의 안와내 안구후의 부비강으로부터 혈액 샘플을 얻었다. 감염 후 12주에 쥐를 죽였다. 대동맥 피를 수집하였고 혈청을 분리하였다. 간, 복막후 지방 데포 (depot)을 조심스럽게 분리하고, 무게를 재고, 그리고 액체 질소에서 급속 냉동하였고 그리고 사용할 때까지 -80°C에서 저장하였다. 글루코오스 및 인슐린을 측정하는데 혈청을 이용하였다.

[0117] 체중, 간, 지방체 무게, 및 글루코오스와 인슐린 수준에서의 상이함을 스튜던트 't' 검정(student's 't' test)으로 분석하였다. 개연성 수준을  $p<0.05$ 에서 설정하였다.

### 실시예 3

[0119] Ad36은 고지방 공급 쥐에서 고혈당증을 개선한다

[0120] 쥐에서 Ad36이 유사한 효과를 갖는지 갖지 않는지 조사한 이 실험은 고지방 (HF, 60Kcal%) 식이로 당뇨병을 만들었으며, 이는 식이-유도 고혈당증을 야기한다.

[0121] 앞서 8주 동안 HF 식이를 공급한 연령, 무게, 및 체지방 대응 수컷 C57BL/6J 쥐 (14주령)를 높은 공복시 혈청 글루코오스 수준 (>200mg/dL)에 의해 입증된 바와 같은 당뇨병 상태로 발전시켰다. 이 시점에서, 쥐를 모의 감염시키거나 Ad36, 또는 Ad2에 감염시켰다. Pi 20주까지, 모든 3개 그룹은 유사한 점진적인 음식물 섭취, 그리고

전체 체중 및 지방체 무게를 나타내었다 (표 5, 도 2). The Jackson Laboratory (Bar Harbour, Maine, USA)로부터 14주령 수컷 C57B6/6J 쥐를 구입하였으며, 상기 쥐는 6주령 때부터 시작하여 고지방 (60% kcal) 식이가 공급된 쥐이다 (Research Diets Inc. D12492i). 1주일 순화하자마자, 체지방 기선을 NMR로 측정하였고 쥐를 체지방 및 체중에 대응하여 3개의 그룹 (n= 그룹당 10마리)으로 나누었다. 상기 그룹을 비내, 복강내 및 경구로 Ad36 (0.6x106PFU), Ad2 (3x106 PFU)에 감염시키거나 모의 감염시켰고, 그리고 20주 동안 더 고지방 식이 (60% kcal)를 지속시켰다. 25 °C에서 12시간 명암 주기에 쥐를 두었고 한 공간내 생물학적 안정성 레벨 2 봉쇄하에 미세-분리기 우리에 개별적으로 수용하였다. 16주 동안 일주일에 한번씩 음식물 소실 및 체중을 측정하였고, 마취시킨 쥐의 안와내 안구후의 부비강으로부터 혈액 샘플을 얻었다. 4시간 동안 음식물을 제거한 후 공복시 샘플을 수집하였다. 접종 후 20주에 무공급 상태에서 쥐를 죽였다. 대동맥 피를 수집하였고 혈청을 분리하였다. 간, 부정소, 복막후 지방 데포를 조심스럽게 분리하고, 무게를 재고, 그리고 액체 질소에서 급속 냉동하였고 그리고 사용할 때까지 -80°C에서 저장하였다.

[0122] 감염 후 20주 기간에 걸쳐, 공복시 글루코오스 및 인슐린을 측정함으로써, 글루코오스 내성 검사 그리고 또한 무공급 상태에서 글루코오스 수준을 측정함으로써, 다양한 방식으로 혈당조절을 평가하였다. 예상한 바와 같이, HF 식이-유도 인슐린 저항성 때문에, 모의-감염 쥐는 공복시 혈청 글루코오스 및 인슐린 수준에서 증가를 보였지만, 이들 증가는 Ad36 감염 쥐에서 각각 pi 8주 또는 pi 4주에 약화되었다 (도 3C 및D 그리고 4A). 또한 Ad36-감염 쥐는 pi 12주에 복강내 글루코오스 내성 검사 (ipGTT)에 대하여 더 빠른 혈중 글루코오스 클리어런스 (clearance) (도 3E) 및 pi 20주에 더 낮은 무공급 혈청 글루코오스 수준을 유의적으로 보여주었다 (도 3F 및 4B). 사실상, 감염 후 20주에, 모든 Ad36-감염 쥐의 무공급 혈청 글루코오스 수준은 모의-감염 쥐에서 측정된 상기 수준의 더 낮은 50번째 백분위수에 있었다 (도 4B) (카이(chi) 검사 p=0.01). 이 실험에서 Ad2 대 Ad36에 대해 사용된 5배 더 높아진 분량에도 불구하고, Ad2-감염쥐는 모의-감염 대조군 쥐와 비교하여 유의적으로 개선된 이상혈당증을 보이는 것을 여전히 실패하였다. 그러므로, Ad36 감염은 단식 및 공급 둘 모두의 조건 하에 당뇨병 쥐에서의 혈당 반응을 비슷하게 특이적으로 개선한다.

### 표 5

HF-공급 쥐의 기선 및 최종 특성. 평균±SE.

	모의	Ad36	Ad2	p
N	10	10	10	
체중 (g) 0주	36.2±0.9	36.1±1.1	37.3±1.0	NS
체중 (g) 20주	51.5±0.8	48.3±2.1	50.7±1.2	NS
점진적인 음식물 섭취 (g) (감염 후 16주 동안 측정됨)	186±9.2	186±13.3	184±13.7	
전체 체지방 (g) 0주	10.5±0.8	10.7±0.7	11.5±1.0	NS
체지방 (g) 20주				
부정소	1.4±0.05	1.4±0.1	1.5±0.2	NS
복막후	0.5±0.02	0.5±0.05	0.5±0.03	NS
간 (g)	2.7±0.1	2.3±0.1*	2.4±0.2	* p<0.05 대 모의
혈청 트리글리세라이드(mg/dL)				
주0				
주 8	71.6±1.7	71.2±0.9	71.5±1.2	*p<0.05 대 Ad36의 0주
	70.4±2.1	68.3±1.2*	69.3±1.0	

[0124] 실시예 2에서의 쥐로 수행된 웨스턴 블로트 (WB) 분석은 시험관내 데이터 (76, 12)를 참조하면, 감염 후 20주에 모의 감염 쥐와 비교하여, Ras 및 포스포-Akt의 더 높은 존재도에 의해 나타나는 바와 같이, Ad36이 골격근, 지방조직, 및 간에서 Ras-PI3K 경로를 상향조절하였음을 나타냈다 (도 5). Ad36-감염된 쥐에 대하여, 골격근 및 지방조직에서 더 높은 Glut4 및 Glut1 단백질 존재도는 Ad36이 이들 조직에서 글루코오스 흡수를 증가시키는 메커니즘을 제시하였지만, 간에서 더 낮은 Glut2 존재도 및 글루코오스-6-포스파타아제 (G6Pase)는 Ad36이 간 글루코오스 방출을 감소시킨다는 것을 제시하였으며 (도 5C), 이는 결과적으로 더 나은 혈당조절에 기여할 수 있다. 예상한 바와 같이, HF 식이-공급 쥐의 간 절편은 표준 음식-공급 쥐에서 보인 것 보다 더 적은 글리코겐 및 더 많은 지질을 보여주었다 (도 6A). 하지만, HF 식이-공급 쥐 중에서, Ad36-감염 쥐의 간은 모의-감염 쥐와 비교하여 증가된 글리코겐 및 더 낮은 지질 함량에 의해 입증된 바와 같이, HF 식이의 병의 영향으로

부터 더 높은 보호를 보여주었다 (도 6A-C) ( $p<0.02$ ). HF 식이-유도 간 병리에서 Ad36에 의해 매개된 보호 효과는 인간 데이터와 일관되며, 상기 데이터는 Ad36에 감염된 성인 및 사춘기 전의 청년 들 모두에서 더 적은 간지질 축적을 보여준다. 따라서, 본 명세서에 나타난 결과는 Ad36이 골격근 및 지방조직에 의한 글루코오스 흡수를 증가시키고 간에 의한 글루코오스 방출은 감소시키며, 따라서 동물에서 전신적인 혈당조절을 유의적으로 개선하는 모델을 뒷받침한다.

[0125] 음식물 섭취, 체중, 간, 지방체 무게, 및 글루코오스와 인슐린 수준에서의 상이함을 스튜던트 't'검정으로 분석하였다. 개연성 수준을  $p<0.05$ 에서 설정하였다.

#### 실시예 4:

##### Ad36은 지방조직의 물질대사 프로파일의 마커를 개선한다

[0128] 상기 설명된 바와 같이, 감염 후 20주 무공급 상태에서 죽인 HF-공급 쥐로부터의 지방조직을 이용하여 웨스턴 블로트를 실시하였다 (3마리 쥐/그룹). GAPDH를 로딩 대조군으로서 이용하였다. Ad36은 더 많은 AKT 인산화 및 Glut4 및 Glut 1의 더 높은 존재도에 의해 나타나는 바와 같이 PI3K 경로, 및 다운스트림 글루코오스 흡수를 상향조절하는 것으로 나타난다. 감염에 대하여, Ad2에서 지방조직은 모의 그룹과 비교하여, 더 많은 대식세포 침윤이 있었지만 ( $p<0.05$ ) Ad36 그룹에서는 그렇지 않았다. 중요하게는, Ad36 그룹은 아디포넥틴의 상당하게 더 높은 존재도 (도 4A), 주요 인슐린 중감제 및 글루코오스 흡수의 프로모터 (53) 및 간 지방증 (54)에 대항하는 보호체 (55)를 가졌다. 아디포넥틴은 더 높은 분자량(MW) 형태가 인슐린 감수성과 가장 강하게 연결됨에도 불구하고, 더 높게, 중간의, 및 더 낮은 분자량 (MV) 형태로 존재한다 (56, 57). Ad36은 HF식이-공급 쥐의 지방조직에서 모든 형태의 아디포넥틴 수준을 유의적으로 증가시켰다 (도 7B). Ad36에 감염된 인간 지방조직 외식편에서 이의 유의적으로 더 높은 mRNA 및 단백질 존재도를 포함하여, Ad36에 의한 아디포넥틴의 상향조절을 지속적으로 관찰하였다 (12). 이들 변화는 Ad36이 지방조직의 물질대사 질을 개선한다는 것을 총괄적으로 명시한다. 아디포넥틴의 강한 간 효과를 고려하여 (54, 55), 아디포넥틴은 Ad36의 항-지방증 효과의 주요 매개자라는 것으로 간주된다.

#### 실시예 5:

##### Ad36은 지방증을 약화시키고 간에서 물질대사 프로파일을 개선한다

[0130] HF-식이 공급 쥐의 간 절편은 표준 음식-공급 쥐에서 나타난 것보다 더 적은 글리코겐 및 더 많은 지질을 나타내었다 (도 6A). 하지만 HF 식이-공급 쥐 중에서, Ad36-감염 쥐의 간은 모의 그룹과 비교하여 증가된 글리코겐 및 더 낮은 지질 함량에 의해 입증된 바와 같이, HF 식이의 부작용으로부터 더 높은 보호를 보여주었다 (도 6A) ( $p<0.02$ ). Ad36 그룹의 간에서 더 낮은 Glut2 존재도 및 글루코오스-6-포스파타아제 (G6Pase) (도 8)는 간 글루코오스 방출을 감소시켰다는 것을 제시하였으며, 이는 결과적으로 더 나은 혈당 조절에 기여할 수 있다. Ad36의 간은 지방증에 대항하여 간을 보호하기 위해 아디포넥틴의 알려진 표적인, 더 많은 AMPK-인산화를 보여주었지만, Ad2 그룹은 그렇지 않았다 (54).

[0132] 간 mRNA: 음식 공급 (도 9) 또는 HF-공급 쥐 (도 10)의 간에서 선택된 유전자의 발현을 검사하였다. 또한 이들 분자가 다수의 경로에서 중복된 역할을 수행함에도 불구하고, FAS (지방산 합성효소), SREBP1c (스테롤 반응 요소 결합 단백질 1c) 및 지질생성의 조절체로서 FOXO1 (포크헤드 박스01) (58), CPT1 (카르니틴 아실 트랜스퍼라아제), 지질 산화를 명시하기 위한 LXR (간 X 수용체)과 PPAR  $\alpha$  (59-61) 및 지질 유출을 명시하는 것으로서 MTP (마이크로좀 트리글리세라이드 전이 단백질)와 ApoB (아폴리포단백질 B) (62-66)를 고려하였다. 염증과 결부된 간 지방증이 NASH로의 진행을 암시할 수 있기 때문에, 염증의 마커를 측정하였다. 간 유전자 발현을 접종 후 12-20주에 측정하였다 (표3). 이처럼 긴 기간 및 HF 식이는 몇가지 변화를 감출 수 있지만, 음식 공급 및 HF-공급 쥐에서의 유전자 발현은 Ad36이 지질생성을 감소, 지질 산화를 상향조절, 그리고 간에서 염증을 유출 및 감소시킨다는 것을 총괄적으로 제시한다 (표 6).

#### 표 6

	지질생성			지질 산화						지질 유출		염증		
식이	FAS	SREBP1C	FOXO1	Adipo R1	Adipo R2	CPT1	LXR	PPAR $\alpha$	ApoB	MTP	IL6	IL10	INF $\gamma$	TNF $\alpha$
음식물	NS	NS	$\uparrow *$	$\uparrow *$	$\uparrow *$	NS	NS	$\uparrow *$	$\uparrow *$	$\uparrow *$	$\downarrow$ (0.06)	NS	NS	NS
HF	NS	$\uparrow$ (0.08)	$\uparrow$ (0.07)	NS	NS	NS	NS	NS	$\uparrow *$	NS	$\downarrow *$	NS	$\downarrow *$	$\downarrow *$

[0134] 표 6: 음식 또는 HF 식이를 공급한 쥐의 간에서 유전자 발현의 qRT-PCR 데이터. 화살표는 모의 감염 그룹과 비교하여 Ad36에 의해 유도된 변화의 방향을 명시한다. \*p<0.05 또는 더 높음. 동향을 명시하기 위해, 0.05 내지 0.1이라면, p값이 또한 나타난다. NS: 유의한 상이함은 없음.

[0135] 실시예 6:

#### 체중 감소없이 간 지방증을 약화시키기 위한 Ad36 E4orf1

[0137] 분리한 실험에서, HepG2 세포, 또는 쥐의 일차 간세포를 E4orf1 또는 비어있는 pcDNA 벡터로 형질감염시켰다. 형질감염 후 48시간에 HepG2 세포에 의한 팔미테이트 산화와 apoB 분비 및 일차 간세포에 의한 기초 및 글루카곤 자극 글루코오스 산출량을 측정하였다.

[0138] 영 벡터(null vector) 형질감염 세포와 비교하여, E4orf1은 지방 산화를 2배 ( $p<0.0001$ ), 그리고 apoB 분비를 1.5배 ( $p<0.003$ ) 증가시켰고, 기초 및 글루카콘 자극 글루코오스 산출량을 각각 45% ( $p=0.0008$ ) 및 22% ( $p<0.02$ )까지 감소시켰다.

[0139] 간세포의 이런 시험관내 형질감염은 E4orf1이 간 대사에서 Ad36의 효과를 매개한다는 것을 보여주었다. 데이터는 간세포에서, Ad36 E4orf1이 지방 산화 및 간 밖으로 지방의 이동을 증가시키고, 글루코오스 방출을 감소시킨다는 것을 보여준다.

[0140] 실시예 7:

#### E4orf1은 PPAR $\gamma$ 를 유도한다

[0142] PPAR $\gamma$  지방생성의 주요 조절자이며, 신체가 지방세포를 만드는 공정이다. Ad36은 PPAR $\gamma$ 를 상향조절하고, 지방 생성을 유도하고, 아디포넥틴을 증가시키며 그리고 혈당조절을 개선한다. 이 연구는 아디포넥틴 발현이 PPAR $\gamma$  유도 또는 지방생성에서 분리될 수 있는지 없는지를 조사하였다.

[0143] 다음 세포 유형을 인간 아데노바이러스 Ad36, 또는 Ad2에 감염시키거나, 또는 모의 감염시켰다: a) 완전한 PPAR $\gamma$ 를 가진 NIH/3T3-L1 쥐 배아의 섬유아세포 (MEF); b) PPAR $\gamma$  발현이 손상된 NIH/3T3 MEF; 및 c) PPAR $\gamma$  농아웃(knockout) 쥐 (MEF -/-)에서의 MEF. PPAR $\gamma$ 의 하향조절 또는 부재에도 불구하고, Ad36은 모의 또는 Ad2 감염 세포에 비하여, 세포성 글루코오스 흡수, 아디포넥틴, Glut4 및 Glut1 단백질 존재도를 증진시켰다. 예상한 바와 같이, 지방생성 유도는 3T3-L1에서 지질을 증가시켰지만 NIH/3T3 또는 MEF -/-에서는 그렇지 않았다. 이는 Ad36이 PPAR $\gamma$ 를 모집하거나 지방생성을 증진시키는 것 없이 글루코오스 흡수 및 아디포넥틴 분비를 상향조절한다는 것을 명시하였다. 인간에서, Ad 항체의 존재에 의해 결정된 바와 같은 자연적 Ad36 감염은 더 높은 아디포넥틴 수준을 예상하였고, 이는 이들 효과의 치료적 관련성을 제시한다. 이는 TZD의 작용과는 다르게, 체지방을 증가시킬 없이, E4orf1에 의한 글루코오스 흡수를 개선하는 것이 가능하다는 주장을 추가로 강화시킨다.

[0144] 실시예 8

#### E4orf1 단백질은 글루코오스 처리를 개선한다

[0146] 세포 신호전달을 연구하기 위해, 그리고 Ad36이 3T3-L1 지방전구세포에서 글루코오스 흡수를 상향조절하기 위한 이의 E4orf1 단백질을 필요로 하는지 안하는지 검사하기 위해 독시사이클린(3T3-E4)에 대하여 유도적으로 E4orf1을 발현하는 안정한 3T3-L1 세포주를 성장시켰다. 모의 감염 세포와 비교하여, Ad36은 기초 글루코오스 흡수를 3배까지 증가시켰으며, 이는 E4orf1이 siRNA로 농다운(knock down)되면 무효되었다. 이는 Ad36이 E4orf1를 통하여 세포성 글루코오스 흡수를 개선한다는 것을 보여주었다. 영 벡터를 가진 세포와 비교하여, E4orf1 세포는 유도 의존 방식으로 글루코오스 흡수를 증가시켰다. E4orf1은 Ras - 글루코오스 흡수가 유도되는 Ad36에서의 필수분자의 존재도 및 활성화를 증가시켰다. 특히, E4orf1은 H-Ras 이소폼을 활성화시킨다. 따라서, E4orf1은 Ad36의 항-고혈당증 효과를 단일 단백질까지 좁힌다.

[0147] 실시예 9

#### E4orf1은 지방세포 및 간세포에서 글루코오스 처리를 조절한다

[0149] 분리한 실험에서, 3T3-L1 지방전구세포 또는 지방세포, C2C12 근아세포 또는 HepG2 간세포를 E4orf1을 발현하는 V-5 태그된 플라스미드 (pcDNA-V5-AD36-E4orf1 또는 영 벡터 (pcDNA-V5-DEST)로 형질감염시켰다.

- [0150] 지방조직 및 골격근에 의한 글루코오스 흡수 및 간에 의한 글루코오스 산출량이 전신적인 혈당조절에 기여한다는 것을 고려하여, 이를 조직에 해당하는 세포주에 의한 기초 및 인슐린 자극 글루코오스 처리에서 Ad36 E4orf1의 효과를 측정하였다. E4orf1 발현 플라스미드로 형질감염시킨 3T3-L1 지방전구세포 또는 지방세포, C2C12 근아세포 또는 HepG2 간세포에서 글루코오스 처리를 영 백터로 형질감염시킨 세포와 비교하였다.
- [0151] E4orf1 발현은 3T3-L1 지방전구세포, 지방세포 및 C2C12 근아세포에서 기초 2DG 흡수를 증가시켰다 (도 11A-C). 지방세포에서, E4orf1은 인슐린 자극 2DG 흡수를 추가로 증가시켰다 ( $p=0.003$ ). 완전히 인슐린 반응을 하지 않는 지방전구세포 및 근아세포에서, E4orf1은 인슐린 자극 2DG 흡수를 증진시키지 않았다.
- [0152] 글루코오스 흡수, 글루카곤 합성, 글리코겐분해와 같은 간의 다수의 물질대사 기능이 전신적인 혈당조절에 기여함에도 불구하고, 간 글루코오스 산출량은 종종 인슐린 저항성 때문에 통제할 수 없고, 제 2형 당뇨에서 고혈중 글루코오스의 주요 기여자가 될 수 있다. 따라서, 간세포에 의한 글루코오스 방출에서 E4orf1의 효과를 확정하는데에 초점을 두었다. E4orf1 형질감염은 기초 그리고 인슐린 자극 조건 하에 HepG2 세포에 의한 글루코오스 산출량을 유의적으로 감소시켰다 (각각  $p<0.000001$  및  $<0.001$ , 도 5D).
- [0153] 이 실험은 Ad36 E4orf1이 지방조직, 골격근 및 간에 의한 글루코오스 처리에 영향을 준다는 것을 보여준다.
- [0154] 참조문헌
- [0155] 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.
- [0156] 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.
- [0157] 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.
- [0158] 4 Bellentani S, Scaglioni F, Marino M, Bedogni G. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. Dig Dis 2010;28:155-161.
- [0159] 5 Parekh S, Anania FA. Abnormal lipid and glucose metabolism in obesity: implications for nonalcoholic fatty liver disease. Gastroenterology 2007;132:2191-2207.
- [0160] 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.
- [0161] 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.
- [0162] 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.
- [0163] 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.
- [0164] 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.
- [0165] 11 Mishra P, Younossi ZM. Current treatment strategies for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Curr Drug Discov Technol 2007;4:133-140.
- [0166] 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.
- [0167] 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.

[0168] 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.

[0169] 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.

[0170] 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.

[0171] 17 Habib ZA, Havstad SL, Wells K, Divine G, Pladenvall 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.

[0172] 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.

[0173] 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.

[0174] 20 Fernandes-Santos C, Evangelista Carneiro R, de Souza Mendonca L, Barbosa Aguilera M, Mandarim-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.

[0175] 21 Fernandes-Santos C, Carneiro RE, de Souza Mendonca L, Aguilera MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Pan-PPAR agonist beneficial effects in overweight mice fed a high-fat high-sucrose diet. *Nutrition* 2009;25:818-827.

[0176] 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.

[0177] 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.

[0178] 24 Trovato GM, Martines GF, Garozzo A et al. Ad36 adipogenic adenovirus in human non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 2009.

[0179] 25 Mengshol JA, Golden-Mason L, Rosen HR. Mechanisms of Disease: HCV-induced liver injury. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2007;4:622-634.

[0180] 26 Tsai WL, Chung RT. Viral hepatocarcinogenesis. *Oncogene* 2010;29:2309-2324.

[0181] 27 Hanlon GW. Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *Int J Antimicrob Agents* 2007;30:118-128.

[0182] 28 Bischoff JR, Kirn DH, Williams A et al. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science* 1996;274:373-376.

[0183] 29 Crompton AM, Kirn DH. From ONYX-015 to armed vaccinia viruses: the education and evolution of oncolytic virus development. *Curr Cancer Drug Targets* 2007;7:133-139.

[0184] 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.

- [0185] 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.
- [0186] 32 Heiker JT, Kosel D, Beck-Sickinger AG. Molecular advances of adiponectin and adiponectin receptors. *Biol Chem* 2010.
- [0187] 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.
- [0188] 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.
- [0189] 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.
- [0190] 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 glucose uptake in diabetic and non-diabetic human skeletal muscle cells independent of insulin signaling. *Diabetes* 2008; 57: 1805-1813.
- [0191] 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.
- [0192] 38 Kantartzis K, Schick F, Haring HU, Stefan N. Environmental and genetic determinants of fatty liver in humans. *Dig Dis* 2010; 28: 169-178.
- [0193] 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.
- [0194] 40 Foy HM, Grayston JT. Adenoviruses. "Viral infections of humans: Epidemiology and control". Evans Alfred S. Ed. . Plenum Medical. : New York, 1976, pp 53-70.
- [0195] 41 Horvath J, Palkonyay L, Weber J. Group C adenovirus DNA sequences in human lymphoid cells. *J Virol* 1986; 59: 189-192.
- [0196] 42 Hierholzer JC, Wigand R, Anderson LJ, Adrian T, Gold JW. Adenoviruses from patients with AIDS: a plethora of serotypes and a description of five new serotypes of subgenus D (types 43-47). *J Infect Dis* 1988; 158: 804-813.
- [0197] 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.
- [0198] 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.
- [0199] 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.
- [0200] 46 Dhurandhar NV, Whigham LD, Abbott DH, Schultz-Darken NJ, 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.
- [0201] 47 Pasarica M, Loiler S, Dhurandhar NV. Acute effect of infection by adipogenic human adenovirus Ad36. *Archives of Virology* 2008; 153 (11): 2097-2102.
- [0202] 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.

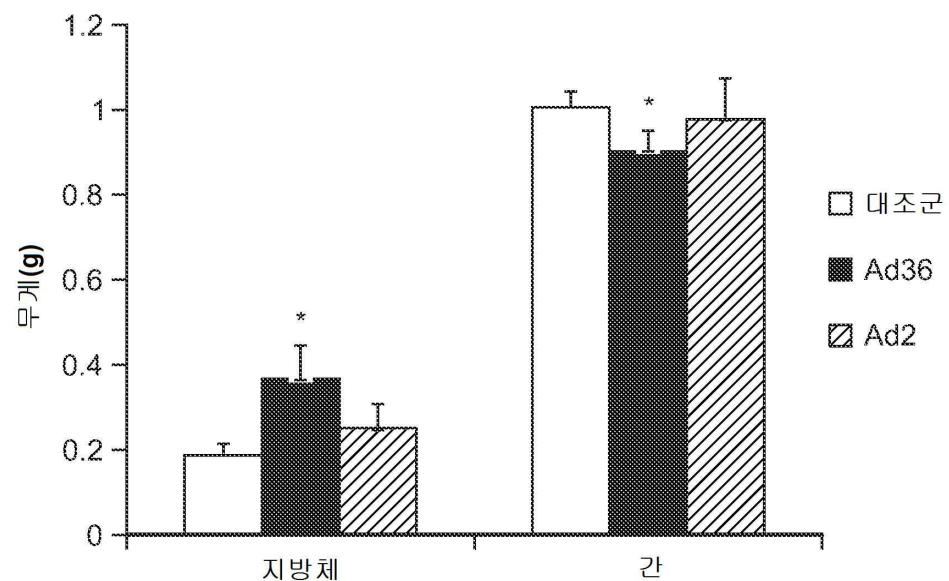
- [0203] 49 Bouchard C, Leon AS, Rao DC, Skinner JS, Wilmore JH, Gagnon J. The HERITAGE family study. Aims, design, and measurement protocol. *Med Sci Sports Exerc* 1995; 27: 721-729.
- [0204] 50 Tompkins CL, Cefalu W, Ravussin E, Goran M, Soros A, Volaufova J, et al. Feasibility of intravenous glucose tolerance testing prior to puberty. *Int J Pediatr Obes* 2010; 5: 51-55.
- [0205] 51 Larson-Meyer DE, Newcomer BR, VanVrancken-Tompkins CL, Sothern 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.
- [0206] 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.
- [0207] 53 Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 2002; 8: 1288-1295.
- [0208] 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.
- [0209] 55 Pajvani UB, Scherer PE. Adiponectin: systemic contributor to insulin sensitivity. *Curr Diab Rep* 2003; 3: 207-213.
- [0210] 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.
- [0211] 57 Schraw T, Wang ZV, Halberg N, Hawkins M, Scherer PE. Plasma adiponectin complexes have distinct biochemical characteristics. *Endocrinology* 2008; 149: 2270-2282.
- [0212] 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.
- [0213] 59 Yoon M. The role of PPARalpha in lipid metabolism and obesity: focusing on the effects of estrogen on PPARalpha actions. *Pharmacol Res* 2009; 60: 151-159.
- [0214] 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.
- [0215] 61 Kotokorpi P, Ellis E, Parini P, Nilsson LM, Strom S, Steffensen KR, et al. Physiological differences between human and rat primary hepatocytes 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.
- [0216] 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. *Biochemistry* 1999; 38: 10215.
- [0217] 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. *Biochemistry* 1999; 38: 7532-7544.
- [0218] 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.
- [0219] 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.
- [0220] 66 Davidson NO, Shelness GS. APOLIPOPROTEIN B: mRNA editing, lipoprotein assembly, and presecretory degradation. *Annu Rev Nutr* 2000; 20: 169-193.
- [0221] 67 Polyzos SA, Kountouras J, Zavos C, Tsiaousi E. The role of adiponectin in the pathogenesis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes Obes Metab* 2010; 12: 365-383.
- [0222] 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.
- [0223] 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<sup>+/−</sup> mice: a role of lipid mobilization and inflammation. *Endocrinology* 2010; 151: 2504-2514.
- [0224] 70 Vangipuram SD, Sheele J, Atkinson RL, Holland TC, Dhurandhar NV. A human adenovirus enhances preadipocyte differentiation. *Obes Res* 2004; 12: 770-777.
- [0225] 71 Gao Z, Wang Z, Zhang X, Butler AA, Zuberi A, Gawronska-Kozak B, et al. Inactivation of PKCtheta leads to increased susceptibility to obesity and dietary insulin resistance in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 292: E84-91.
- [0226] 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.
- [0227] 73 Lupo MA, Cefalu WT, Pardridge WM. Kinetics of lactate transport into rat liver in vivo. *Metabolism* 1990; 39: 374-377.
- [0228] 74 Hillyard LA, Lin CY, Abraham S. Lipogenic enzyme activities in primary cultures of adult mouse hepatocytes. *Lipids* 1988; 23: 242-247.
- [0229] 75 Amatruda JM, Danahy SA, Chang CL. The effects of glucocorticoids on insulin-stimulated lipogenesis in primary cultures of rat hepatocytes. *Biochem J* 1983; 212: 135-141.
- [0230] 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).
- [0231] 77 G. Sesti, M. Federici, D. Lauro, P. Sbraccia, R. Lauro, *Diabetes Metab Res Rev* 17, 363 (Sep-Oct, 2001).
- [0232] 78 G. Sesti et al., *FASEB J* 15, 2099 (Oct, 2001).
- [0233] 79 R. K. Semple et al., *Diabetes Care* 31, 977 (May, 2008).
- [0234] 80 R. K. Semple et al., *J Clin Invest* 119, 315 (Feb, 2009).
- [0235] 81 J. E. Pessin, A. R. Saltiel, *J Clin Invest* 106, 165 (Jul, 2000).
- [0236] 82 L. J. Goodyear et al., *J Clin Invest* 95, 2195 (May, 1995).
- [0237] 83 M. J. Pagliassotti, J. Kang, J. S. Thresher, C. K. Sung, M. E. Bizeau, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282, E170 (Jan, 2002).
- [0238] 84 N. G. Boule et al., *Diabetes Care* 28, 108 (Jan, 2005).
- [0239] 85 N. F. Butte, G. Cai, S. A. Cole, A. G. Comuzzie, *Am J Clin Nutr* 84, 646 (Sep, 2006).
- [0240] 86 C. C. Cowie et al., *Diabetes Care* 32, 287 (Feb, 2009).
- [0241] 87 G. Zhou et al., *J Clin Invest* 108, 1167 (Oct, 2001).
- [0242] 88 G. D. Cartee, J. F. Wojtaszewski, *Appl Physiol Nutr Metab* 32, 557 (Jun, 2007).

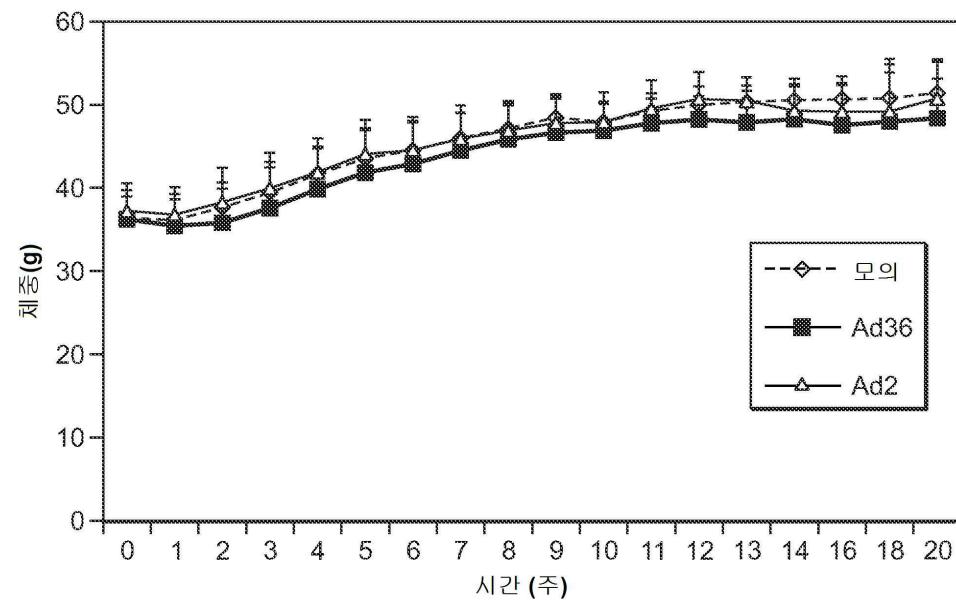
- [0243] 89 Z. Gao et al., J Biol Chem 277, 48115 (Dec 13, 2002).
- [0244] 90 E. Maury, S. M. Brichard, Mol Cell Endocrinol 314, 1 (Jan 15).
- [0245] 91 M. Qatanani, M. A. Lazar, Genes Dev 21, 1443 (Jun 15, 2007).
- [0246] 92 R. L. Atkinson et al., Int J Obes (Lond) 29, 281 (Mar, 2005).
- [0247] 93 P. An et al., Metabolism 52, 246 (Feb, 2003).
- [0248] 94 R. C. Boston et al., Diabetes Technol Ther 5, 1003 (2003).
- [0249] 95 S. Bajpeyi et al., J Appl Physiol 106, 1079 (Apr, 2009).
- [0250] 96 F. Aoki et al., Biosci Biotechnol Biochem 71, 206 (Jan, 2007).
- [0251] 97 A. Raben, N. Haulrik, N. Dhurandhar, R. Atkinson, A. Astrup, Int J Obes 25 (Suppl 2), S46 (2001).

## 도면

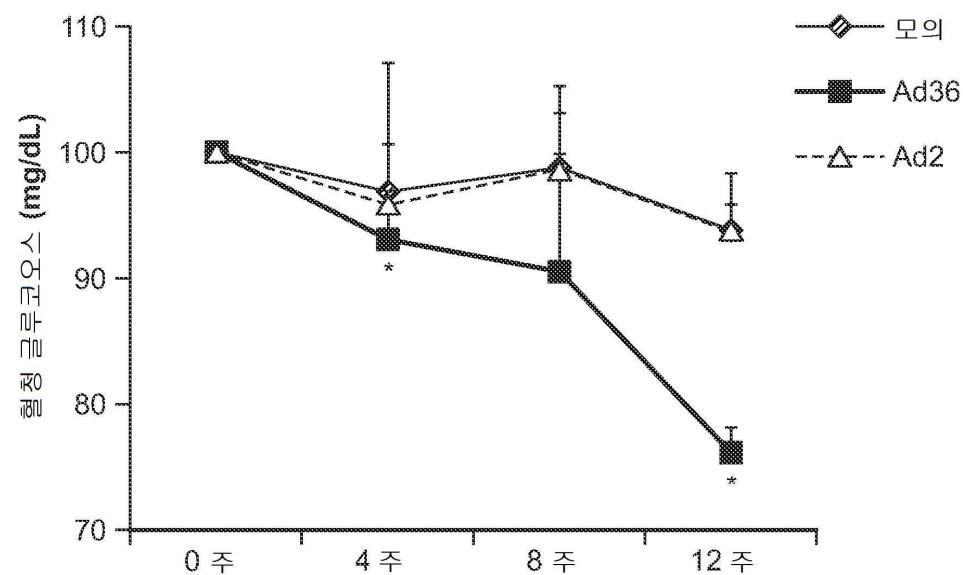
### 도면1



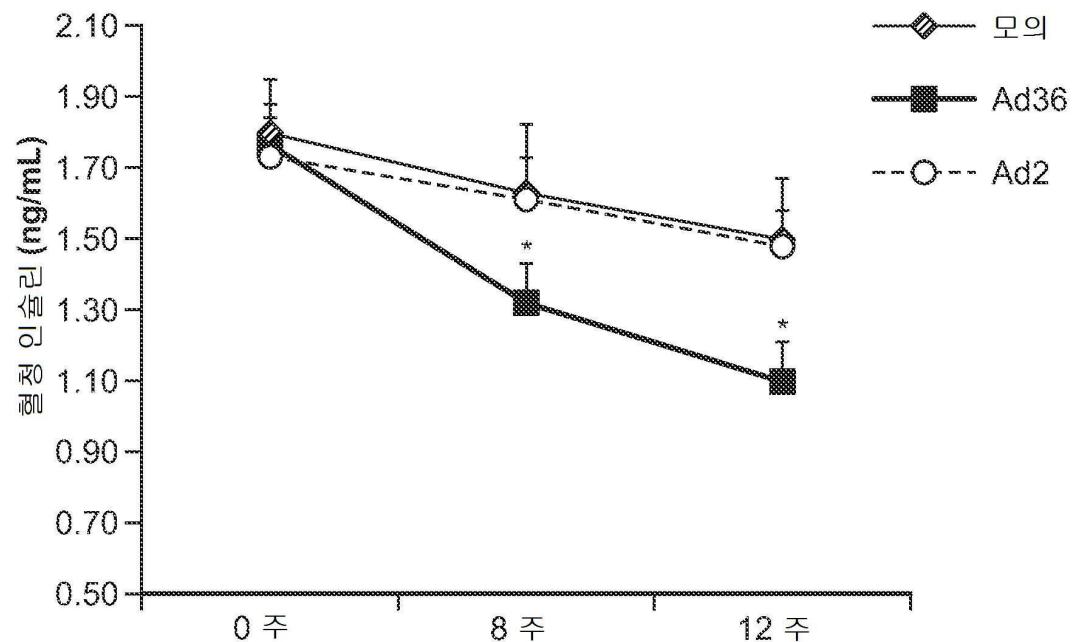
도면2



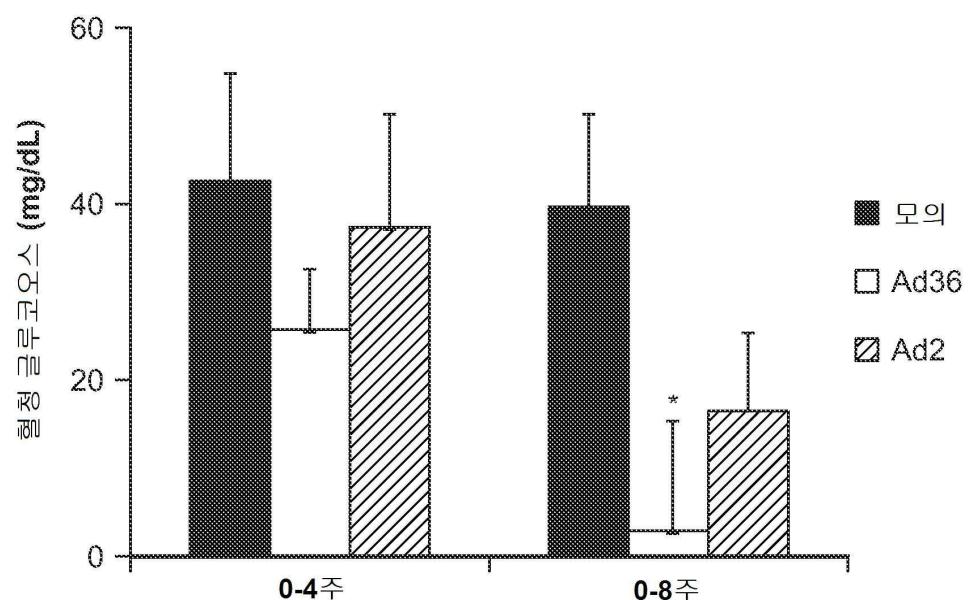
도면3a



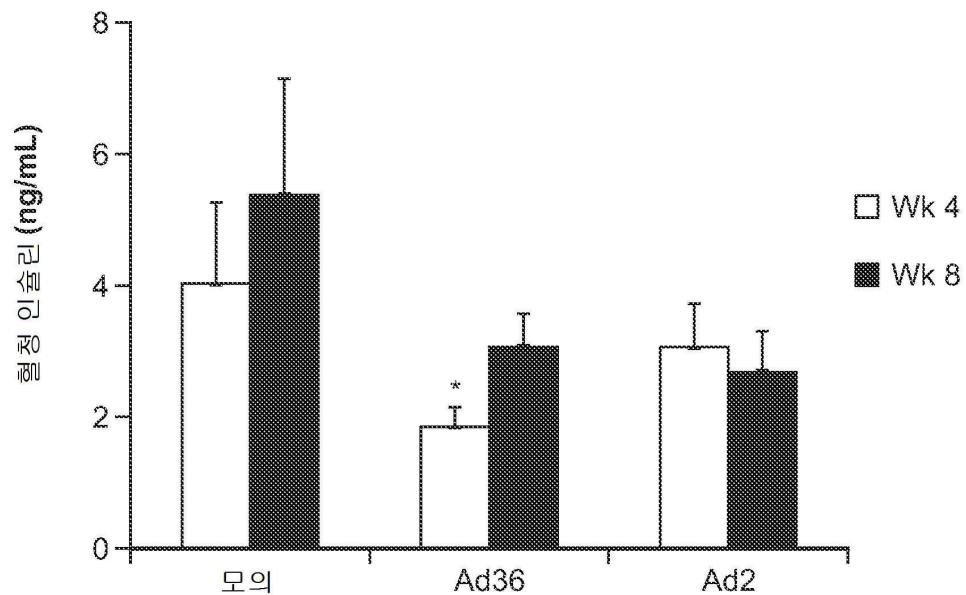
도면3b



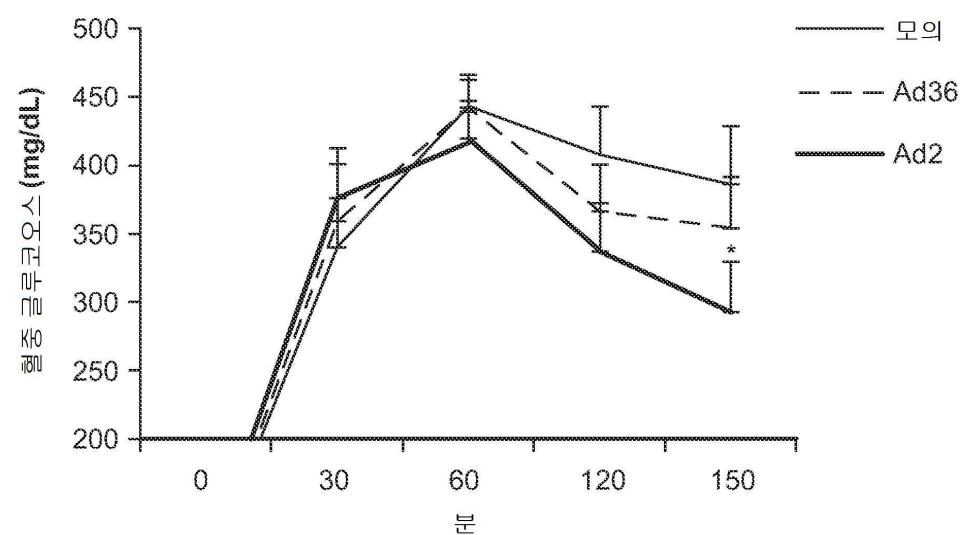
도면3c



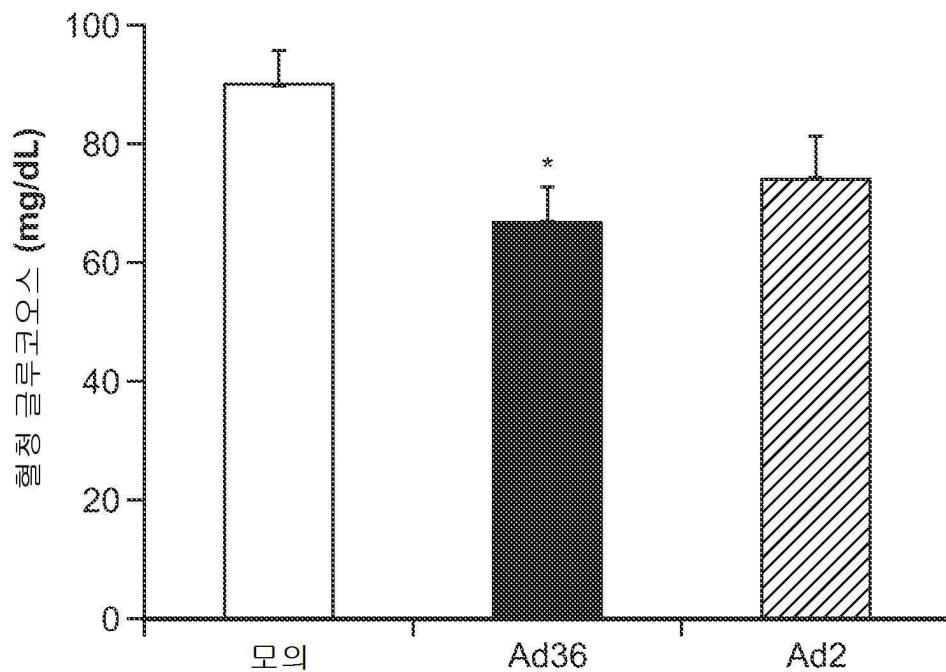
도면3d



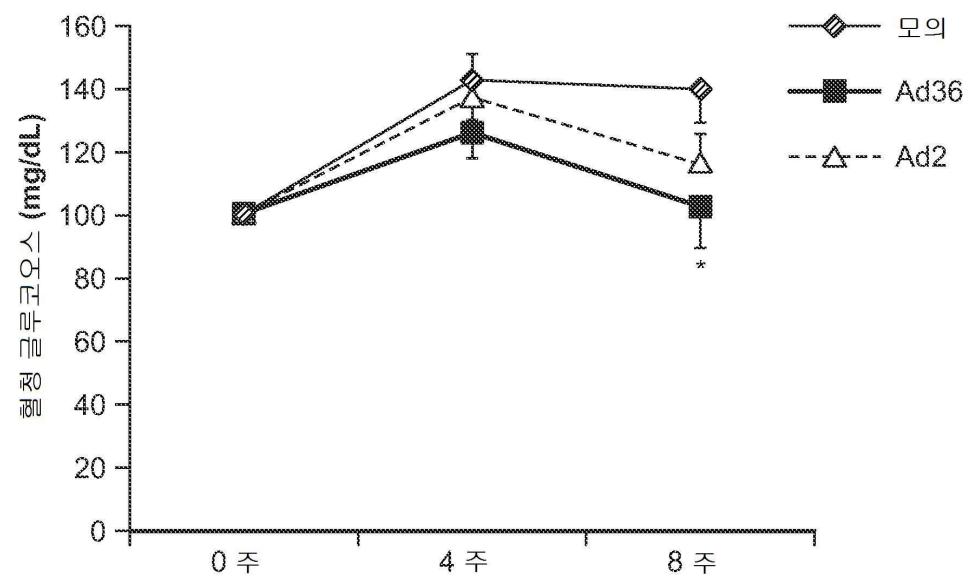
도면3e



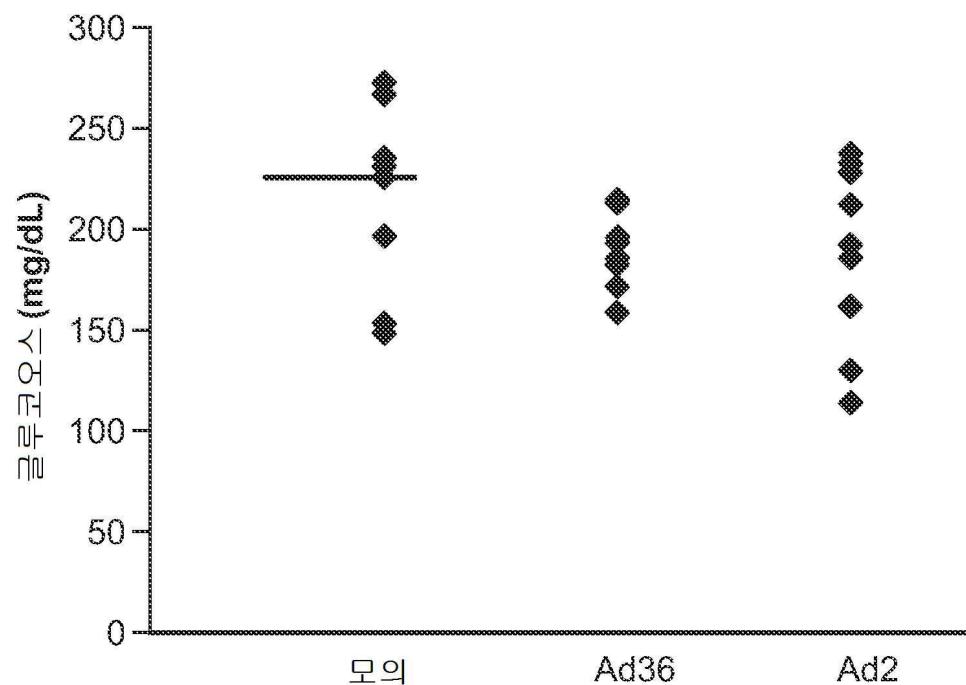
도면3f



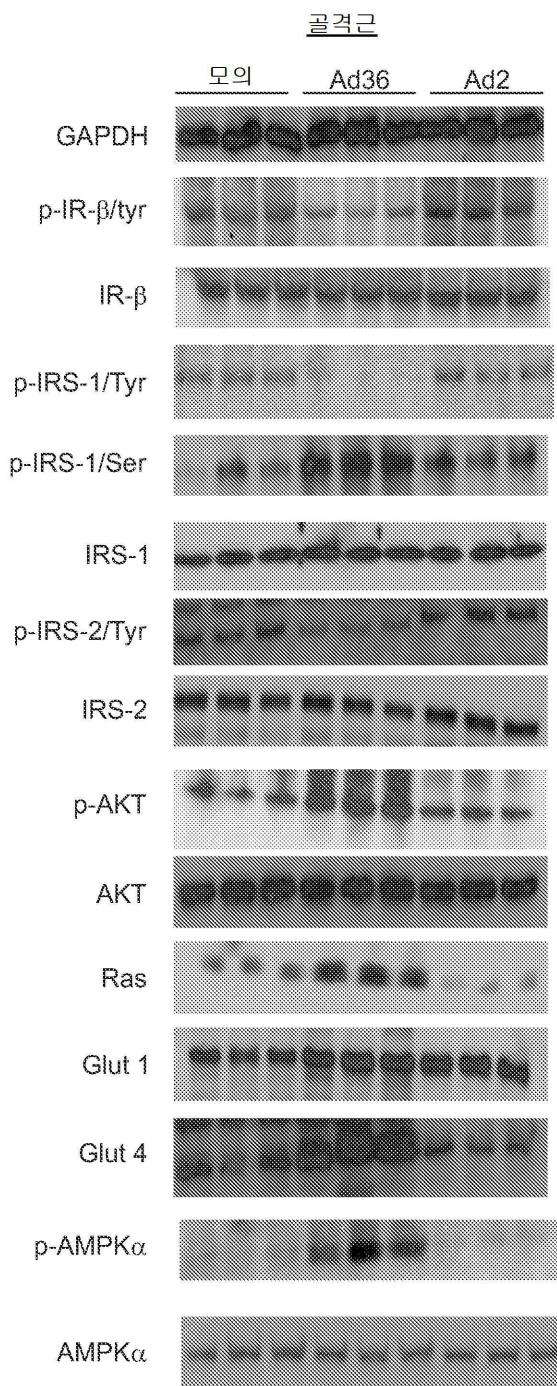
도면4a



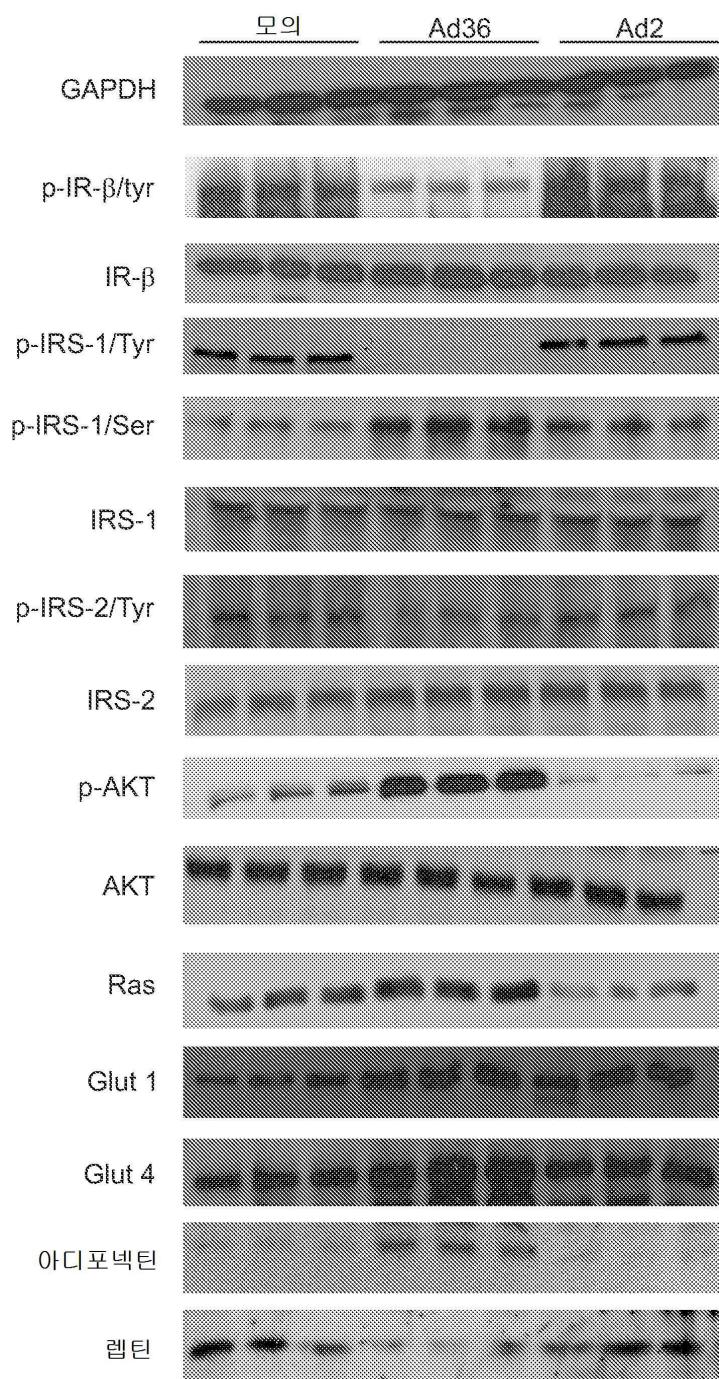
도면4b



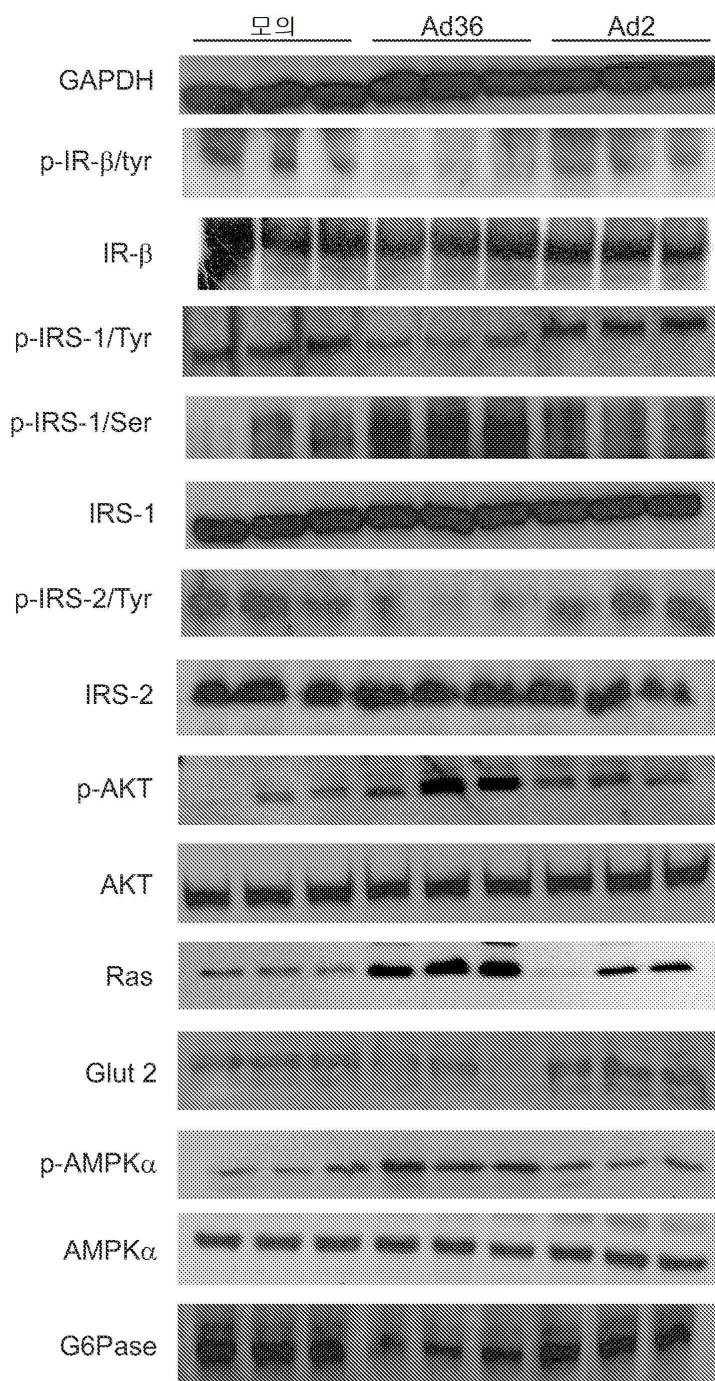
## 도면5a



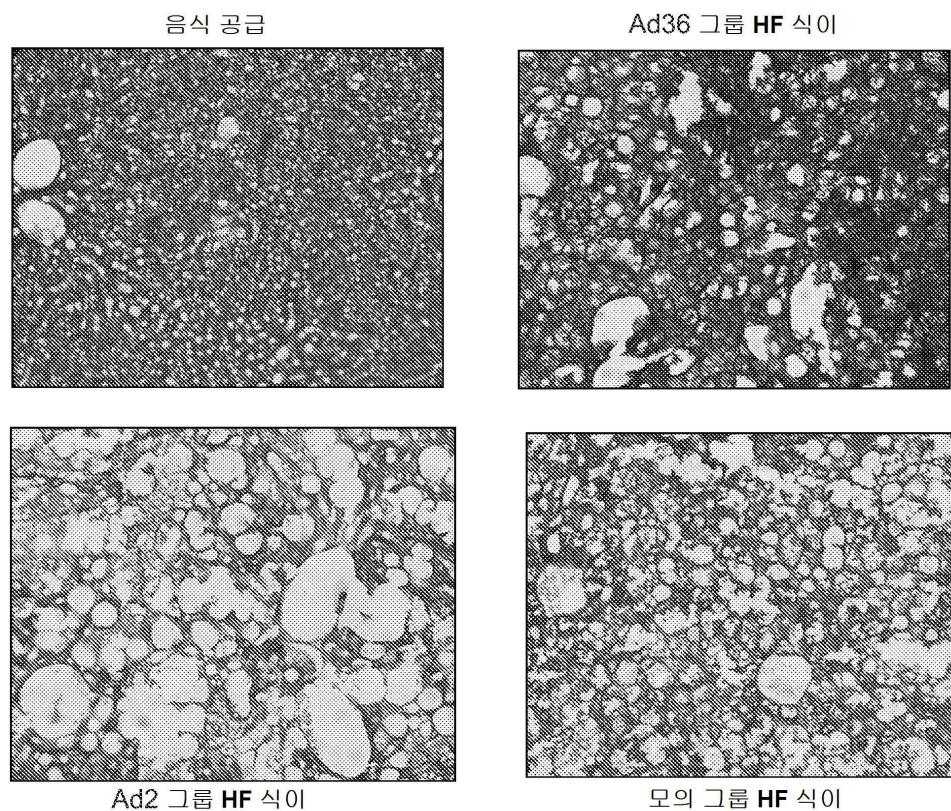
## 도면5b



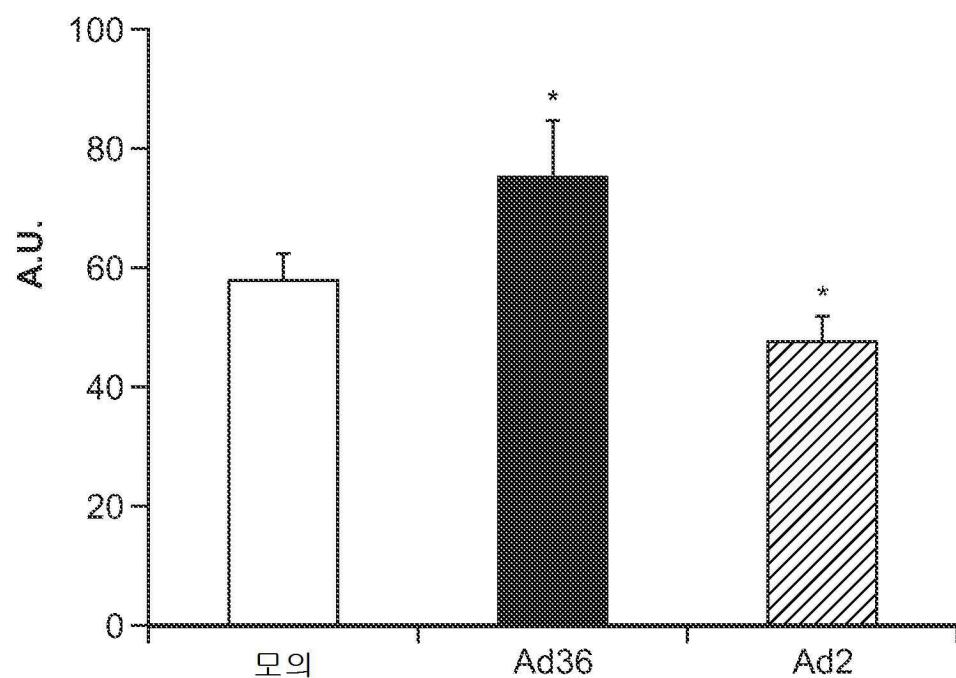
## 도면5c



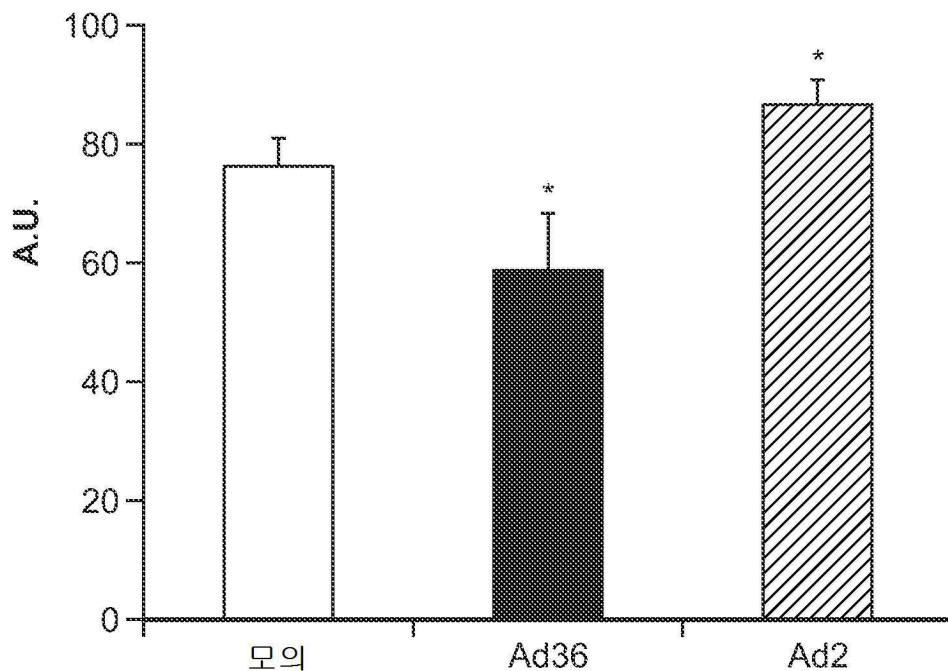
도면6a



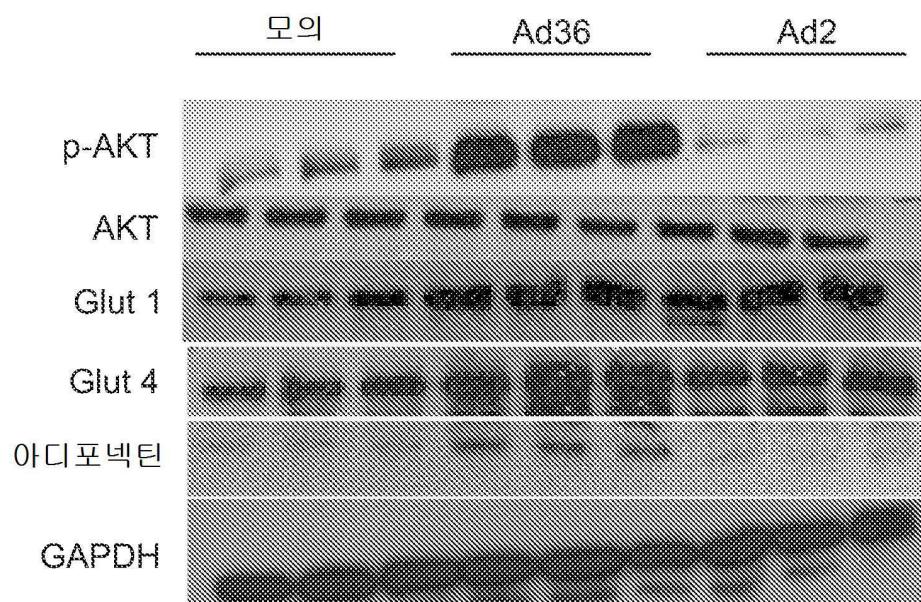
도면6b



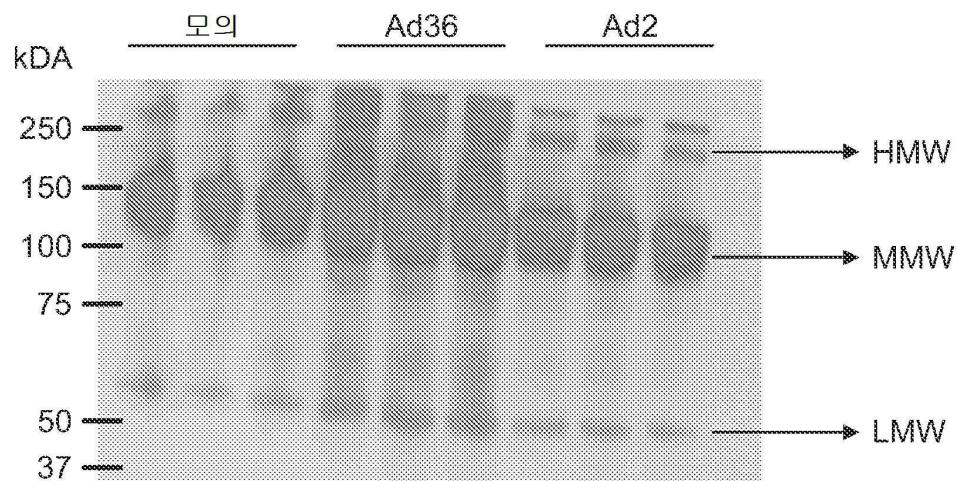
도면6c



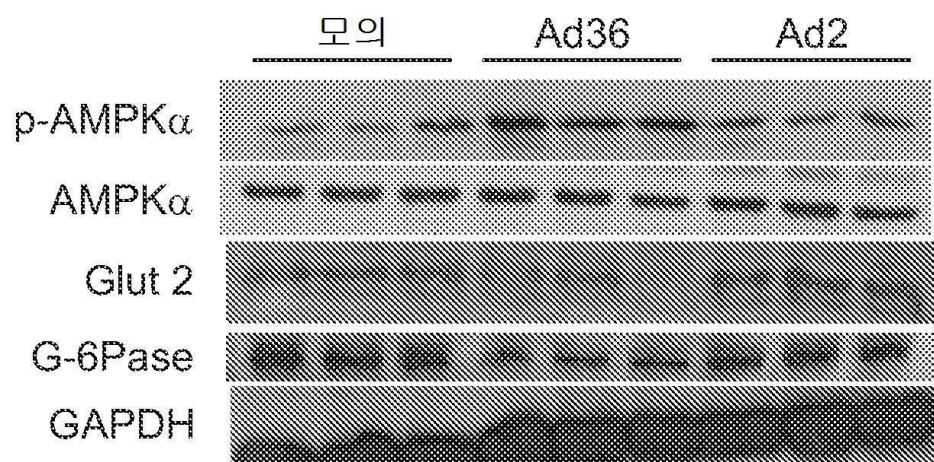
도면7a



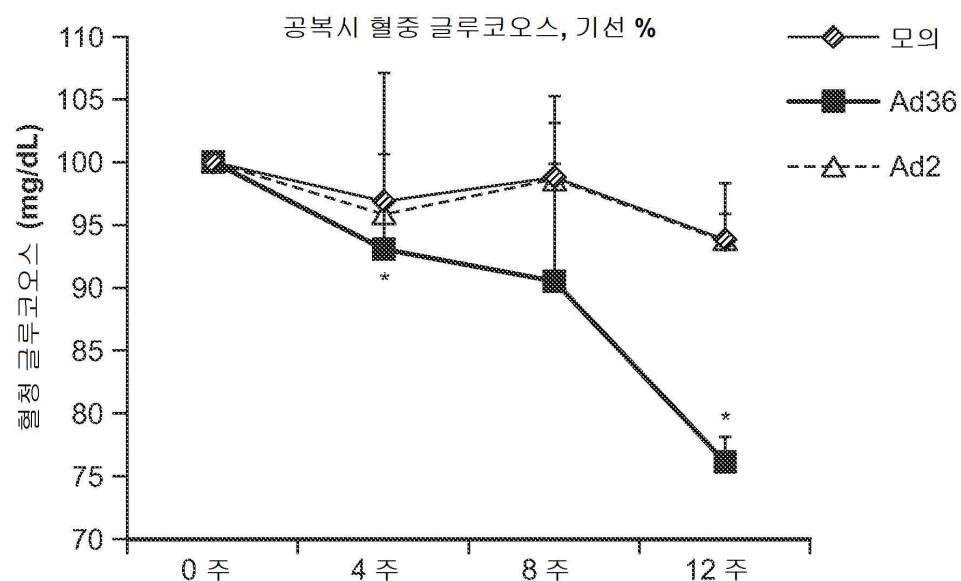
도면7b



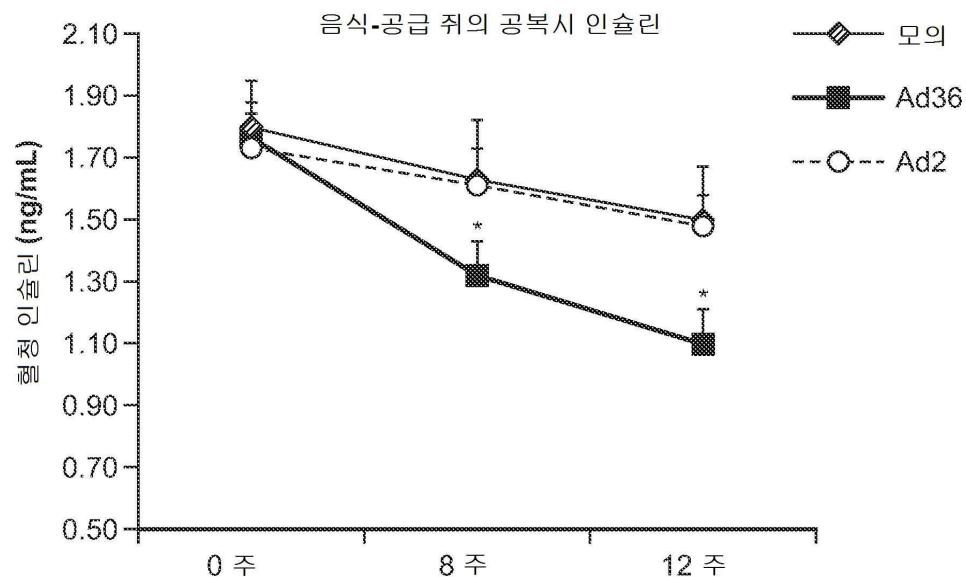
도면8



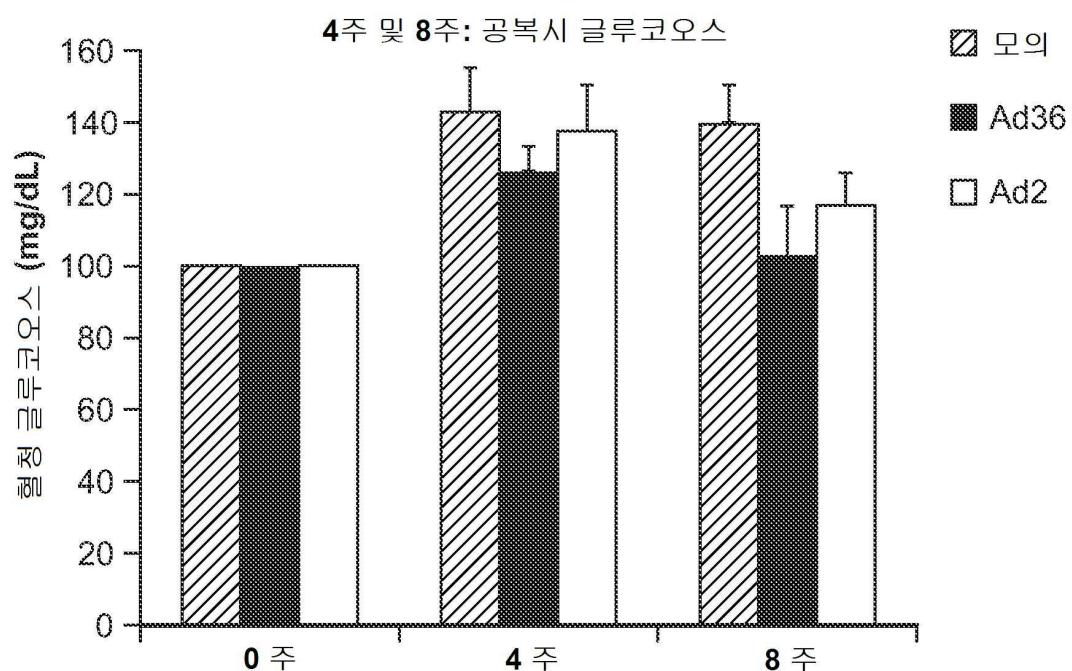
도면9a



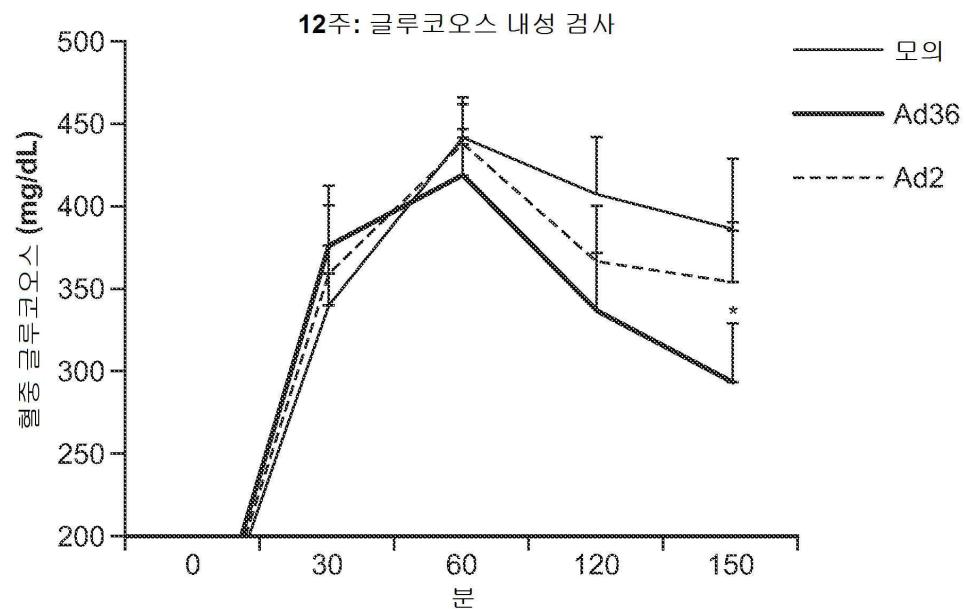
도면9b



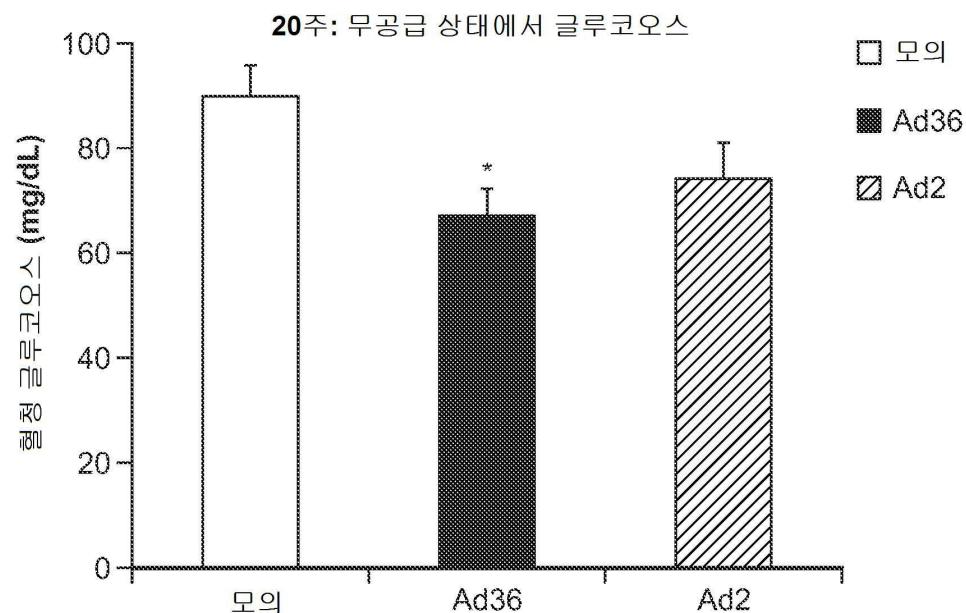
도면10a



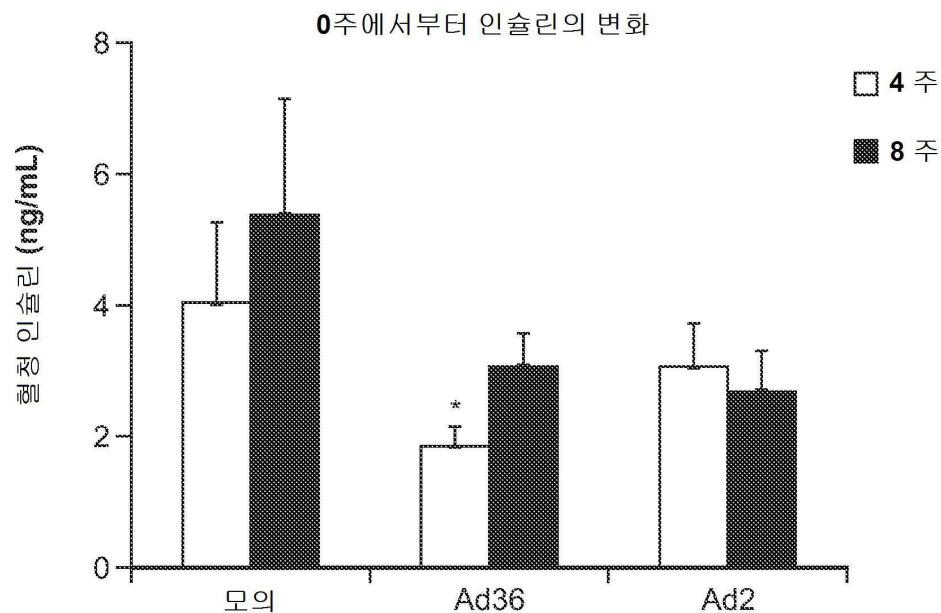
## 도면10b



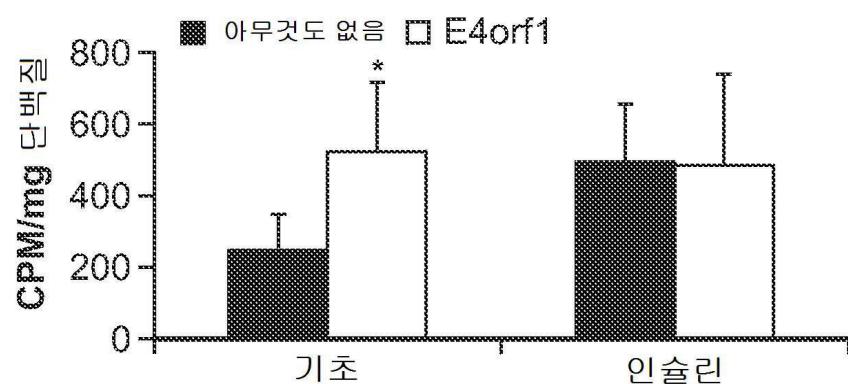
## 도면10c



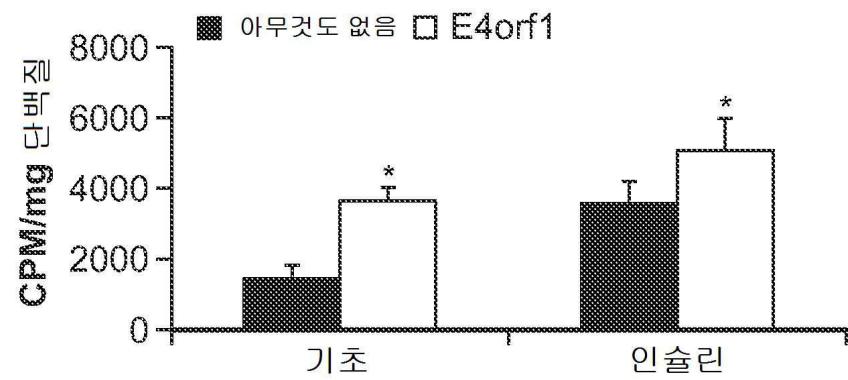
## 도면10d



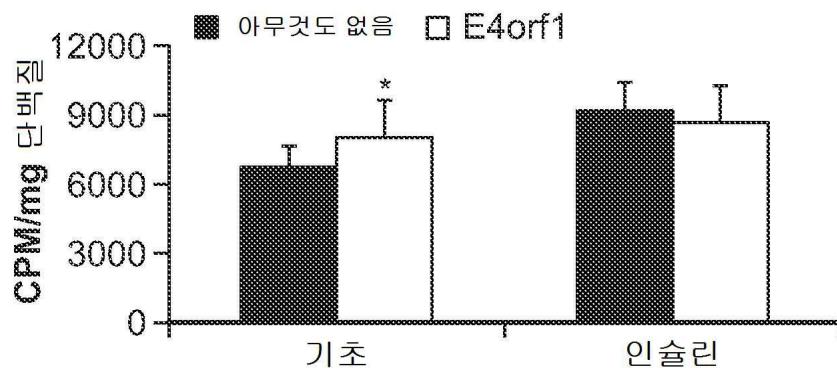
## 도면11a



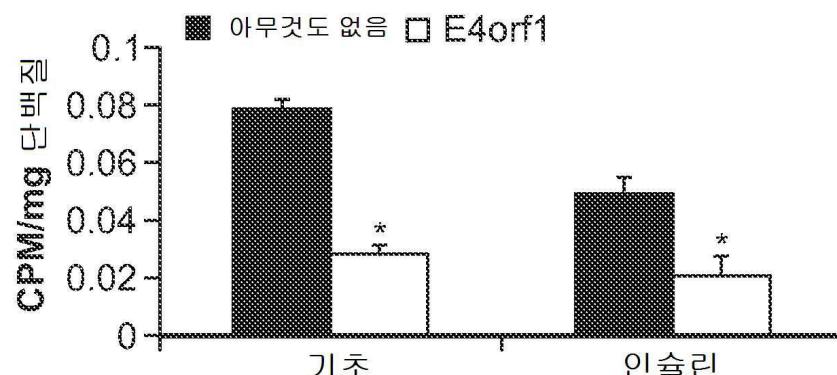
## 도면11b



## 도면11c



## 도면11d



## 서 열 목 록

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; BOARD OF SUPERVISORS OF LOUISIANA STATE UNIVERSITY AND

AGRICULTURAL AND MECHANICAL COLLEGE

&lt;120&gt; ADENOVIRUS AD36 E4ORF1 PROTEIN FOR PREVENTION AND TREATMENT OF

NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE

&lt;130&gt; 071176-0030

&lt;140&gt; PCT/US2011/043338

&lt;141&gt; 2011-07-08

&lt;150&gt; 61/362,443

&lt;151&gt; 2010-07-08

&lt;160&gt; 10

&lt;170&gt; PatentIn version 3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 378

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human adenovirus 36

&lt;400&gt; 1

atggctgaat ctctgtatgc tttcatagat agccctggag ggatcgctcc cgtccaggaa	60
ggggcttagca atagatatac cttctttgc cccgaatctt tccacattcc tccgcatgg	120
gtgatattgc ttcacctcag agtgagcgtg ctggatccata ctggatatca gggcagat	180
atggccttga atgactacca tgccagggc atactaaccc agtccgatgt gatattgcc	240
gggagaagac atgatcttc tgtgctgctc tttaaccaca cggaccgatt tttgtatgtc	300
cgcgagggcc acccagtggg aaccctgctg ctggagagag tgattttcc ttcagtgaga	360
atagccaccc tggtttag	378

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 125

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human adenovirus 36

&lt;400&gt; 2

Met Ala Glu Ser Leu Tyr Ala Phe Ile Asp Ser Pro Gly Gly Ile Ala			
1	5	10	15
Pro Val Gln Glu Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Ile Phe Phe Cys Pro Glu			
20	25	30	
Ser Phe His Ile Pro Pro His Gly Val Ile Leu Leu His Leu Arg Val			
35	40	45	
Ser Val Leu Val Pro Thr Gly Tyr Gln Gly Arg Phe Met Ala Leu Asn			
50	55	60	

Asp Tyr His Ala Arg Gly Ile Leu Thr Gln Ser Asp Val Ile Phe Ala			
65	70	75	80
Gly Arg Arg His Asp Leu Ser Val Leu Leu Phe Asn His Thr Asp Arg			
85	90	95	
Phe Leu Tyr Val Arg Glu Gly His Pro Val Gly Thr Leu Leu Leu Glu			
100	105	110	
Arg Val Ile Phe Pro Ser Val Arg Ile Ala Thr Leu Val			
115	120	125	

<210> 3

&lt;211&gt; 366

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human adenovirus 36

&lt;400&gt; 3

atggctgaat	ctctgtatgc	tttcatagat	agccctggag	ggatcgctcc	cgtccaggaa	60
ggggcttagca	atagatataat	cttctttgc	cccgaattt	tccacattcc	tccgcatggg	120
gtgatattgc	ttcacctcag	agtgagcgtg	ctggatccata	ctggatatca	gggcagat	180
atggccttga	atgactacca	tgccaggggc	atactaacc	agtccgatgt	gatatttgc	240
gggagaagac	atgatctc	tgtgctgctc	tttaaccaca	cggaccgatt	tttgtatgtc	300
cgcgagggcc	accagggtgg	aaccctgc	ctggagagag	tgat	ttcagtgaga	360

atata	g	366
-------	---	-----

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 121

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human adenovirus 36

&lt;400&gt; 4

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

1                   5                   10                   15

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

20                   25                   30

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

35                   40                   45

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

50                   55                   60

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

65                   70                   75                   80

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

85                   90                   95

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

100                  105                  110

Arg Val Ile Phe Pro Ser Val Arg Ile

115                  120

<210> 5  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><221> source  
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"  
<400> 5  
ggcatactaa cccagtccga tg 22  
<210> 6  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><221> source  
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"  
<400> 6  
tcactctcag cagcagcagg 20  
<210> 7  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><221> source  
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"  
<400> 7  
cctaggcagg agggtttgc 20  
<210> 8  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><221> source  
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 8

atagccggg ggaatacata 20

<210> 9

<211> 20

<212>

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
primer"

<400> 9

gatttcatg gtgcctaggag 20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
primer"

<400> 10

acgttgacat ccgtaaagac 20