



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103052397 B

(45)授权公告日 2017.09.19

(21)申请号 201180033866.7

(22)申请日 2011.07.08

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 103052397 A

(43)申请公布日 2013.04.17

(30)优先权数据
61/362,443 2010.07.08 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2013.01.08

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2011/043338 2011.07.08

(87)PCT国际申请的公布数据
W02012/006512 EN 2012.01.12

(73)专利权人 路易斯安那州立大学及农业和机械学院监事会
地址 美国路易斯安那州

(72)发明人 N·杜源德哈

(74)专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314

代理人 程伟

(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)

(56)对比文件

WO 2007064836 A1,2007.06.07,

US 20070218081 A1,2007.09.20,

Trovato Guglielmo M et al..Ad36 adipogenic adenovirus in human non-alcoholic fatty liver disease.《Liver International》.2010,第30卷(第2期),184-190.

Atkinson Richard L.human adenovirus-36 and non-alcoholic fatty liver disease.《Liver International》.2010,第30卷(第2期),164-165.

审查员 宋梦

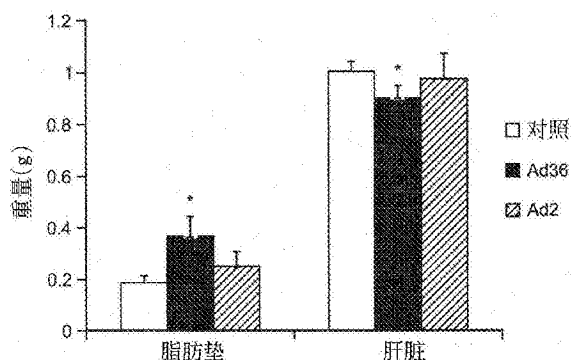
权利要求书2页 说明书23页 附图16页

(54)发明名称

用于预防及治疗非酒精性脂肪肝疾病的腺病毒AD36 E4ORF1蛋白

(57)摘要

本发明大体系关于治疗或预防非酒精性脂肪肝疾病的症状的方法、减少肝脏中过多脂肪的方法、改善血糖控制的方法、及治疗或预防肝脏功能障碍的方法,其包含给药治疗有效量的腺病毒36 E4orf1蛋白或其功能变异体。



1. 一种治疗有效量的腺病毒-36 E4orf1蛋白或编码腺病毒-36 E4orf1蛋白的核酸用于制备治疗或预防个体的非酒精性脂肪肝疾病的药剂的用途,其中所述蛋白为SEQ ID NO: 2,其中所述核酸为SEQ ID NO:1或其功能变异体,其中所述功能变异体包含编码SEQ ID NO:2氨基酸序列的同义取代且具有与SEQ ID NO:1至少85%序列一致性,且所述功能变异体编码SEQ ID NO:2所示的蛋白。

2. 根据权利要求第1项所述的用途,其中所述腺病毒-36 E4orf1蛋白的氨基酸序列为SEQ ID NO:2。

3. 根据权利要求第1项所述的用途,其中藉由将编码所述腺病毒-36 E4orf1蛋白的核酸序列以允许所述腺病毒-36 E4orf1蛋白表现的方式引入所述个体来给药编码腺病毒-36 E4orf1蛋白的核酸。

4. 根据权利要求第3项所述的用途,其中藉由选自由以下者所组成的群组的方法引入所述核酸序列:电穿孔、DEAE聚葡萄糖转染、磷酸钙转染、阳离子性脂质体融合、原生质体融合、产生活体内电场、经DNA涂布的微弹轰击、注射重组复制缺陷型病毒、同源重组、活体内基因疗法、活体外基因疗法、病毒载体及裸DNA转移。

5. 根据权利要求第3项所述的用途,其中所述核酸序列为SEQ ID NO:1或其功能变异体,其中所述功能变异体包含编码SEQ ID NO:2氨基酸序列的同义取代且具有与SEQ ID NO:1至少85%序列一致性,且所述功能变异体编码SEQ ID NO:2所示的蛋白。

6. 根据权利要求第1项所述的用途,其中所述个体为人类。

7. 一种治疗有效量的腺病毒-36 E4orf1蛋白用于制备减少个体的肝脏中的过多脂肪的药剂的用途,其中所述蛋白为SEQ ID NO:2。

8. 根据权利要求第7项所述的用途,其中藉由将编码所述腺病毒-36 E4orf1蛋白的核酸序列以允许所述腺病毒-36 E4orf1蛋白表现的方式引入所述个体来给药所述腺病毒-36 E4orf1蛋白。

9. 根据权利要求第8项所述的用途,其中藉由选自由以下者所组成的群组的方法引入所述核酸序列:电穿孔、DEAE聚葡萄糖转染、磷酸钙转染、阳离子性脂质体融合、原生质体融合、产生活体内电场、经DNA涂布的微弹轰击、注射重组复制缺陷型病毒、同源重组、活体内基因疗法、活体外基因疗法、病毒载体及裸DNA转移。

10. 根据权利要求第8项所述的用途,其中所述核酸序列为SEQ ID NO:1或其功能变异体,其中所述功能变异体包含编码SEQ ID NO:2氨基酸序列的同义取代且具有与SEQ ID NO:1至少85%序列一致性,且所述功能变异体编码SEQ ID NO:2所示的蛋白。

11. 根据权利要求第7项所述的用途,其中所述个体为人类。

12. 一种治疗有效量的腺病毒-36 E4orf1蛋白用于制备通过肝脏脂肪积聚改善而治疗或预防特征在于脂肪肝及胰岛素抗性的肝脏功能障碍的药剂的用途,其中所述蛋白为SEQ ID NO:2。

13. 根据权利要求第12项所述的用途,其中所述肝脏脂肪积聚改善的特征在于脂质氧化增加或脂质自肝脏的转运增加。

14. 根据权利要求第12项所述的用途,其中藉由将编码所述腺病毒-36 E4orf1蛋白的核酸序列以允许所述腺病毒-36 E4orf1蛋白表现的方式引入哺乳动物体内来给药编码腺病毒-36 E4orf1蛋白的核酸。

15. 根据权利要求第14项所述的用途,其中藉由选自由以下者所组成的群组的方法引入所述核酸序列:电穿孔、DEAE聚葡萄糖转染、磷酸钙转染、阳离子性脂质体融合、原生质体融合、产生活体内电场、经DNA涂布的微弹轰击、注射重组复制缺陷型病毒、同源重组、活体内基因疗法、活体外基因疗法、病毒载体及裸DNA转移。

16. 根据权利要求第14项所述的用途,其中所述核酸序列为SEQ ID NO:1或其功能变异体,其中所述功能变异体包含编码SEQ ID NO:2氨基酸序列的同义取代且具有与SEQ ID NO:1至少85%序列一致性,且所述功能变异体编码SEQ ID NO:2所示的蛋白。

17. 一种有效量的腺病毒-36 E4orf1蛋白用于制备减少或预防非酒精性脂肪肝炎的药剂的用途,其中所述蛋白为SEQ ID NO:2。

18. 根据权利要求第17项所述的用途,其中由肝功能障碍引起的高血糖症减少。

19. 根据权利要求第17项所述的用途,其中藉由将编码所述腺病毒-36 E4orf1蛋白的核酸序列以允许所述腺病毒-36 E4orf1蛋白表现的方式引入哺乳动物体内来给药编码腺病毒-36 E4orf1蛋白的核酸。

20. 根据权利要求第19项所述的用途,其中藉由选自由以下者所组成的群组的方法引入所述核酸序列:电穿孔、DEAE聚葡萄糖转染、磷酸钙转染、阳离子性脂质体融合、原生质体融合、产生活体内电场、经DNA涂布的微弹轰击、注射重组复制缺陷型病毒、同源重组、活体内基因疗法、活体外基因疗法、病毒载体及裸DNA转移。

21. 根据权利要求第19项所述的用途,其中所述核酸序列为SEQ ID NO:1或其功能变异体,其中所述功能变异体包含编码SEQ ID NO:2氨基酸序列的同义取代且具有与SEQ ID NO:1至少85%序列一致性,且所述功能变异体编码SEQ ID NO:2所示的蛋白。

用于预防及治疗非酒精性脂肪肝疾病的腺病毒AD36 E4ORF1 蛋白

[0001] 相关申请案的交叉引用

[0002] 本申请案主张2010年7月8日申请的名称为「Adenovirus Ad36 E4orf1 Protein for Prevention and Treatment of Non-alcoholic Fatty Liver Disease,」的美国临时专利申请案第61/362,443号的权益,该案的全文出于所有目的以引用的方式并入本文中。

[0003] 政府资助

[0004] 本发明的研发由政府来自国家卫生研究院(National Institutes of Health)的补助金(第R01 DK066164号补助金)下部分资助。政府对本发明具有某些权利。

技术领域

[0005] 本发明系关于治疗或预防非酒精性脂肪肝疾病的症状的方法、减少肝脏中过多脂肪的方法、改善血糖控制的方法、及治疗或预防肝脏功能障碍的方法。

背景技术

[0006] 肝脏在脂肪代谢中起主要作用且通常积聚脂质(脂肪),但仅积聚至「正常含量」。肝细胞中脂质积聚过多导致肝脂肪变性,其在代谢上有害且可由多种肝脏功能障碍引起,诸如脂蛋白的 β 氧化减少或分泌减少。肝脏的许多功能中的另一种为释放葡萄糖至循环中。在健康个体中,肝细胞定期释放葡萄糖以调节血糖含量。相比的下,在患有糖尿病的个体中,肝细胞不受控制地释放葡萄糖,此使血糖含量增加。因此,减少肝脏细胞(liver cell)(肝细胞(hepatocyte))的葡萄糖释放可极有效地控制糖尿病。

[0007] 肝脏中的过多脂质积聚可助长胰岛素抗性,且因此使血糖控制不良。脂联素(Adiponectin)为一种由脂肪组织(fat tissue/adipose tissue)分泌的蛋白质,其以许多方式改善胰岛素敏感性。脂联素经由脂联素受体AdipoR1及AdipoR2起作用来活化AMPK及PPAR α 路径(32)、减少全身性及肝胰岛素抗性以及减轻肝脏炎症及纤维化(32)。其为肝脂质含量的强决定性因素,如由脂联素KO或过表现的小鼠模型所示(14,33)。脂联素藉由上调AMPK介导的肝脂质氧化来降低肝脂肪变性(34)。

[0008] 非酒精性脂肪肝疾病(NAFLD)在美国影响多达20%的成人,且包括肝脏中脂肪积聚过多(肝脂肪变性)。其通常与肥胖症及胰岛素抗性有关(1,2)。NAFLD的流行率在患有第2型糖尿病或肥胖症的成人中为约70%至80%(3-5),在所有儿童中为3%至10%,且在肥胖儿童中高达40%至70%(4)。NAFLD与较高总体及肝脏相关的死亡率有关(6,7)。除脂肪变性的外,可能发生炎症及纤维化且NAFLD可能发展成非酒精性脂肪肝炎(non-alcoholic steato-hepatitis,NASH)、肝硬化、肝衰竭及肝细胞癌。虽然脂肪变性可能具有可逆性,但一旦其发展成NASH,则不存在确立的治疗,且少数可用的药物治疗显示有限的成功率(8,9)。因此,即时预防及/或治疗肝脂肪变性至关重要。然而,即使对于NAFLD,药物治疗亦仅具有较低成功率(10),且减少饮食脂肪摄取及减少肥胖为治疗的主要手段(11)。尽管有明显健康益处,但已证明对于一般人群而言顺应生活方式改变以达成饮食或肥胖的持续改善具

有挑战性。

[0009] 虽然过度肥胖或高脂肪 (HF) 饮食为NAFLD的风险因素,但腺病毒36 (Ad36) 即使在持续HF饮食下亦减轻小鼠的肝脂肪变性且不会减少内脏或皮下肥胖。Ad36似乎改造现存脂肪组织的品质以减轻HF饮食诱发的肝脂肪变性。Ad36使脂肪组织代谢品质发生的此改变包括脂肪酸的吸收增加及释放减少,以及更高的脂联素分泌 (12,13)。Ad36的此独特能力提供以新颖方式消除过度肥胖或过度饮食脂肪摄取 (而无需减少) 的有害作用的显著模型。噻唑啉二酮 (Thiazolidinediones;TZD) 类药物亦可改善脂肪组织的代谢品质、上调脂联素及改善肝脂肪变性 (14-16)。已报告TZD的严重副作用 (17-19)。

[0010] Ad36并未导致动物发病或意外死亡。此外,Ad36似乎具有优于TZD的作用的明显优点,尤其在存在HF饮食下。不同于TZD,Ad36并未增加进食HF饲料的小鼠的肥胖 (20,21)。在存在HF饮食下,TZD可改善血糖控制,但其同时促进各种器官 (包括肝脏) 中的脂质储存 (20,22,23)。若不减少脂肪摄取,则此会限制TZD的范围。由于Ad36的作用不具饮食脂肪及肥胖相关性,因此Ad36对多种代谢路径的潜在作用可提供在临床上更具吸引力且因此可能更有效的新颖抗脂肪变性方法。

[0011] 出于有益目的利用病毒的某些性质已创造性地使用若干年,包括使用噬菌体病毒的杀菌性质 (27)、突变型腺病毒的溶瘤能力 (28)、或使用疱疹单纯型病毒及若干其它病毒单独或与各种协同药物一起 (30,31) 来治疗癌 (29)。

[0012] 因此,与肥胖或饮食脂肪摄取无关的降低肝脂肪变性的药剂将极具吸引力且具有实际益处。

发明内容

[0013] 本发明系关于以下发现:Ad36感染与肝脏病理学及功能障碍的发病率减少有关,且Ad36 E4orf1蛋白可用于改变基因表现及生物化学路径,从而使肝脏功能得到改善。

[0014] 本发明大体系关于治疗或预防个体的非酒精性脂肪肝疾病的症状的方法。在一些态样中,该方法包含向个体给药治疗有效量的腺病毒-36 E4orf1蛋白,其中该个体的症状在给药后改善。

[0015] 本发明亦系关于减少个体肝脏中的过多脂肪的方法。在一些态样中,该方法包含向个体给药治疗有效量的腺病毒-36 E4orf1蛋白,其中肝脏中的脂肪在给药后减少。

[0016] 本发明亦系关于改善个体的血糖控制的方法。在一些态样中,该方法包含向个体给药治疗有效量的Ad36 E4orf1蛋白,其中胰岛素敏感性在给药后增强。

[0017] 本发明亦系关于治疗或预防特征在于脂肪肝及/或胰岛素抗性的肝脏功能障碍的方法。在一些态样中,该方法包含向个体给药治疗有效量的Ad36 E4orf1蛋白,其中肝脏脂肪积聚在给药后改善。肝脏脂肪积聚改善的特征可在于脂质氧化增加或脂质自肝脏的转运增加。

[0018] 本发明亦系关于减少或预防NASH的方法。在一些态样中,该方法包含向个体给药治疗有效量的Ad36 E4orf1蛋白,其中由肝功能障碍引起的高血糖症得以减轻。

[0019] 腺病毒-36 E4orf1蛋白的氨基酸序列可为SEQ ID NO:2或其功能变异体。腺病毒-36 E4orf1的核酸序列可包含SEQ ID NO:1或其功能变异体。个体可为人类。

[0020] 可藉由将编码腺病毒-36 E4orf1蛋白的核酸分子以允许腺病毒-36 E4orf1蛋白

表现的方式引入个体来向该个体给药腺病毒-36 E4orf1蛋白。可藉由使用任何适合方法来引入核酸序列。此项技术中习知许多适合方法,诸如电穿孔、DEAE聚葡萄糖转染、磷酸钙转染、阳离子性脂质体融合、原生质体融合、产生活体内电场、经DNA涂布的微弹轰击、注射重组复制缺陷型病毒、同源重组、活体内基因疗法、活体外基因疗法、奈米粒子传递、病毒载体及裸DNA转移。

附图说明

[0021] 图1为展示进食普通饲料(chow-fed)的小鼠腹膜后脂肪垫及肝脏的重量的图。

[0022] 图2为展示进食高脂肪(HF)饲料的小鼠的体重的图。

[0023] 图3A为展示进食普通饲料的小鼠的空腹血清葡萄糖的图。图3B为展示进食普通饲料的小鼠的血清胰岛素的图。图3C为展示进食HF饲料的小鼠的空腹血清葡萄糖含量改变的图。图3D为展示进食HF饲料的小鼠的空腹血清胰岛素改变的图。图3E为展示进食HF饲料的小鼠在感染后12周进行葡萄糖耐受性测试的结果的图。图3F为展示进食HF饲料的小鼠在感染后20周自由进食的血清葡萄糖的图。

[0024] 图4A为展示进食HF饲料的小鼠的空腹血清葡萄糖的图。图4B为展示进食HF饲料的小鼠在感染后20周自由进食的血清葡萄糖的图。

[0025] 图5A为展示进食HF饲料的小鼠的骨骼肌中蛋白质丰度的西方墨点图。图5B为展示进食HF饲料的小鼠的脂肪组织中蛋白质丰度的西方墨点图。图5C为展示进食HF饲料的小鼠的肝脏中蛋白质丰度的西方墨点图。

[0026] 图6A为C57B1/6J小鼠的肝脏组织的一组过碘酸希夫氏染色(Periodic acid-Schiff stain)。深色染色展示肝糖且白色区域指示脂质积聚。进食普通饲料的对照小鼠展示最低脂质积聚。进食HF饲料的组展示较高脂质积聚。然而,如由较低脂质积聚及较高肝糖所示,Ad36而非Ad2显著减轻HF饮食诱发的脂肪变性(进食HF饲料仿真感染对比进食HF饲料Ad36感染; $p<.02$)。图6B为展示进食HF饲料的小鼠的肝脏切片的肝糖含量的图。图6C为展示进食HF饲料的小鼠的肝脏切片的脂质含量的图。

[0027] 图7为展示使用来自在感染后20周在自由进食状态下处死的进食HF饲料的小鼠的脂肪组织蛋白质所得的西方墨点图。(3只小鼠/组)。图7A:GAPDH为负载对照。相较于仿真组,Ad36组而非Ad2组中磷酸-AKT、Glut1、Glut 4及脂联素较高($p<.05$)。图7B:相较于仿真组,Ad36组而非Ad2组中,在非还原、非变性条件下所分析的各脂联素寡聚物较高($p<.03$)。

[0028] 图8展示使用进食HF饲料的小鼠的肝脏蛋白质获得的西方墨点图。相较于仿真组,Ad36组而非Ad2组中p-AMPK较高且Glut2及G6pase较低($p<.05$)。

[0029] 图9A及9B为展示进食普通饲料的小鼠在基线时(第0周)及感染后达12周时空腹血糖(A)及空腹血清胰岛素(B)的图。相对于仿真组, $*p<.05$ 。

[0030] 图10A至D为展示Ad36、Ad2或仿真组中进食HF饮食的小鼠的感染后血清葡萄糖及胰岛素时程的图。(A)第4周及第8周:调节至基线的空腹血清葡萄糖(第0周)。(B):第12周:在每公克2.5毫克后进行的腹膜内葡萄糖耐受性测试。(C):第20周:自由进食葡萄糖。(D):自第0周起空腹胰岛素的改变。相较于各别研究的仿真组, $*p<.05$ 或更小。

[0031] 图11A至C为展示在3T3-L1(A)前脂肪细胞、(B)脂肪细胞及(C)C2C12肌母细胞中E4orf1表现使基底2DG葡萄糖吸收显著增加的图。图11D为展示在基底以及胰岛素刺激条件

下在HepG2细胞中E4orf1表现使葡萄糖输出显著减少的图。

具体实施方式

[0032] 概述

[0033] 本发明系关于以下发现:Ad36感染与肝脏病理学及功能障碍的发病率减少有关,且Ad36 E4orf1蛋白可用于改变基因表现及生物化学路径,从而使肝脏功能得到改善。基于此等发现,可藉由将Ad36或经分离或重组Ad36 E4orf1蛋白给药个体来治疗或甚至预防非酒精性脂肪肝疾病 (NAFLD)。因此,在此项技术中熟知NAFLD经常因治疗或减少NAFLD的病理过程而发展成NASH,发展成NASH的进展可减少或预防。因此,本发明亦包括用于减少或预防NASH的方法。虽然许多病毒导致严重肝脏损伤 (25, 26), 但意外的是Ad36及Ad36 E4orf1藉由有利地调节多种代谢路径而保护肝脏,藉此对肝脂肪变性及肝脏功能具有有益作用。

[0034] 如本文所用,「血糖控制」系指身体保持葡萄糖含量处于正常范围内的能力。当胰岛素敏感性增强时血糖控制得到改善。胰岛素抗性对血糖控制具有相反作用。

[0035] 如本文所用,「葡萄糖吸收」系指细胞自其周围获取的葡萄糖的量。一般而言,肌细胞或脂肪细胞 (脂肪细胞及前脂肪细胞) 的葡萄糖吸收较高为有益的,因为其自循环中清除葡萄糖且改善高血糖症 (高于血液中的正常葡萄糖)。

[0036] 已发现在人类的天然Ad36感染与较佳血糖控制及较低肝脂质的间存在关联。在动物模型中进一步研究此关联,且结果证实Ad36感染出乎意料地降低肝脂质含量且改善血糖控制。其它研究揭示Ad36作用由Ad36 E4orf1蛋白介导。如本文所述,所进行研究的结果显示Ad36 E4orf1蛋白增加肝脏中的脂肪氧化、增加脂肪自肝脏的转运及减少自肝脏释放的葡萄糖。因此,本发明者已发现病毒蛋白质Ad36E4orf1担负Ad36对NAFLD的保护作用,及对肝脏功能及血糖控制的有益作用。Ad36 E4orf1结构及某些代谢功能描述于作为国际公开案第WO 2007/064836号于2007年6月7日公开的国际申请案第PCT/US2006/045919号中。

[0037] 如本文所示,Ad36的E4orf1蛋白为Ad36病毒对肝脂肪变性的保护作用的介体。经Ad36感染的小鼠甚至在感染后5个月仍继续在其肝脏中表现E4orf1基因。此等肝脏显示显著较低的脂质积聚,及促进脂质氧化及脂质输出的基因的较高表现。此外,Ad36 E4orf1上调脂联素,且以Ad36 E4orf1转染HepG2细胞 (肝细胞细胞株) 下调Glut2丰度及葡萄糖释放。

[0038] 不希望受任何特定理论束缚,咸信脂联素为肝脂肪变性的关键效应物且由脂肪组织分泌。单独Ad36 E4orf1蛋白的表现使细胞的脂联素分泌稳固增加。此表明Ad36经由E4orf1介导的脂联素上调来降低肝脂质积聚。此外,Ad36 E4orf1下调Glut2丰度及葡萄糖释放,此可有助于降低肝脏中的脂质积聚。因此,咸信Ad36藉由直接作用于肝细胞及经由藉由脂联素的间接作用来保护肝脏不发生肝脂肪变性,且E4orf1蛋白为此等作用的介体。

[0039] 治疗方法

[0040] 本发明提供用于治疗或预防NAFLD、减少肝脏的过多脂肪、改善血糖控制及治疗或预防肝脏功能障碍的治疗方法。

[0041] 在一态样中,本发明提供用于治疗及预防非酒精性脂肪肝疾病 (NAFLD) 的症状的方法。向有需要的个体 (例如哺乳动物,诸如人类或其它灵长类动物) 给药治疗有效量的Ad36组成物来治疗或预防NAFLD。

[0042] 在一态样中,本发明提供用于预防NASH的方法。向有需要的个体 (例如哺乳动物,

诸如人类或其它灵长类动物) 给药治疗有效量的Ad36组成物以藉由减少由肝功能障碍引起的高血糖症来预防NASH。

[0043] 在一态样中, 本发明提供用于减少个体(例如, 哺乳动物, 诸如人类或其它灵长类动物) 肝脏中的过多脂肪的方法。向有需要的个体给药治疗有效量的Ad36组成物来减少个体肝脏中的过多脂肪。

[0044] 在一态样中, 本发明提供用于改善个体(例如, 哺乳动物, 诸如人类或其它灵长类动物) 的血糖控制的方法。向有需要的个体给药治疗有效量的Ad36组成物来改善该个体的血糖控制。

[0045] 在一态样中, 本发明提供用于治疗或预防特征在于脂肪肝及/或胰岛素抗性的肝脏功能障碍的方法。向有需要的个体(例如哺乳动物, 诸如人类或其它灵长类动物) 给药治疗有效量的Ad36组成物来治疗或预防特征在于脂肪肝及/或胰岛素抗性的肝脏功能障碍。

[0046] 在本文所述的任何方法的较佳具体实例中, 所给药的Ad36组成物为经分离或重组Ad36 E4orf1蛋白或其功能变异体。在本文所述的任何方法的其它具体实例中, 所给药的Ad36组成物为编码Ad36 E4orf1蛋白或其功能变异体的经分离或重组核酸。

[0047] Ad36组成物

[0048] 根据本发明给药的Ad36组成物可具有多种形式。组成物较佳包含E4orf1或其功能变异体。举例而言, Ad36组成物可为Ad36病毒或Ad36的减毒变异体或不活化形式, 诸如经热杀死或漂白剂杀死的Ad36或复制缺陷型重组Ad36。Ad36组成物可包含经分离或重组Ad36蛋白, 较佳为E4orf1蛋白或其功能变异体。Ad36组成物可包含编码E4orf1蛋白或其功能变异体的核酸。Ad36组成物可包含E4orf1蛋白的类似物, 例如化学类似物或结构类似物。

[0049] 蛋白质及肽

[0050] Ad36组成物可包含经分离或重组Ad36蛋白, 较佳为E4orf1蛋白或其功能变异体。

[0051] 本文中称作「经分离」的蛋白质或多肽为以下蛋白质或多肽: 该等蛋白质或多肽纯化至超过其在受感染哺乳动物细胞中所存在的状态。Ad36蛋白, 包括E4orf1及其功能变异体, 可使用熟知方法(诸如重组表现及纯化)、化学合成(例如合成肽)或藉由生物及化学方法的组合及经分离的重组蛋白质或多肽来制造。所获得的蛋白质可呈至少约50重量%、较佳至少约75重量%的经分离状态, 且更佳呈基本上纯的形式。本文中称作「重组」的蛋白质或多肽为藉由重组核酸的表现所产生的蛋白质或多肽。

[0052] 如本文所用, 「Ad36 E4orf1」系指来自腺病毒36的天然产生或内源性E4orf1蛋白、具有与天然产生或内源性相应Ad36 E4orf1蛋白相同的氨基酸序列的蛋白质(例如重组蛋白质)及上述各物的功能变异体(例如经由突变诱发及/或重组技术产生的功能片段及/或突变体)。因此, 如本文所定义, 该术语包括成熟Ad36 E4orf1、糖基化或未糖基化Ad36 E4orf1蛋白、Ad36 E4orf1的多形或对偶基因变异体及其它同功异构物(例如, 由替代性拼接或其它细胞过程所产生), 及功能片段。

[0053] Ad36 E4orf1的「功能变异体」包括功能片段、功能突变型蛋白质及/或功能融合蛋白。一般而言, 本发明所涵盖的Ad36 E4orf1的片段或部分包括相对于成熟Ad36 E4orf1具有氨基酸(亦即一或多个氨基酸)缺失(亦即一或多个缺失)者(诸如N端、C端或内部缺失)。亦设想相对于成熟Ad36 E4orf1而言仅缺失邻接氨基酸或缺失非邻接氨基酸的片段或部分。一般而言, 本发明所涵盖的Ad36 E4orf1的突变体或衍生物包括差异在于添加、缺失及/

或取代一或多个邻接或非邻接氨基酸残基的天然或人工变异体,或一或多个残基经修饰的经修饰多肽,及包含一或多个经修饰残基的突变体。较佳突变体为差异在于添加、缺失及/或取代一或多个邻接或非邻接氨基酸残基的Ad36 E4orf1的天然或人工变异体。

[0054] Ad36 E4orf1的「功能片段或部分」系指经分离及/或重组蛋白质或寡肽,其具有Ad36 E4orf1所特有的至少一种性质、活性及/或功能,诸如减轻肝脂肪变性、增强葡萄糖处置及/或改善血糖控制。

[0055] 一般而言,Ad36 E4orf1或功能变异体具有在变异体的长度范围内与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4至少约85%相似、至少约90%相似、至少约95%相似、至少约96%相似、至少约97%相似、至少约98%相似或至少约99%相似的氨基酸序列。

[0056] 在一些实施例中,例如使用当前可用的重组蛋白质制备,使用SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3来制备Ad-36 E4orf1的经纯化蛋白质。可使用适合氨基酸序列比对算法,诸如CLUSTAL W,使用预设参数来确定氨基酸序列一致性。(Thompson J.D.等人,Nucleic Acids Res.22:4673-4680(1994))。

[0057] 核酸及载体

[0058] Ad36组成物可包含编码Ad36的蛋白质,较佳E4orf1蛋白或其功能变异体的经分离或重组核酸或载体。

[0059] 可给药具有编码Ad36 E4orf1蛋白或其功能变异体的序列的经分离及/或重组(包括例如基本上纯)核酸来原位产生Ad36 E4orf1。本文称作「经分离」的核酸为自原始来源的基因体DNA或细胞RNA(例如,当其存在于细胞或诸如文库的核酸混合物中时)分离出来的核酸,且可已经历进一步处理。「经分离」核酸包括藉由本文所述的方法、类似方法或其它适合方法所获得的核酸,包括基本上纯的核酸、藉由化学合成产生的核酸、藉由生物及化学方法的组合产生的核酸、及经分离的重组核酸。本文称作「重组」的核酸为藉由重组DNA方法所产生的核酸,包括藉由依赖于人工重组方法的程序所产生的核酸,该人工重组方法诸如聚合酶链反应(PCR)及/或使用限制酶选殖至载体中。「重组」核酸亦为由经由细胞的天然机制所进行的重组事件所产生、但在经设计以允许及可能产生所要重组事件的核酸引入细胞后所选择的核酸。

[0060] 满足此等准则的经分离及/或重组核酸包含序列与编码天然产生的Ad36 E4orf1及其部分的序列一致的核酸,或天然产生的序列的功能变异体。该等变异体包括差异在于添加、缺失或取代一或多个残基的突变体、一或多个残基经修饰的经修饰核酸(例如DNA或RNA类似物)及包含一或多个经修饰残基的突变体。序列可经密码子最佳化或密码子去最佳化以供在个体中表现。

[0061] 在一态样中,Ad36 E4orf1或功能变异体具有在变异体的长度范围内与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3至少约85%相似、至少约90%相似、至少约95%相似、至少约96%相似、至少约97%相似、至少约98%相似或至少约99%相似的核酸序列。可使用适合核酸序列比对算法,诸如CLUSTAL W,使用预设参数来确定核酸序列一致性。(Thompson J.D.等人,Nucleic Acids Res.22:4673-4680(1994))。

[0062] 核酸可呈DNA、RNA形式,且可为单股或双股。一般而言,核酸可操作地连接至表现控制序列,诸如复制起点、激活子及强化子(参见例如Queen,等人,Immunol.Rev.89:49-68,1986)。用于在所细胞中表现重组蛋白质的许多适合载体为此项技术中所熟知及习知。适

合载体可含有多种组分,包括(但不限于)以下一或多个:复制起点;可选择标记基因;一或多个表现控制组件,诸如转录控制组件(例如激活子、强化子、终止子),及/或一或多个转译信号;及靶向所选宿主细胞中的分泌路径的信号序列或前导序列。必要时,载体可包括可侦测标记。

[0063] 在某些实施例中,表现载体用于基因疗法中。表现需要在载体中提供适当信号,且其包括来自病毒及哺乳动物来源的驱动所关注基因在宿主细胞中表现的各种调节组件,诸如强化子/激活子。亦已知经设计以最佳化宿主细胞中的信使RNA稳定性及可转译性的组件。

[0064] 存在多种可供将表现载体引入细胞中的方式。在本发明的某些实施例中,表现构筑体包含病毒或来源于病毒基因体的经工程改造的构筑体。某些病毒经由受体介导的内饮作用进入细胞、整合至宿主细胞基因体中及稳定且有效地表现病毒基因的能力使其成为用于将外来基因转移至哺乳动物细胞中的有吸引力的候选者(Ridgeway,1988;Nicolas及Rubinstein,:Vectors:A survey of molecular cloning vectors and their uses,Rodriguez及Denhardt编,Stoneham:Butterworth,第494-513页,1988.;Baichwal及Sugden,Baichwal,:Gene Transfer,Kucherlapati R编,New York,Plenum Press,第117-148页,1986.1986;Temin,:Gene Transfer,Kucherlapati,R编,New York,Plenum Press,第149-188页,1986)。较佳基因疗法载体一般为病毒载体。

[0065] 给药Ad36 E4orf1

[0066] 可能利用多种投药途径,包括(但不必限于)非经肠(例如静脉内、动脉内、肌肉内、皮下注射)、经口(例如饮食)、局部、吸入(例如支气管内、鼻内或经口吸入、鼻内滴剂)或经直肠。

[0067] 可藉由将编码腺病毒-36 E4orf1蛋白的核酸序列以允许腺病毒-36 E4orf1蛋白表现的方式引入哺乳动物体内来给药腺病毒-36 E4orf1蛋白。在该方法中,可藉由选自由以下者所组成的群组的方法引入核酸序列:电穿孔、DEAE聚葡萄糖转染、磷酸钙转染、阳离子性脂质体融合、原生质体融合、产生活体内电场、经DNA涂布的微弹轰击、注射重组复制缺陷型病毒、同源重组、活体内基因疗法、活体外基因疗法、病毒载体及裸DNA转移。

[0068] 欲给药的Ad36组成物的调配物将根据所选择的投药途径(例如溶液、乳液、胶囊)及欲治疗的个体而变化。可在生理上可接受的媒剂或载剂中制备包含欲给药的化合物的适当组成物。对于溶液或乳液,适合载剂包括例如水溶液或醇/水溶液、乳液或悬浮液,包括盐水及缓冲介质。非经肠媒剂可包括氯化钠溶液、林格氏右旋糖(Ringer's dextrose)、右旋糖及氯化钠、乳酸化林格氏溶液(lactated Ringer's)或不挥发性油。静脉内媒剂可包括各种添加剂、防腐剂或流体、营养素或电解质补充剂(一般而言,参见Remington's Pharmaceutical Science,第16版,Mack编,1980)。对于吸入,将化合物溶解且装载至适合投药分配器中(例如雾化器、喷雾器或加压气雾剂分配器),或调配成可吸入干粉。

[0069] Ad36组成物可以单次剂量或多次剂量给药。给药治疗有效量。治疗有效量为在投药条件下足以产生预期效果的量。举例而言,可给药足以增加脂肪氧化、增加脂肪输出肝脏、降低肝脏中的Glut2丰度、减少肝脏中的G6Pase、提高脂联素及/或Glut4、改善血糖控制及/或改善肝脏功能的量。可由熟习普通技术的临床医师使用此项技术中已知的方法考虑个体的年龄、对药物的敏感性、耐受性药物、疾病严重程度及总体健康状况以及其它因素来

确定适当剂量。适合剂量可为每次治疗每公斤体重约0.1mg至约10.0mg。

[0070] 给药Ad36组成物的个体可经由非侵袭性测试(例如使用超音波)筛选以确定治疗是否有效。在一些态样中,将使用超音波筛选个体。在一些态样中,个体将经历肝脏功能测试以量测肝脏酶。

[0071] 藉此本文引用的所有文献的全部教示内容以引入的方式并入本文中。

[0072] Ad36 E4orf1序列

[0073] Ad-36 E4 orf 1 DNA序列(SEQ ID NO.1)

[0074] ATGGCTGAATCTCTGTATGCTTTCATAGATAGCCCTGGAGGGATCGCTCCCGTCCAGGAAGGGGCTAGC
AATAGATATATCTTCTTTTGGCCGAATCTTTCACATTCCTCCGCATGGGGTGATATTGCTTCACCTCAGAGTGAG
CGTGCTGGTTCCTACTGGATATCAGGGCAGATTTATGGCCTTGAATGACTACCATGCCAGGGGCATACTAACCCAGT
CCGATGTGATATTTGCCGGGAGAAGACATGATCTCTCTGTGCTGCTCTTTAACCACACGGACCGATTTTTGTATGTC
CGCGAGGGCCACCCAGTGGGAACCCTGCTGCTGGAGAGAGTGATTTTTCCTTCAGTGAGAATAGCCACCCTGGTTTA
G

[0075] Ad-36 E4 orf 1蛋白转译(SEQ ID NO.2)

[0076] MAESLYAFIDSPGGIAPVQEGASNRYIFFCPESFHIPPHGVILLHLRVSVLVPTGYQGRFMALNDYHAR
GILTQSDVIFAGRRHDLVLLFNHTDRFLYVREGHPVGTLLLERVIFPSVRIATLV

[0077] Ad-36 E4 orf 1 ΔPDZ DNA序列(SEQ ID NO.3)

[0078] ATGGCTGAATCTCTGTATGCTTTCATAGATAGCCCTGGAGGGATCGCTCCCGTCCAGGAAGGGGCTAGC
AATAGATATATCTTCTTTTGGCCGAATCTTTCACATTCCTCCGCATGGGGTGATATTGCTTCACCTCAGAGTGAG
CGTGCTGGTTCCTACTGGATATCAGGGCAGATTTATGGCCTTGAATGACTACCATGCCAGGGGCATACTAACCCAGT
CCGATGTGATATTTGCCGGGAGAAGACATGATCTCTCTGTGCTGCTCTTTAACCACACGGACCGATTTTTGTATGTC
CGCGAGGGCCACCCAGTGGGAACCCTGCTGCTGGAGAGAGTGATTTTTCCTTCAGTGAGAATATAG

[0079] Ad-36 E4 orf 1 ΔPDZ蛋白转译(SEQ ID NO.4)

[0080] MAESLYAFIDSPGGIAPVQEGASNRYIFFCPESFHIPPHGVILLHLRVSVLVPTGYQGRFMALNDYHAR
GILTQSDVIFAGRRHDLVLLFNHTDRFLYVREGHPVGTLLLERVIFPSVRI

[0081] 实施例

[0082] 本文揭示的研究结果揭示在人类的Ad36感染与较低肝脂质含量及较佳血糖控制的间存在关联。结果亦表明Ad36 E4orf1蛋白为Ad36病毒的保护作用的介体且该作用可能经由改变若干基因(包括脂联素及Glut2丰度)的表现来介导。因此,本文揭示的此等研究表明Ad36、Ad36 E4orf1及其功能变异体可用于治疗或预防NAFLD、减少哺乳动物肝脏中的过多脂肪、改善血糖控制及治疗或预防肝脏功能障碍。

[0083] 技术及分析:

[0084] 病毒制备。Ad-36系获自美国菌种保存中心(American Type Culture collection)(ATCC目录号VR913),如先前所描述及使用(45,44),经溶菌斑纯化且在A549细胞(人类肺癌细胞株)中繁殖。Ad-2亦获自ATCC(目录号VR846)且在A549细胞中繁殖。病毒效价藉由溶菌斑分析(45)测定且接种表述为溶菌斑形成单位(PFU)。

[0085] b.生物化学分析:

[0086] 葡萄糖:使用Raichem葡萄糖氧化酶方法(R80038)以96孔板格式量测来自每只小鼠的2μL血清。在500nm下读取吸光度。胰岛素:使用超敏感性小鼠胰岛素ELISA套组

(Crystal Chem, 编号90090) 来测定胰岛素。使用Cardiochek脂质组成测试条 (Lipid panel test strip) 来测定三酸甘油酯。

[0087] qRT-PCR: 使用RNeasy微型套组根据制造商的说明书 (Qiagen, 编号74101) 自进食高脂肪饲料的小鼠的脂肪组织萃取mRNA。藉由使用扩增级去氧核糖核酸酶I (Invitrogen, 编号18068-015) 来去除残余DNA。使用iscript™ cDNA合成套组 (BioRad, 编号170-8890) 根据制造商的方案将1μg总RNA反转录成cDNA。使用PCR核心系统II (Promega, 编号M7665) 来扩增cDNA。进行定量RT-PCR来检验基因TNFα (肿瘤坏死因子α, Applied Biosystems, 编号Mm00443259_g1)、抵抗素 (Resistin) (Applied Biosystems, 编号Mm00445641_m1)、MCP-1 (巨噬细胞化学引诱剂蛋白; Applied Biosystems, 编号Mm00441243_g1)、CD68 (Applied Biosystems, 编号Mm03047343_m1)、TLR4 (Toll样受体4; Applied Biosystems, 编号Mm00445274_m1)、MCSF (巨噬细胞群落刺激因子; Applied Biosystems 编号Mm00432688_m1) 及IL6 (介白素6; Applied Biosystems, 编号Mm00446191_m1) 相较于GAPDH (甘油醛3磷酸去氢酶; Applied Biosystems, 编号Mm99999915_g1) 的相对表现量。藉由T检验比较平均值。显著性设置为 $p < 0.05$ 。

[0088] c. 证实感染:

[0089] 抗体效价:

[0090] 藉由『恒定病毒降低血清 (constant virus-decreasing serum)』方法 (一种用于测定中和抗体的敏感性、特异性及最高准则分析, 如所详细描述 (92)) 来测定血清中中和抗体的存在。简言之, 在96孔板中将热不活化测试血清自1:2起连续稀释 (两倍) 至1:512。向各孔中添加总共100TCID₅₀ (组织培养感染剂量50) 各别腺病毒工作储备液, 随后在37℃下培育1小时后添加A549细胞。一式两份操作各测试血清。各分析中包括血清对照 (血清及细胞, 但无病毒)、细胞对照 (单独细胞, 无病毒, 无血清) 及病毒对照 (细胞及病毒, 无血清)。将各板在37℃下培育13天且记录CPE (细胞病变效应) 的存在。稀释度为1:8或更高的无CPE的血清样品视为对于针对各别病毒的中和抗体的存在为阳性, 及先前受到该病毒感染的证据。效价低于1:8的样品视为关于病毒抗体的存在为阴性。在各分析中进行病毒反滴定作为品质检查。

[0091] 筛选病毒DNA及RNA:

[0092] DNA分离: 使用QIAMP DNA微型套组 (编号51306) 分离DNA。针对Ad36、Ad2的E4基因以及小鼠β-肌动蛋白设计引子。藉由PCR扩增DNA。引子序列如下:

[0093] Ad36前置引子: 5'-GGCATACTAACCCAGTCCGATG-3',

[0094] Ad36反置引子: 5'-TCACTCTCAGCAGCAGCAGG-3';

[0095] Ad2前置引子: 5'-CCTAGGCAGGAGGGTTTTTC-3',

[0096] Ad2反置引子: 5'-ATAGCCCGGGGAATACATA-3';

[0097] 小鼠β-肌动蛋白前置引子: 5'-GATCTTCATGGTGCTAGGAG-3',

[0098] 小鼠β-肌动蛋白反置引子: 5'-ACGTTGACATCCGTAAAGAC-3'。

[0099] 阴性PCR对照: 水。阳性PCR对照: 来自经Ad36或Ad2感染的A549细胞的DNA。在95℃下使DNA变性2分钟且经受35个PCR循环 (94℃下1分钟, 55℃下1分钟, 72℃下2分钟随后在72℃下培育5分钟)。使用RNeasy微型套组根据制造商的说明书 (Qiagen, 编号74101) 萃取RNA。藉由使用扩增级去氧核糖核酸酶I (Invitrogen, 编号18068-015) 来去除残余DNA。使用

iscript™ cDNA合成套组 (BioRad, 编号170-8890) 根据制造商的方案将1μg总RNA反转录成cDNA。使用PCR核心系统II (Promega, 编号M7665) 来扩增cDNA。

[0100] d. 葡萄糖耐受性测试:

[0101] 在16小时空腹的后,向神智清醒的小鼠腹膜内注射D-葡萄糖(每公克体重2.5mg)。在注射葡萄糖的前(时间0)及注射后10分钟、20分钟、30分钟、60分钟、120分钟及150分钟自尾静脉收集血液。使用血糖计 (Contour, Bayer) 测定血糖。

[0102] e. 西方墨点分析:

[0103] 免疫沉淀:为进行IR、IRS1及IRS2的免疫沉淀,将组织样品在含有50mM HEPES (pH 7.4)、2mM原钒酸钠、10mM氟化钠、2mM EDTA、1%NP-40、0.25%去氧胆酸钠及蛋白酶抑制剂的缓冲液中均质化。随后用3μg一级抗体对匀浆(250μg)进行免疫沉淀。样品使用4-20%梯度凝胶进行SDS-PAGE并转移至PVDF膜。用抗磷酸抗体对该等膜进行免疫墨点法。使用针对磷酸化-tyr-1322-Ir-β (Millipore, 编号04-300) 及总IR-β受体 (Millipore, 编号05-1104)、总IRS1 (Santacruz, 编号Sc-559) 及pIRS1-(tyr-989) (Santacruz, 编号Sc-17200)、pIRS1-(ser307) (Cell signaling, 编号2381)、IRS2 (Milipore, 编号06-506) 及p-IRS2 (tyr-612) (Santacruz, 编号Sc-17195-R) 的抗体。

[0104] 西方墨点法:藉由二辛可宁酸(bicinchoninic acid)分析对蛋白质浓度进行定量且以相等量负载至4%-20%或聚丙烯酰胺凝胶。随后将蛋白质转移至PVDF膜。将膜在含有3%BSA的PBS Tween-20中阻断且与分别识别总AKT (Cell signaling, 编号4691)、p-AKT (ser-473) (Cell signaling, 编号9271)、Ras (Cell signaling, 编号3965)、Glut1 (Abcam, 编号35826)、Glut4 (Abcam, 编号14683)、Glut2 (Santacruz, 编号9117)、葡萄糖6-磷酸酶 (Santacruz, 编号7291)、总AMPKα (Cell signaling, 编号2603)、p-AMPKα (Thr-172) (Cell signaling, 编号2535) 及瘦素(leptin) (Abcam, 编号2095) 抗体的多株或单株抗体一起培育。在与辣根过氧化物酶(horse reddish peroxidase)结合的二级抗体后,藉由增强型化学发光(enhanced chemiluminescence)侦测信号。使用AlphaEaseFC分析器软件以扫描光密度测定法对特定频带进行定量且藉由针对GAPDH (Ambion, 编号4300) 丰度进行正规化来评估相等负载。

[0105] 分析脂联素的不同寡聚物形式:用不含DTT、β-巯基乙醇的5X非还原缓冲液处理30 μg自脂肪组织分离的蛋白质且在室温下培育1小时。样品在4%-20%Tris-甘氨酸SDS-PAGE凝胶上电泳且转移至PVDF膜。使用脂联素的抗球蛋白域抗体 (Millipore, 编号MAB3608, Temmeccula, CA) 进行西方墨点法。

[0106] f. 组织化学:

[0107] 对3只小鼠(各来自Ad36、Ad2及仿真感染的进食高脂肪饲料的小鼠)及一只如所报告(41)作为对照的仿真感染的进食普通饲料的小鼠的急骤冷冻肝脏样品进行肝糖染色。将组织样品嵌入OCT固定介质中且以8μm厚度切片。使用过碘酸希夫氏染色(periodic acid-schiff stain; PAS)对肝糖进行染色。在4℃下固定肝脏样品10分钟以提高肝糖保存且帮助防止人工产物流至卡诺依氏固定液(Carnoy's fixative) (6份乙醇、3份氯仿及1份冰乙酸)。固定后,切片在蒸馏水中经由冲洗数次进行洗涤,且随后在室温下在1%过碘酸溶液中培育5分钟。在用蒸馏水洗涤后,添加希夫氏试剂(Schiff's reagent)且培育11分钟。所有载玻片在冷的流动自来水中冲洗10分钟。将载玻片风干且使用permount施加盖玻片。肝糖

染色使切片呈洋红色,其中较深的染色指示较多肝糖。

[0108] 在固定期间脂质离开样品,且因此载玻片上的白色空白区域指示脂质小滴(96)。用Zeiss Axioskop 40 FL产生影像。使用影像J来分析每份样品的三份试样及每份试样的三个影像以便定量肝糖及脂质。将影像转换成8位,且仅可见肝糖特异性染色时确定临限值,且在此临限值下肝糖的量计算为像素2。自总面积中减去此数值以获得空白空间的面积,从而定量脂质,如所报告(96)。

[0109] 实施例1

[0110] Ad36及人类

[0111] 针对Ad36抗体作为既往感染的指示筛选来自四个群组的血清样品。该等群组为: A) HERITAGE家庭研究(49)(n=671,白人及黑人男性及女性); B) PBRC(彭宁顿生物医学研究中心(Pennington Biomedical Research Center))研究(206名白人及黑人男性及女性); C) MET研究(50,51)(n=45,青春期前白人及黑人男孩及女孩); D) VIVA LA家族研究(52)(585名西班牙男孩及女孩)。Ad36抗体的出现率在HERITAGE、PBRC、MET及Viva La家族研究中分别为13%、18%、22%及7%。较佳血糖控制的各种指针(包括胰岛素敏感性或素因指数)与此等群组中的Ad36感染显著相关,而与年龄、性别、种族及肥胖无关(例如表1及表2展示PBRC及MET群组)。重要的是,Ad36与较佳血糖控制的关联在超过1,500名个体的不同年龄组及种族的此等群组中显著一致。此等资料表明Ad36感染可改善人类的血糖控制。

[0112]

	Ad36-	Ad36+
N=206	N=169	N=37

[0113]

空腹葡萄糖 (mg/dL)	96.9 (92.6, 101.3)	92.3* (87.1, 97.6)
空腹胰岛素 (μU/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)
肝密度** (HU)	10.7 (8.5, 13.4)	13.0* (9.9, 17.2)

[0114] 表1:PBRC研究(n=206;黑人/白人/其它74/118/14),平均值(95%CI),相对于年龄、性别、种族及体脂肪质量进行调整。*p<0.05或更佳。**针对脾脏密度进行正规化。较高的HU值等于较低的脂质含量。

[0115]

	Ad36-	Ad36+
N=45	N=35	N=10
空腹葡萄糖 (mg/dL)	74.5 (71.6-77.4)	68.7* (62.9-74.6)
空腹胰岛素 (μU/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)
肝内脂质(%水峰值)	0.005 (0.002-0.006)	0.003* (0.004-0.008)

[0116] 表2:MET研究,青春期前男孩及女孩(n=45;黑人/白人/其它;10/32/3)。平均值^a(95%CI),相对于性别及体脂肪质量进行调整。^a对于葡萄糖为算术平均值;对于胰岛素HOMA-IR及肝内脂质为几何平均值。

[0117] 实施例2:

[0118] Ad36改善进食普通饲料的小鼠的胰岛素敏感性

[0119] 年龄、体重及体脂肪匹配的雌性C57BL/6J小鼠进行仿真感染或用Ad36或Ad2感染且保持标准饮食。4周龄雌性C57BL/6J小鼠购自Jackson实验室(Bar Harbor, Maine, USA)。适应1周后,藉由Bruker Minispec mq10NMR(核磁共振)分析器测定总体脂肪。将小鼠分为体重及体脂肪相匹配的3组且用107PFU的Ad36 (N=3) 或Ad2 (用作对照的普通人类腺病毒; N=4) 鼻内、经口及腹膜内接种或用组织培养基 (n=6) 仿真感染。使小鼠在25℃下处于12小时光-暗循环且在一房间中在生物安全性2级密封度下圈养于微型隔离笼中,且允许随意获取水及啮齿动物普通饲料(Purina LabDiet 5001)。

[0120] 在12周实验期间,该3组小鼠的总体重未显示出差异。

[0121] 针对腺病毒的中和抗体,及/或各种小鼠组织中对于病毒DNA及/或mRNA的PCR分析证实仿真感染或由预期病毒感染(表3)。在感染前,尽管所有3组小鼠的间具有类似的基线空腹血清葡萄糖及胰岛素含量,但仅经Ad36感染的小鼠的此等含量随实验过程逐渐减少(图3A及B)。此外,在感染后12周(pi),经Ad36-感染的小鼠的腹膜后脂肪垫及肝脏的质量分别为仿真感染小鼠的2倍高 ($p<0.03$) 或低10% ($p<0.04$) (表4,图1)。因此,在进食标准普通饲料的小鼠中,Ad36感染而非Ad2感染藉由减少空腹葡萄糖及胰岛素含量而改善全身血糖控制。

[0122] 表3:显示病毒抗体、病毒DNA及RNA的小鼠的百分比。

[0123]

组	抗体 Ad36/Ad2	病毒 DNA/病毒 RNA			
		肝	脂肪组织	肺	肾
实验 2: 进食普通饲料的小鼠					
仿真		0/0		0/0	
Ad36		100 / 100		100 / 100	
Ad2		100 / 100		100 / 100	
实验 3: 进食 HF 饮食的小鼠					
仿真	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

[0124] NA:在此等样品中未测定病毒RNA。

[0125] 表4:进食普通饲料的小鼠的基线及最终特征。平均值±SE。

[0126]

	仿真	Ad36	Ad2	p
N	6	3	4	
体重 (g) -第 0 周	16.3±1.1	16.9±0.21	16.2±0.44	NS
体脂肪 (g) 第 0 周	2.1 ± 0.2	2.3 ± 0.2	2.0 ± 0.1	
体重 (g) 第 12 周	22.3± 0.8	23.8±1.7	22.5±1.5	NS
腹膜后脂肪 (g) 第 12 周	0.18 ± 0.06	0.37±0.15*	0.25±0.13	* p<.05, 相对于仿真
肝脏 (g)	1.00±0.09	0.9±0.1*	0.99±0.21	* p<.05, 相对于仿真

[0127] 每周一次量测体重,且自空腹4小时的经麻醉小鼠的眼眶内眼球后窦(intra orbital retrobulbar sinus)获取血液样品。在感染后12周处死小鼠。收集躯干血液且分离血清。仔细地分离肝脏、腹膜后脂肪蓄积,称重且在液氮中急骤冷冻并储存于-80℃下直至使用。使用血清来测定葡萄糖及胰岛素。

[0128] 藉由史都登氏『t』试验(student's『t』test)分析体重、肝脏、脂肪垫重量、及葡萄糖及胰岛素含量的差异。机率度设置为 $p < 0.05$ 。

[0129] 实施例3:

[0130] Ad36改善进食高脂肪饲料的小鼠的高血糖症

[0131] 此实验研究Ad36是否在以造成饮食诱发的高血糖症的高脂肪(HF,60千卡%)饮食所产生的糖尿病小鼠中具有类似作用。

[0132] 在发展成如由高空腹血清葡萄糖含量($>200\text{mg/dL}$)所表明的糖尿病病况的前8周以HF饮食饲喂年龄、体重及体脂肪匹配的雄性C57BL/6J小鼠(14周龄)。此时,小鼠进行仿真感染或以Ad36或Ad2感染。在感染后20周,所有3组显示类似累积食物摄入,以及总体重及脂肪垫质量(表5,图2)。14周龄雄性C57B6/6J小鼠购自Jackson实验室(Bar Harbour, Maine, USA),其在6周龄开始饲喂高脂肪(60千卡%)饮食(Research Diets公司D12492i)。适应1周后,藉由NMR测定基线体脂肪且将小鼠分成体脂肪及体重相匹配的3组(每组 $n=10$)。该等组以鼻内、腹膜内及经口方式进行Ad36($0.6 \times 10^6\text{PFU}$)、Ad2($3 \times 10^6\text{PFU}$)或仿真感染,且再持续进食高脂肪饮食(60千卡%)20周。使小鼠在25℃下处于12小时光-暗循环且在一房间中在生物安全性2级密封度下单独圈养于微型隔离笼中。食物消失且在16周中每周一次量测体重,且自经麻醉小鼠的眼眶内眼球后窦获取血液样品。在移除食物后4小时收集空腹样品。在自由进食状态下接种后20周处死小鼠。收集躯干血液且分离血清。仔细地分离肝脏、附睾、腹膜后脂肪蓄积,称重且在液氮中急骤冷冻并储存于-80℃下直至使用。

[0133] 在感染期后20周,藉由测定空腹葡萄糖及胰岛素、葡萄糖耐受性测试以及藉由测定自由进食状态下的葡萄糖含量来以多种方式评估血糖控制。如所预期,由于HF饮食诱发的胰岛素抗性,仿真感染的小鼠显示空腹血清葡萄糖及胰岛素含量增加,然而,此等增加分别在感染后8周或感染后4周的经Ad36感染的小鼠中显著减弱(图3C及3D及4A)。经Ad36感染的小鼠亦在感染后12周响应于腹膜内葡萄糖耐受性测试(ipGTT)显示显著较快的血糖清除(图3E)及在感染后20周显示较低自由进食血清葡萄糖含量(图3F及4B)。实际上,在感染后20周,所有经Ad36感染的小鼠的自由进食血清葡萄糖含量均在仿真感染小鼠中所测得的含量的50%以下(图4B)(x 测试 $p=0.01$)。尽管在此实验中使用相比于Ad36剂量达5倍高的Ad2,但相较于仿真感染的对照小鼠,经Ad2感染的小鼠仍未能显示显著改善的血糖代谢障碍。因此,在空腹及进食条件下在糖尿病小鼠中Ad36感染均同样特异性地改善血糖反应。

[0134] 表5:进食HF的小鼠的基线及最终特征。平均值 $\pm$ SE。

[0135]

	仿真	Ad36	Ad2	p
N	10	10	10	
体重 (g) 第0周	36.2±0.9	36.1±1.1	37.3±1.0	NS
体重 (g) 第20周	51.5±0.8	48.3±2.1	50.7±1.2	NS
累积食物摄入 (g) (在感染后16周量测)	186±9.2	186±13.3	184±13.7	
总体脂肪 (g) 第0周	10.5±0.8	10.7±0.7	11.5±1.0	NS
体脂肪 (g) 第20周 附睾 腹膜后	1.4±0.05 ±0.02	1.4±0.1 ±0.05	1.5±0.2 ±0.03	NSNS
肝脏 (g)	2.7±0.1	2.3±0.1*	2.4±0.2	*p<.05, 相对于仿真
血清三酸甘油酯 (mg/dL) 第	71.6 ± 1.7	71.2 ± 0.9	71.5 ± 1.2	*p<.05, 相对

[0136]

0周 第8周	70.4±2.1	68.3±1.2*	69.3±1.0	于Ad36的第0周
--------	----------	-----------	----------	-----------

[0137] 对来自实施例2的小鼠进行的西方墨点 (WB) 分析揭示与试管内资料一致 (76,12), 相较于感染后20周的仿真感染小鼠 (图5), 如Ras及磷酸-Akt在骨骼肌、脂肪组织及肝脏中的较高丰度所指示, Ad36上调Ras-PI3K路径。对于经Ad36感染的小鼠, 骨骼肌及脂肪组织中的较高Glut4及Glut1蛋白丰度表明Ad36藉以增加此等组织中的葡萄糖吸收的机制, 而肝脏中的较低Glut2丰度及葡萄糖-6-磷酸酶 (G6Pase) 表明Ad36减少肝葡萄糖释放 (图5C), 此又可促成较佳血糖控制。如所预期, 进食HF饮食的小鼠的肝脏切片与进食标准普通饲料的小鼠相比显示较少肝糖及较多脂质 (图6A)。然而, 在进食HF饮食的小鼠中, 相较于仿真感染小鼠, 经Ad36感染的小鼠的肝脏显示防止HF饮食的病理性影响的较高保护性, 如由肝糖增加及较低脂质含量所表明 (图6A至6C) ($p<0.02$)。由Ad36介导的对HF饮食诱发的肝脏病理学的保护作用与吾等人类资料一致, 在感染Ad36的成人及青春期前少年两者中均显示较低肝脂质积聚。因此, 本文呈示的发现支持一种模型, 其中Ad36增加骨骼肌及脂肪组织的葡萄糖吸收并减少肝脏的葡萄糖释放, 藉此显著改善动物的全身性血糖控制。

[0138] 藉由史都登氏 [t] 试验分析食物摄入、体重、肝脏、脂肪垫重量、及葡萄糖及胰岛素含量的差异。机率度设置为 $p<0.05$ 。

[0139] 实施例4:

[0140] Ad36改善脂肪组织的代谢型态的标记

[0141] 使用来自在感染后20周在自由进食状态下处死的进食HF饲料的小鼠的脂肪组织蛋白质如上所述进行西方墨点法 (每组3只小鼠)。GAPDH用作负载对照。如由较高AKT磷酸化及较高Glut4及Glut 1丰度所指示, Ad36似乎上调PI3K路径及下游葡萄糖吸收。响应于感染, Ad2而非Ad36组中的脂肪组织相较于仿真组具有较高巨噬细胞浸润 ($p<.05$)。重要的是,

Ad36组具有显著较高的脂联素丰度(图4A),脂联素为关键胰岛素增敏剂及葡萄糖吸收促进剂(53)以及对抗肝脂肪变性的保护剂(54)(55)。脂联素以较高、中等及较低分子量(MW)形式存在,不过较高MW形式与胰岛素敏感性的关联最强(56,57)。Ad36显著增加进食HF饮食的小鼠的脂肪组织中所有形式的脂联素的含量(图7B)。始终观察到脂联素受Ad36上调,包括其在经Ad36感染的人类脂肪组织外植体中显著较高的mRNA及蛋白质丰度(12)。此等改变共同指示Ad36改善脂肪组织的代谢品质。考虑到脂联素的强烈肝作用(54,55),咸信脂联素为Ad36的抗脂肪变性作用的关键介体。

[0142] 实施例5:

[0143] Ad36减轻脂肪变性并改善肝脏中的代谢型态

[0144] 进食HF饮食的小鼠的肝脏切片与进食标准普通饲料的小鼠相比显示较少肝糖及较多脂质(图6A)。然而,在进食HF饮食的小鼠中,相较于仿真感染组,经Ad36感染的小鼠的肝脏显示防止HF饮食的不良影响的较高保护性,如由肝糖增加及较低脂质含量所表明(图6A)($p < .02$)。Ad36组的肝脏中的较低Glut2丰度及葡萄糖-6-磷酸酶(G6Pase)(图8)表明肝葡萄糖释放减少,其又可促成较佳血糖控制。Ad36而非Ad2组的肝脏显示较高AMPK-磷酸化,其为脂联素保护肝脏以防止脂肪变性的已知目标(54)。

[0145] 肝脏mRNA:测试进食普通饲料(图9)或进食HF饲料的小鼠(图10)的肝脏中所选基因的表现。尽管此等分子亦在多个路径中执行重叠作用,但吾人考虑FAS(脂肪酸合成酶)、SREBP1c(固醇反应组件结合蛋白1c)及FOXO1(叉头框O1(Forkhead Box O1))作为脂质生成的调节剂(58);CPT1(肉碱棕榈酰基转移酶)、LXR(肝脏X受体)及PPAR α 指示脂质氧化(59-61);且MTP(微粒体三酸甘油酯转移蛋白)及ApoB(脂蛋白元B)作为脂质输出的指针(62-66)。由于与炎症结合的肝脂肪变性可为发展成NASH的信号,因此测定炎症的标记。在接种后12至20周测定肝基因表现(表3)。虽然该种长期及HF饮食可掩蔽一些改变,但来自进食普通饲料及进食HF饲料的小鼠的基因表现共同表明Ad36在肝脏中减少脂质生成、上调脂质氧化及输出,以及减少炎症(表6)。

[0146]

饮食	脂质生成			脂质氧化					脂质输出		炎症			
	FAS	SREBP1c	FOXO1	AdipoR1	AdipoR2	CPT1	LXR	PPAR α	ApoB	MTP	IL6	IL10	INF γ	TNF α
普通饲料	NS	NS	↑*	↑*	↑*	↑*	NS	↑*	↑*	↑*	↓(.06)	NS	NS	NS
HF	NS	↑(.08)	↑(.07)	NS	NS	NS	NS	NS	↑*	NS	↓*	NS	↓*	↓*

[0147] 表6:进食普通饲料或HF饮食的小鼠的的肝脏中的基因的表现的qRT-PCR资料。箭头指示相较于仿真感染组,由Ad36诱导的改变的方向。* $p < .05$ 或更佳。若p值介于.05与0.1的间,则所表示的p值亦指示趋势。NS:无显著差异。

[0148] 实施例6:

[0149] Ad36 E4orf1减轻肝脂肪变性而无体重减轻

[0150] 在独立实验中,用E4orf1或空pcDNA载体转染HepG2细胞或小鼠初级肝细胞。在转染后48小时测定HepG2细胞的棕榈酸酯氧化及apoB分泌,以及初级肝细胞的基底及升糖素

刺激的葡萄糖输出。

[0151] 相较于空载体转染的细胞,E4orf1使脂肪氧化增加2倍 ($p<0.0001$),且使apoB分泌增加1.5倍 ($p<0.003$),以及使基底及升糖素刺激的葡萄糖输出分别减少45% ($p=0.0008$)及22% ($p<0.02$)。

[0152] 肝细胞的此试管内转染显示E4orf1介导Ad36对肝代谢的作用。资料显示在肝细胞中,Ad36 E4orf1增加脂肪氧化及脂肪输出至肝脏外部的转运,且减少葡萄糖释放。

[0153] 实施例7:

[0154] E4orf1诱导PPAR γ

[0155] PPAR γ 为脂肪生成的主要调节剂,脂肪生成成为身体制造脂肪细胞的过程。Ad36上调PPAR γ ,诱导脂肪生成,增加脂联素及改善血糖控制。此研究探查脂联素表现是否可与PPAR γ 诱导或脂肪生成去偶联。

[0156] 以下细胞类型用人类腺病毒Ad36或Ad2感染,或进行仿真感染:a)具有完整PPAR γ 的3T3-L1小鼠胚胎纤维母细胞(MEF);b)具有异常PPAR γ 表现的NIH/3T3MEF;及c)来自PPAR γ 基因剔除小鼠的MEF(MEF $^{-/-}$)。尽管下调或不存在PPAR γ ,但与仿真或Ad2感染的细胞相比,Ad36增强细胞葡萄糖吸收、脂联素、Glut4及Glut1蛋白丰度。如所预期,脂肪生成诱导作用增加3T3-L1而非NIH/3T3或MEF $^{-/-}$ 中的脂质。此指示Ad36上调葡萄糖吸收及脂联素分泌而不募集PPAR γ 或增强脂肪生成。在人类中,如由Ad36抗体的存在所确定的天然Ad36感染预测较高脂联素含量,表明此等作用的治疗相关性。此进一步强化吾人提出的主张:与TZD的作用不同,E4orf1可能改善葡萄糖吸收而不增加体脂肪。

[0157] 实施例8

[0158] E4orf1蛋白增强葡萄糖处置

[0159] 开发响应于多西环素(doxycyclin)(3T3-E4)诱导性表现E4orf1的稳定3T3-L1细胞株来研究细胞信号转导及测试Ad36是否需要其E4orf1蛋白来上调3T3-L1前脂肪细胞中的葡萄糖吸收。相较于仿真感染细胞,Ad36使基底葡萄糖吸收增加3倍,当以siRNA阻断E4orf1的基因表现时则使该增加消除。此表明Ad36经由E4orf1增强细胞的葡萄糖吸收。相较于具有空载体的细胞,3T3-E4细胞以诱导依赖性方式增加葡萄糖吸收。E4orf1使Ras的丰度及活化增加,Ras为Ad36诱导的葡萄糖吸收中的专性分子。详言的,E4orf1活化H-Ras同功异构物。因此,E4orf1使Ad36的抗高血糖作用缩窄至单一蛋白质。

[0160] 实施例9

[0161] E4orf1调节脂肪细胞及肝细胞中的葡萄糖处置

[0162] 在独立实验中,用表现E4orf1(pcDNA-V5-AD36-E4orf1)或空载体(pcDNA-V5-DEST)的经V-5卷标记的质体转染3T3-L1前脂肪细胞或脂肪细胞、C2C12肌母细胞或HepG2肝细胞。

[0163] 考虑到脂肪组织及骨骼肌的葡萄糖吸收及肝脏的葡萄糖输出有助于全身性血糖控制,因此测定Ad36 E4orf1对代表此等组织的细胞株中基底及胰岛素刺激的葡萄糖处置的影响。将用E4orf1表现质体转染的3T3-L1前脂肪细胞或脂肪细胞、C2C12肌母细胞或HepG2肝细胞中的葡萄糖处置与经空载体转染的细胞相比较。

[0164] E4orf1表现使3T3-L1前脂肪细胞、脂肪细胞及C2C12肌母细胞中的基底2DG吸收增加(图11A-C)。在脂肪细胞中,E4orf1进一步增加胰岛素刺激的2DG吸收($p=0.003$)。在不具

有完全胰岛素反应性的前脂肪细胞及肌母细胞中,E4orf1未增强胰岛素刺激的2DG吸收。

[0165] 尽管肝脏的多种代谢功能(诸如葡萄糖吸收、肝糖合成、肝糖分解)有助于全身性血糖控制,但肝葡萄糖输出通常由于胰岛素抗性而不受控制,且可为2型糖尿病的高血糖的关键因素。因此,关注点集中于确定E4orf1对肝细胞的葡萄糖释放的作用。E4orf1转染在基底以及胰岛素刺激条件下显著减少HepG2细胞的葡萄糖输出(分别 $p < 0.000001$ 及 < 0.001 ;图11D)。

[0166] 此实验表明Ad36 E4orf1影响脂肪组织、骨骼肌及肝脏的葡萄糖处置。

[0167] 参考文献

[0168] 1.Fabbrini E, Magkos F, Mohammed BS等人Intrahepatic fat, not visceral fat, is linked with metabolic complications of obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:15430-15435。

[0169] 2.Deivanayagam S, Mohammed BS, Vitola BE等人Nonalcoholic fatty liver disease is associated with hepatic and skeletal muscle insulin resistance in overweight adolescents. *Am J Clin Nutr* 2008;88:257-262。

[0170] 3.Targher G, Bertolini L, Padovani R等人Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and its association with cardiovascular disease among type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2007;30:1212-1218。

[0171] 4.Bellentani S, Scaglioni F, Marino M, Bedogni G.Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Dis* 2010;28:155-161。

[0172] 5.Parekh S, Anania FA. Abnormal lipid and glucose metabolism in obesity: implications for nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2007;132:2191-2207。

[0173] 6.Adams LA, Lymp JF, St Sauver J等人The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. *Gastroenterology* 2005;129:113-121。

[0174] 7.Ekstedt M, Franzen LE, Mathiesen UL等人Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. *Hepatology* 2006;44:865-873。

[0175] 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。

[0176] 9.Sanyal AJ, Chalasani N, Kowdley KV等人Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med* 2010;362:1675-1685。

[0177] 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增刊7:57-66。

[0178] 11.Mishra P, Younossi ZM. Current treatment strategies for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Curr Drug Discov Technol* 2007;4:133-140。

[0179] 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。

[0180] 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-36induces commitment,differentiation and lipid accumulation in human adipose-derived stem cells.Stem Cells 2008 26:969-978。

[0181] 14.Nawrocki AR,Rajala MW,Tomas E等人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。

[0182] 15.Lutchman G,Promrat K,Kleiner DE等人Changes in serum adipokine levels during pioglitazone treatment for nonalcoholic steatohepatitis: relationship to histological improvement.Clin Gastroenterol Hepatol 2006;4: 1048-1052。

[0183] 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。

[0184] 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。

[0185] 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。

[0186] 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。

[0187] 20.Fernandes-Santos C,Evangelista Carneiro R,de Souza Mendonca L,Barbosa Aguila M,Mandarim-de-Lacerda CA.Rosiglitazone aggravates nonalcoholic Fatty pancreatic disease in C57BL/6mice fed high-fat and high-sucrose diet.Pancreas 2009;38:e80-86。

[0188] 21.Fernandes-Santos C,Carneiro RE,de Souza Mendonca L,Aguila 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。

[0189] 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。

[0190] 23.Kuda O,Stankova B,Tvrzicka E等人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。

[0191] 24. Trovato GM, Martines GF, Garozzo A 等人 Ad36 adipogenic adenovirus in human non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 2009。

[0192] 25. Mengshol JA, Golden-Mason L, Rosen HR. Mechanisms of Disease: HCV-induced liver injury. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2007;4:622-634。

[0193] 26. Tsai WL, Chung RT. Viral hepatocarcinogenesis. *Oncogene* 2010;29:2309-2324。

[0194] 27. Hanlon GW. Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *Int J Antimicrob Agents* 2007;30:118-128。

[0195] 28. Bischoff JR, Kirn DH, Williams A 等人 An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science* 1996;274:373-376。

[0196] 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。

[0197] 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。

[0198] 31. Libertini S, Iacuzzo I, Ferraro A 等人 Lovastatin Enhances the Replication of the Oncolytic Adenovirus dl1520 and its Antineoplastic Activity Against Anaplastic Thyroid Carcinoma Cells. *Endocrinology* 2007。

[0199] 32. Heiker JT, Kosel D, Beck-Sickinger AG. Molecular advances of adiponectin and adiponectin receptors. *Biol Chem* 2010。

[0200] 33. Kim JY, van de Wall E, Laplante M 等人 Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. *J Clin Invest* 2007;117:2621-2637。

[0201] 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。

[0202] 35. Vitola BE, Deivanayagam S, Stein RI, Mohammed BS, Magkos F, Kirk EP, 等人 Weight loss reduces liver fat and improves hepatic and skeletal muscle insulin sensitivity in obese adolescents. *Obesity (Silver Spring)* 2009;17:1744-1748。

[0203] 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。

[0204] 37. .Pasarica M, Shin AC, Yu M, Ou Yang HM, Rathod M, Jen KL, 等人 Human adenovirus 36 induces adiposity, increases insulin sensitivity, and alters

hypothalamic monoamines in rats.Obesity(Silver Spring)2006;14:1905-1913。

[0205] 38.Kantartzis K,Schick F,Haring HU,Stefan N.Environmental and genetic determinants of fatty liver in humans.Dig Dis 2010;28:169-178。

[0206] 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。

[0207] 40.Foy HM,Grayston JT.Adenoviruses."Viral infections of humans: Epidemiology and control".Evans Alfred S.编.Plenum Medical.:New York,1976,第53-70页。

[0208] 41.Horvath J,Palkonyay L,Weber J.Group C adenovirus DNA sequences in human lymphoid cells.J Virol 1986;59:189-192。

[0209] 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。

[0210] 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。

[0211] 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。

[0212] 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。

[0213] 46.Dhurandhar NV,Whigham LD,Abbott DH,Schultz-Darken NJ,Israel BA,Bradley SM,等人Human adenovirus Ad-36promotes weight gain in male rhesus and marmoset monkeys.J Nutr 2002;132:3155-3160。

[0214] 47.Pasarica M,Loiler S,Dhurandhar NV.Acute effect of infection by adipogenic human adenovirus Ad36.Archives of Virology 2008;153(11):2097-2102。

[0215] 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。

[0216] 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。

[0217] 50.Tompkins CL,Cefalu W,Ravussin E,Goran M,Soros A,Volaufova J,等人Feasibility of intravenous glucose tolerance testing prior to puberty.Int J Pediatr Obes 2010;5:51-55。

[0218] 51.Larson-Meyer DE,Newcomer BR,VanVrancken-Tompkins CL,Sothorn 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。

[0219] 52. Butte NF, Cai G, Cole SA, Wilson TA, Fisher JO, Zakeri IF, 等人 Metabolic and behavioral predictors of weight gain in Hispanic children: the Viva la Familia Study. *Am J Clin Nutr* 2007;85:1478-1485。

[0220] 53. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, 等人 Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 2002;8:1288-1295。

[0221] 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。

[0222] 55. Pajvani UB, Scherer PE. Adiponectin: systemic contributor to insulin sensitivity. *Curr Diab Rep* 2003;3:207-213。

[0223] 56. Waki H, Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Uchida S, Kita S, 等人 Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin. *J Biol Chem* 2003;278:40352-40363。

[0224] 57. Schraw T, Wang ZV, Halberg N, Hawkins M, Scherer PE. Plasma adiponectin complexes have distinct biochemical characteristics. *Endocrinology* 2008;149:2270-2282。

[0225] 58. Zhang W, Patil S, Chauhan B, Guo S, Powell DR, Le J, 等人 FoxO1 regulates multiple metabolic pathways in the liver: effects on gluconeogenic, glycolytic, and lipogenic gene expression. *J Biol Chem* 2006;281:10105-10117。

[0226] 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。

[0227] 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。

[0228] 61. Kotokorpi P, Ellis E, Parini P, Nilsson LM, Strom S, Steffensen KR, 等人 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。

[0229] 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. *Biochemistry* 1999;38:10215。

[0230] 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。

- [0231] 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。
- [0232] 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。
- [0233] 66.Davidson NO,Shelness GS.APOLIPOPROTEIN B:mRNA editing,lipoprotein assembly,and presecretory degradation.Annu Rev Nutr 2000;20:169-193。
- [0234] 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。
- [0235] 68.Gao Z,Yin J,Zhang J,He Q,McGuinness OP,Ye J.Inactivation of NF-kappaB p50leads to insulin sensitization in liver through post-translational inhibition of p70S6K.J Biol Chem 2009;284:18368-18376。
- [0236] 69.Xu F,Gao Z,Zhang J,Rivera CA,Yin J,Weng J,等人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。
- [0237] 70.Vangipuram SD,Sheele J,Atkinson RL,Holland TC,Dhurandhar NV.A human adenovirus enhances preadipocyte differentiation.Obes Res 2004;12:770-777。
- [0238] 71.Gao Z,Wang Z,Zhang X,Butler AA,Zuberi A,Gawronska-Kozak B,等人Inactivation of PKCtheta leads to increased susceptibility to obesity and dietary insulin resistance in mice.Am J Physiol Endocrinol Metab 2007;292:E84-91。
- [0239] 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。
- [0240] 73.Lupo MA,Cefalu WT,Pardridge WM.Kinetics of lactate transport into rat liver in vivo.Metabolism 1990;39:374-377。
- [0241] 74.Hillyard LA,Lin CY,Abraham S.Lipogenic enzyme activities in primary cultures of adult mouse hepatocytes.Lipids 1988;23:242-247。
- [0242] 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。
- [0243] 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)。
- [0244] 77.G.Sesti,M.Federici,D.Lauro,P.Sbraccia,R.Lauro,Diabetes Metab Res Rev17,363(2001年9月-10月)。

- [0245] 78.G.Sesti等人,FASEB J 15,2099 (2001年10月)。
- [0246] 79.R.K.Semple等人,Diabetes Care 31,977 (2008年5月)。
- [0247] 80.R.K.Semple等人,J Clin Invest 119,315 (2009年2月)。
- [0248] 81.J.E.Pessin,A.R.Saltiel,J Clin Invest 106,165 (2000年7月)。
- [0249] 82.L.J.Goodyear等人,J Clin Invest 95,2195 (1995年5月)。
- [0250] 83.M.J.Pagliassotti,J.Kang,J.S.Thresher,C.K.Sung,M.E.Bizeau,Am J Physiol Endocrinol Metab 282,E170 (2002年1月)。
- [0251] 84.N.G.Boule等人,Diabetes Care 28,108 (2005年1月)。
- [0252] 85.N.F.Butte,G.Cai,S.A.Cole,A.G.Comuzzie,Am J Clin Nutr 84,646 (2006年9月)。
- [0253] 86.C.C.Cowie等人,Diabetes Care 32,287 (2009年2月)。
- [0254] 87.G.Zhou等人,J Clin Invest 108,1167 (2001年10月)。
- [0255] 88.G.D.Cartee,J.F.Wojtaszewski,Appl Physiol Nutr Metab 32,557 (2007年6月)。
- [0256] 89.Z.Gao等人,J Biol Chem 277,48115 (2002年12月13日)。
- [0257] 90.E.Maury,S.M.Brichard,Mol Cell Endocrinol 314,1 (1月15日)。
- [0258] 91.M.Qatanani,M.A.Lazar,Genes Dev 21,1443 (2007年6月15日)。
- [0259] 92.R.L.Atkinson等人,Int J Obes (Lond) 29,281 (2005年3月)。
- [0260] 93.P.An等人,Metabolism 52,246 (2003年2月)。
- [0261] 94.R.C.Boston等人,Diabetes Technol Ther 5,1003 (2003)。
- [0262] 95.S.Bajpeyi等人,J Appl Physiol 106,1079 (2009年4月)。
- [0263] 96.F.Aoki等人,Biosci Biotechnol Biochem 71,206 (2007年1月)。
- [0264] 97.A.Raben,N.Haulrik,N.Dhurandhar,R.Atkinson,A.Astrup,Int J Obes 25 (增刊2),S46 (2001)。

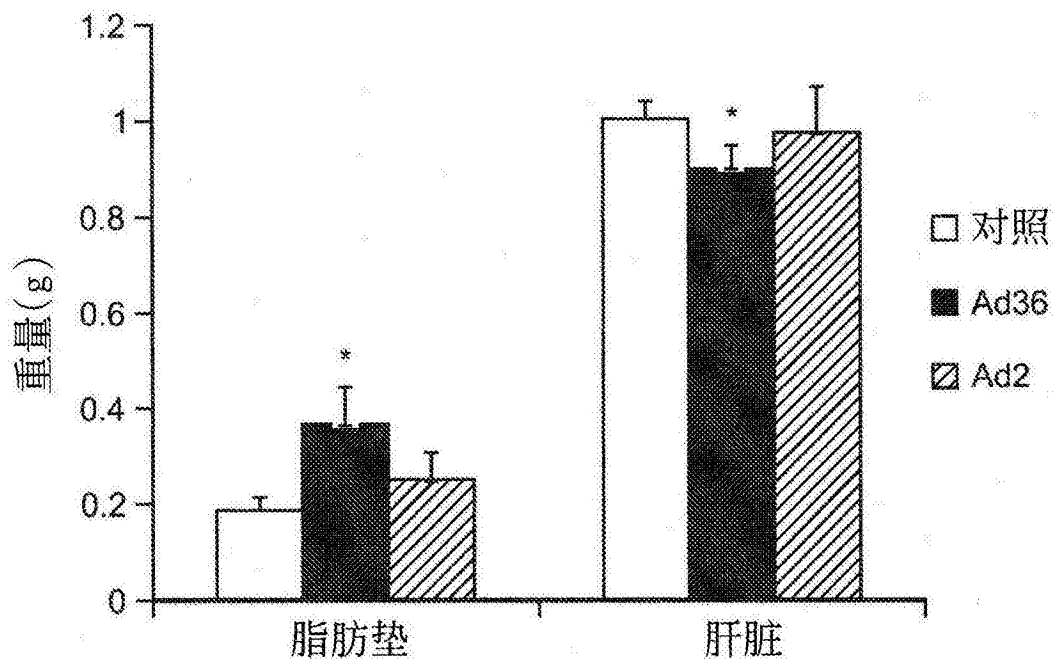


图1

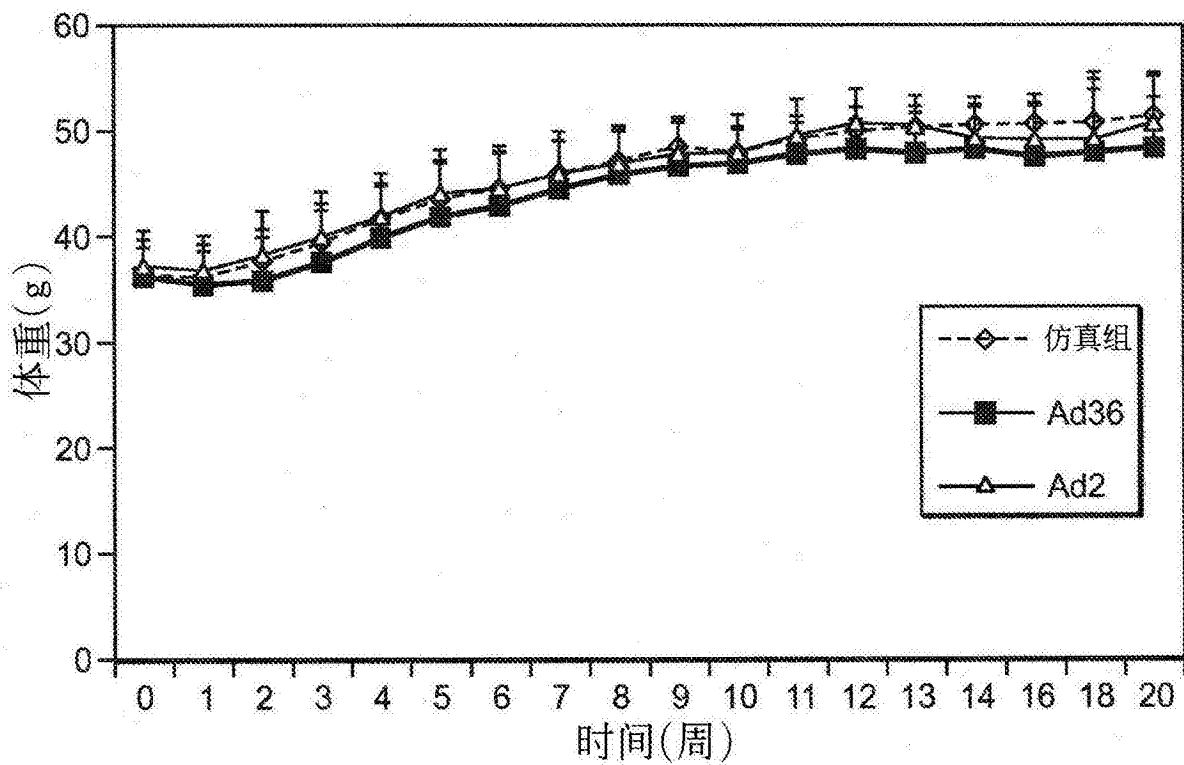


图2

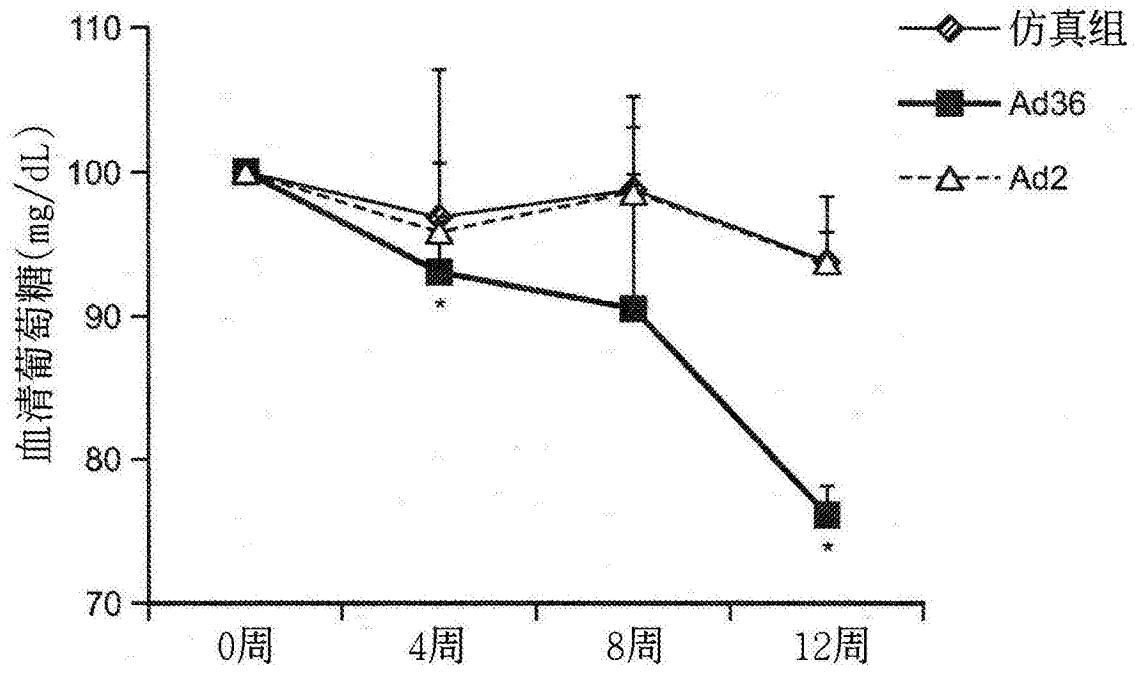


图3A

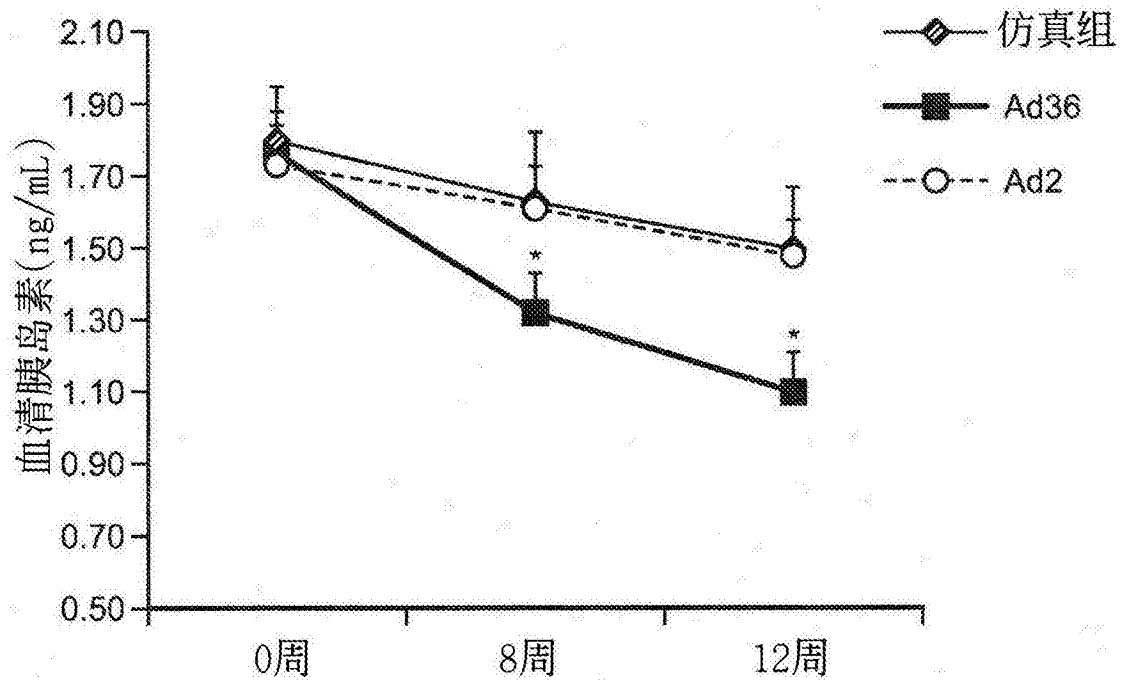


图3B

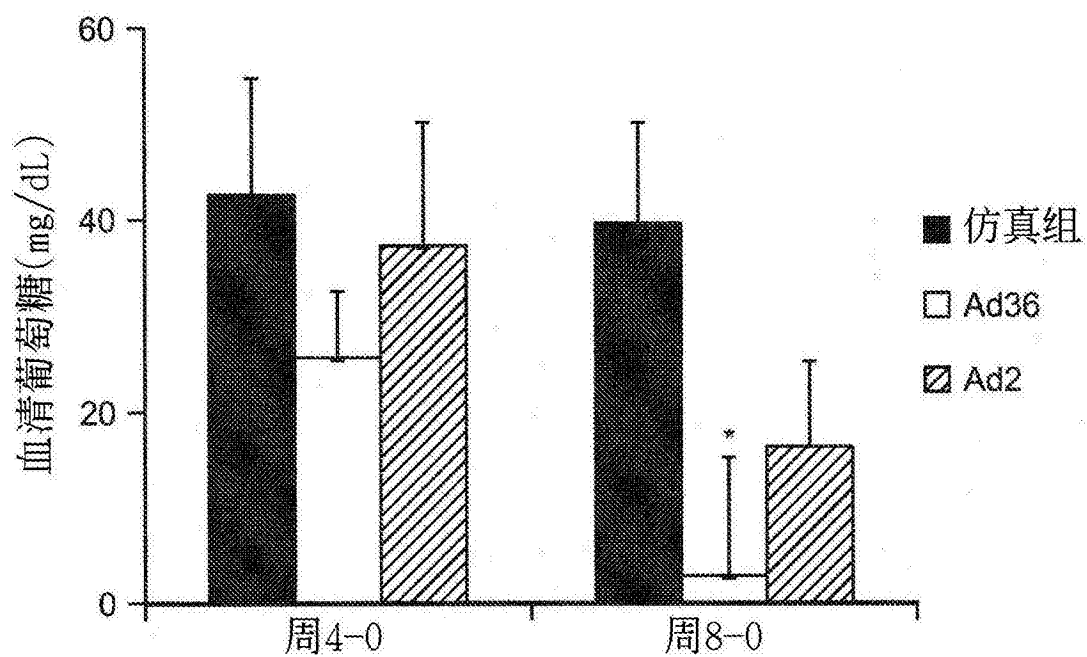


图3C

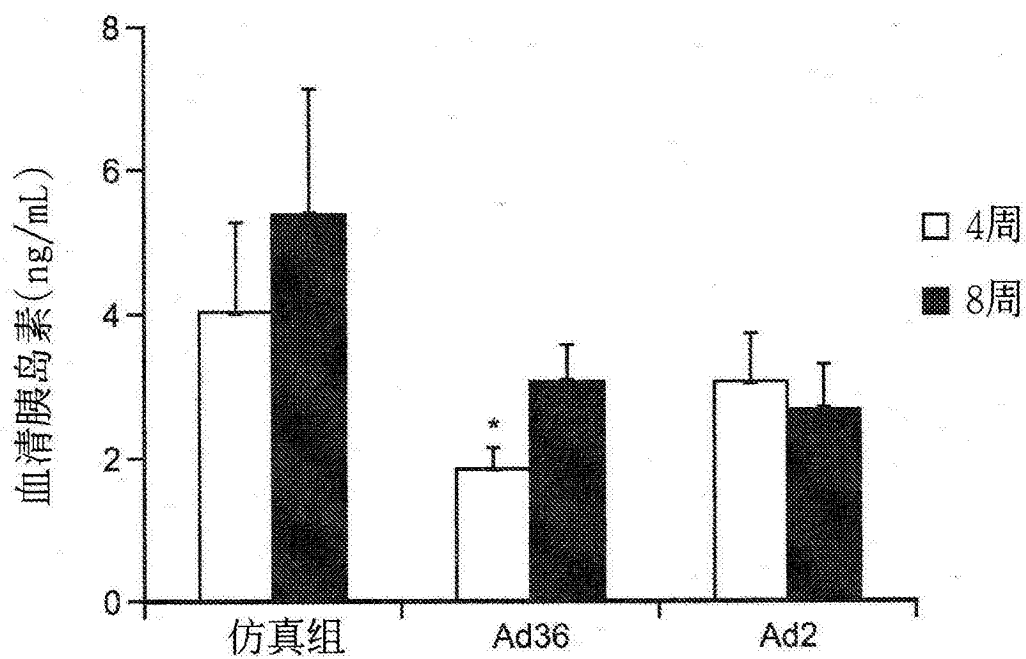


图3D

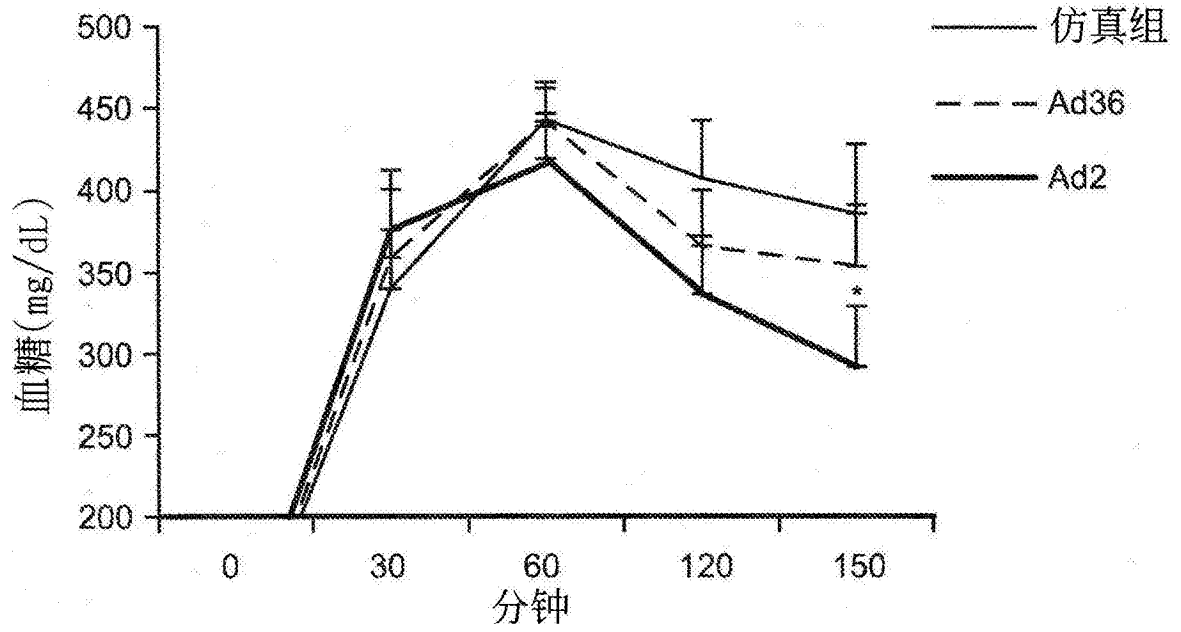


图3E

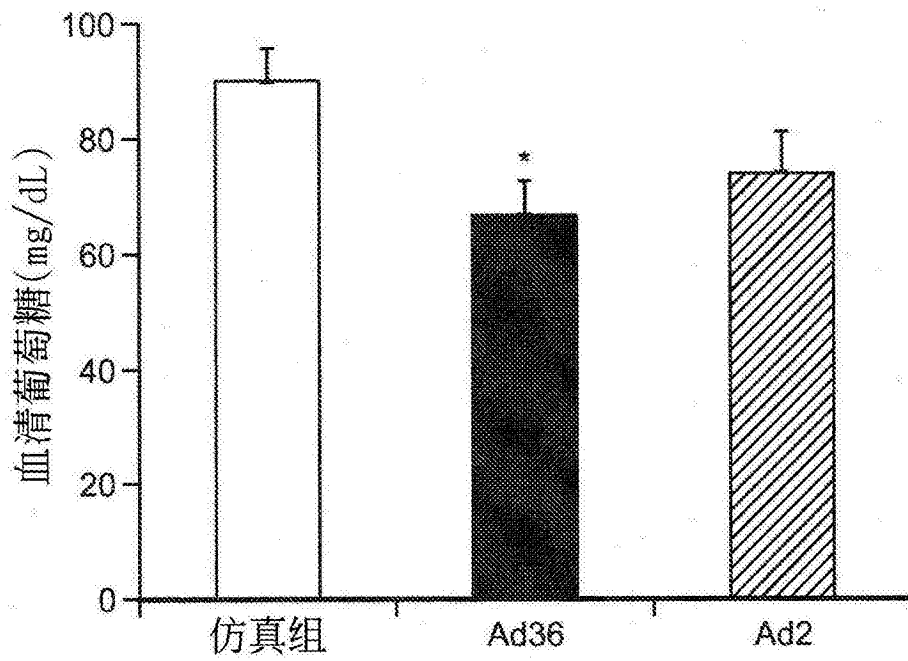


图3F

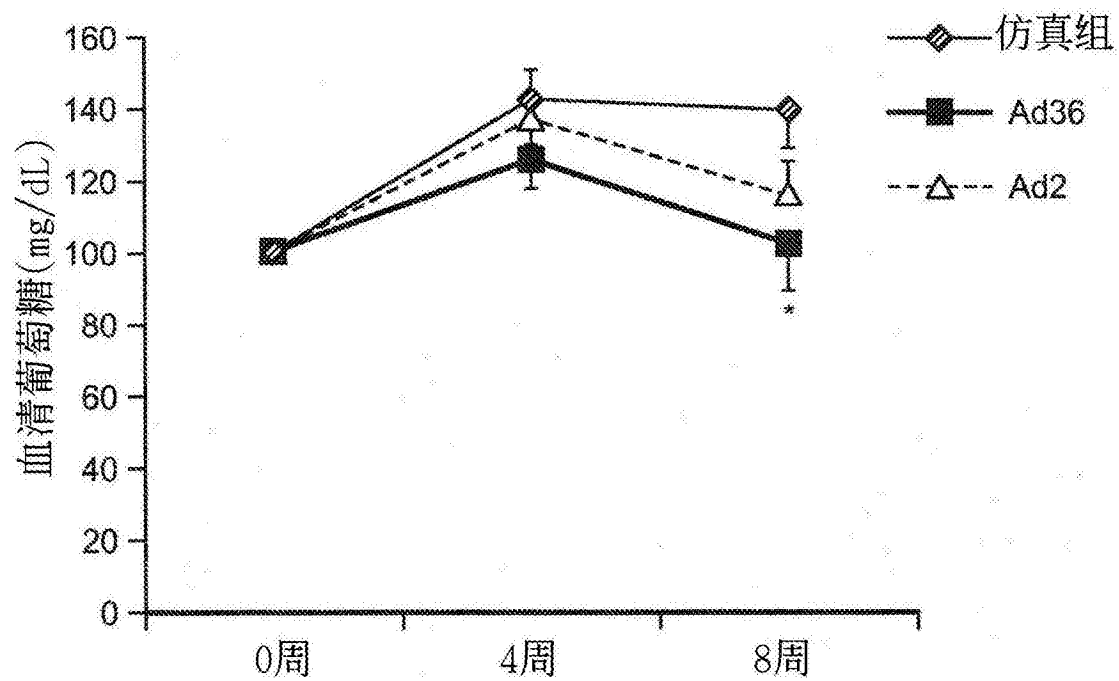


图4A

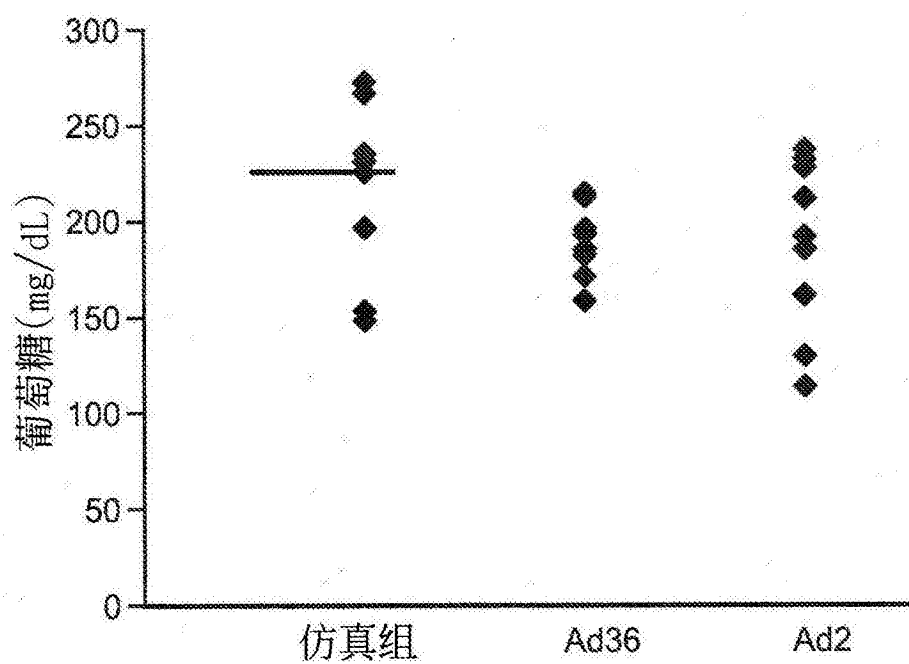


图4B

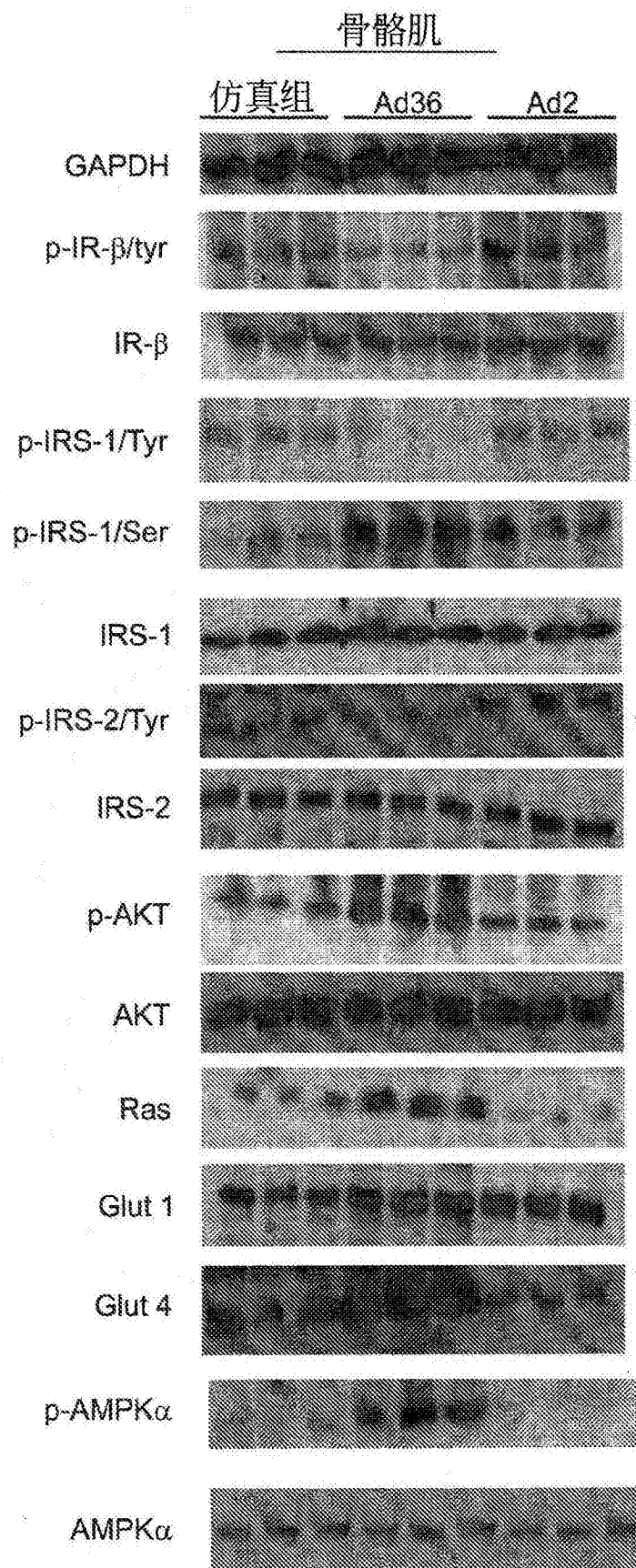


图5A

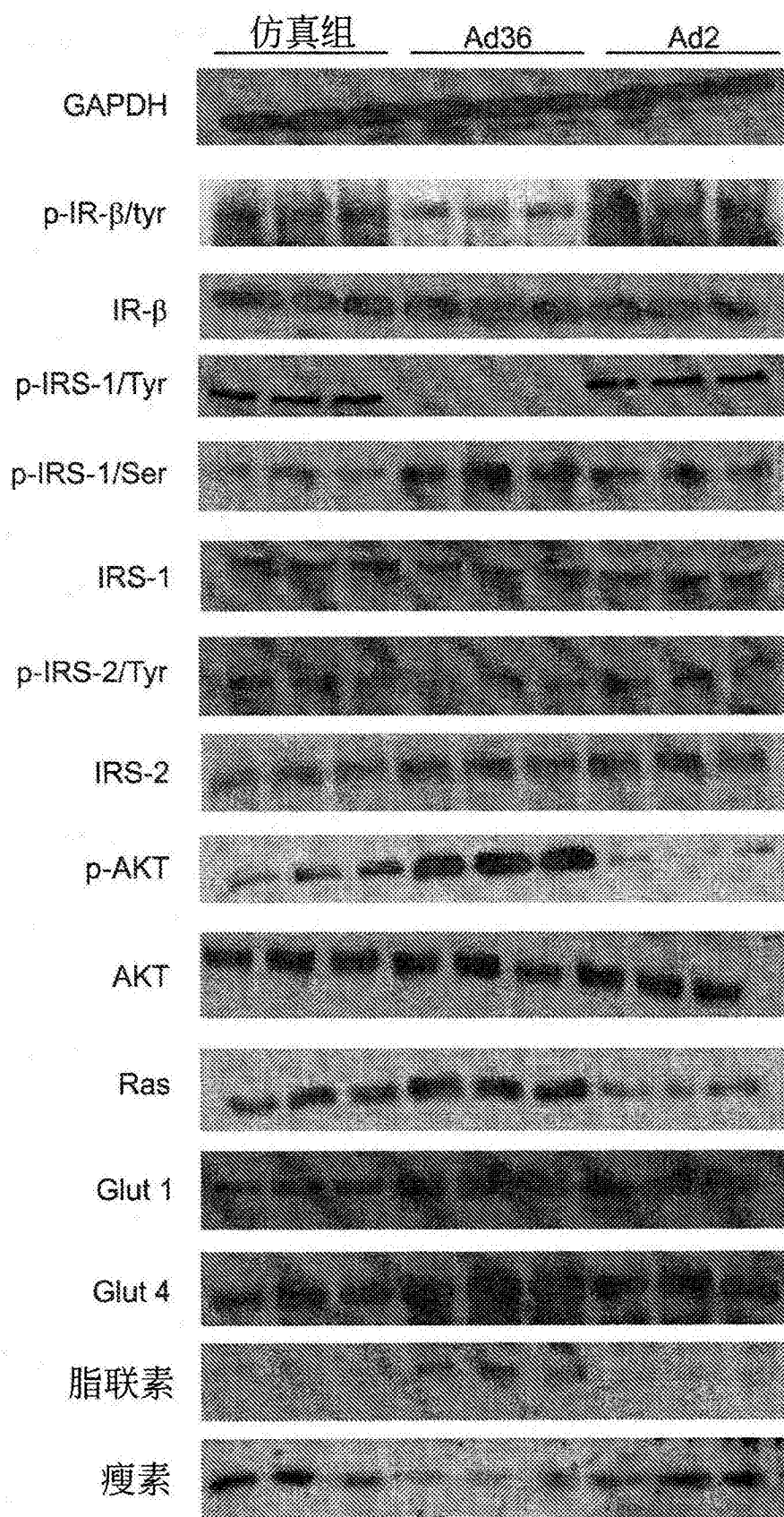


图5B

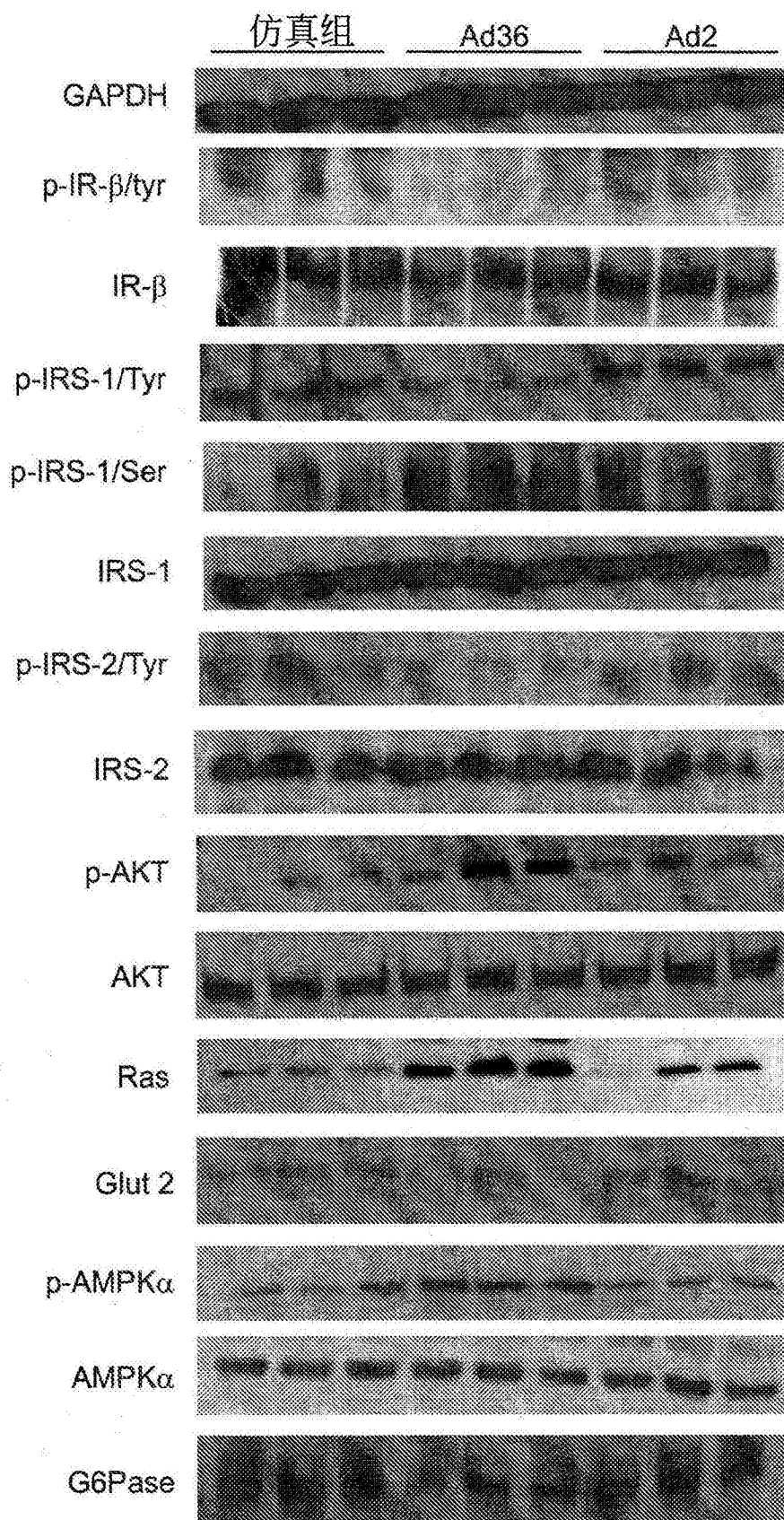


图5C

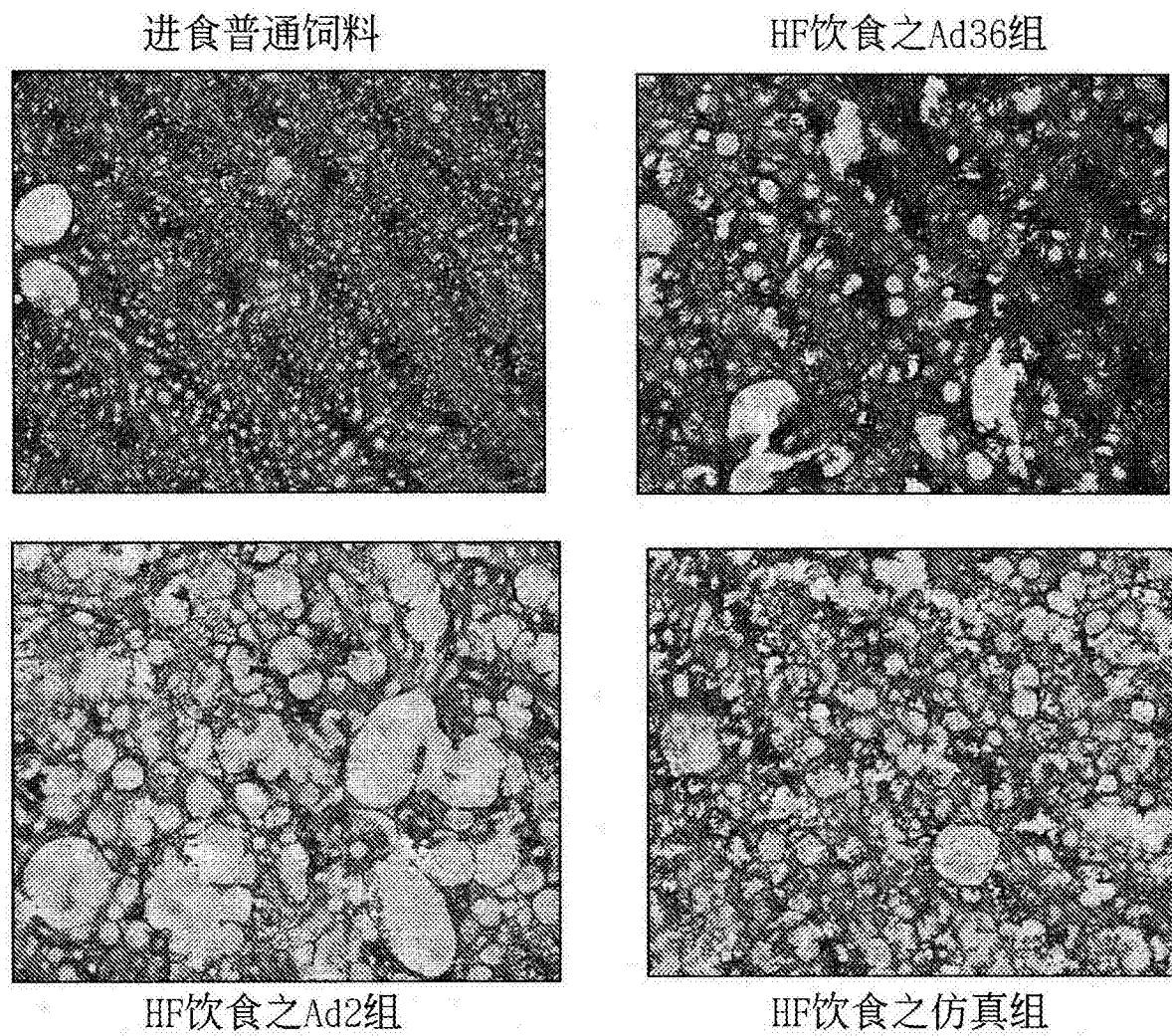


图6A

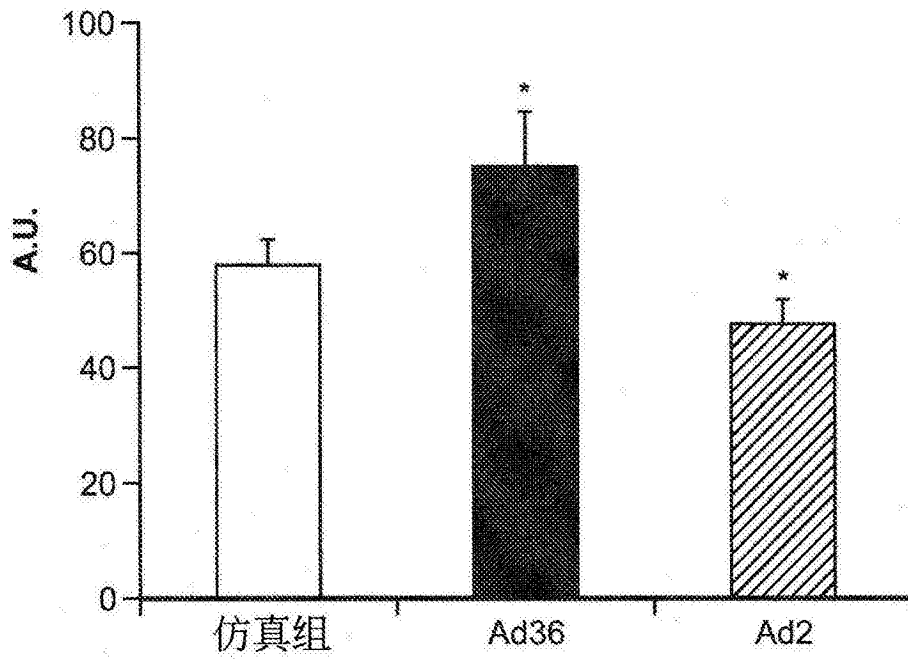


图6B

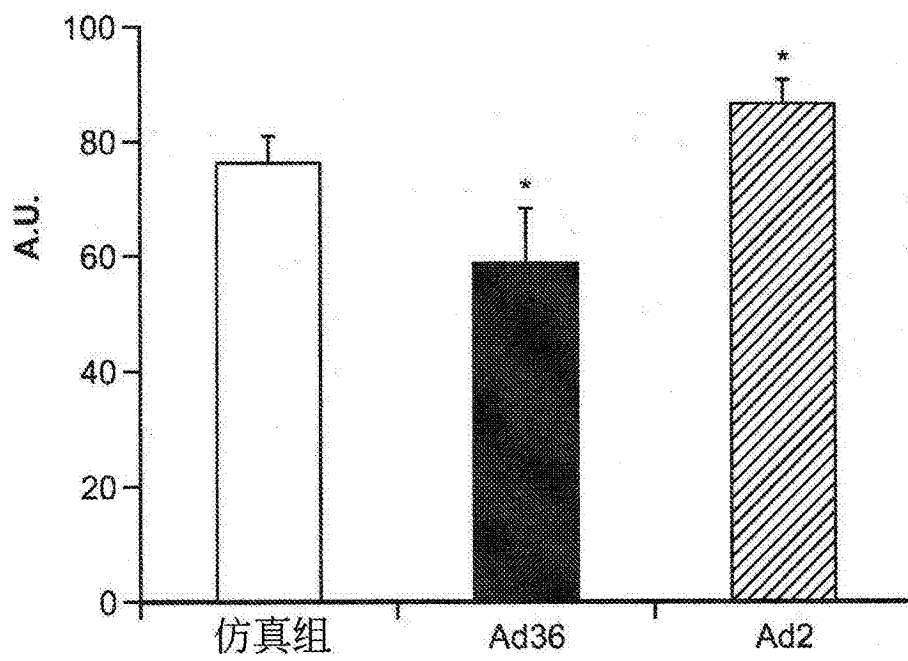


图6C

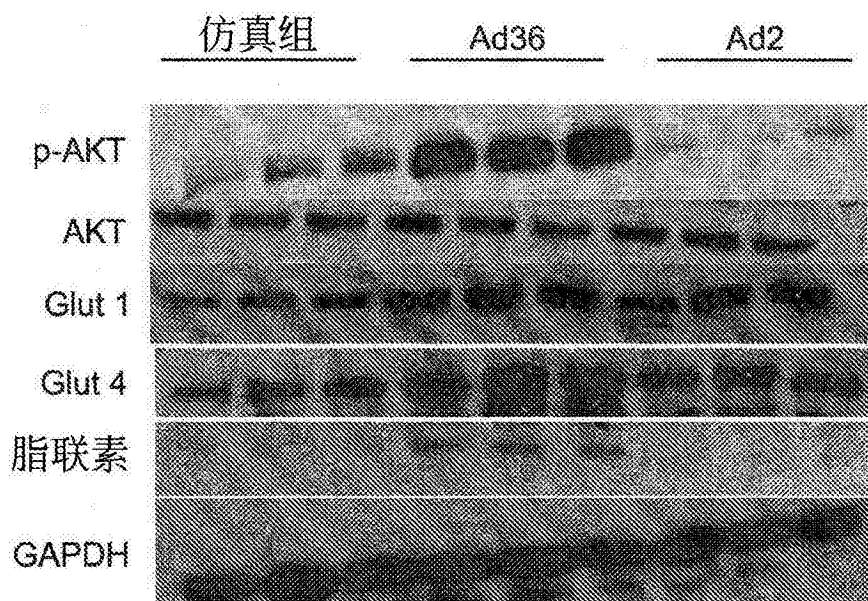


图7A

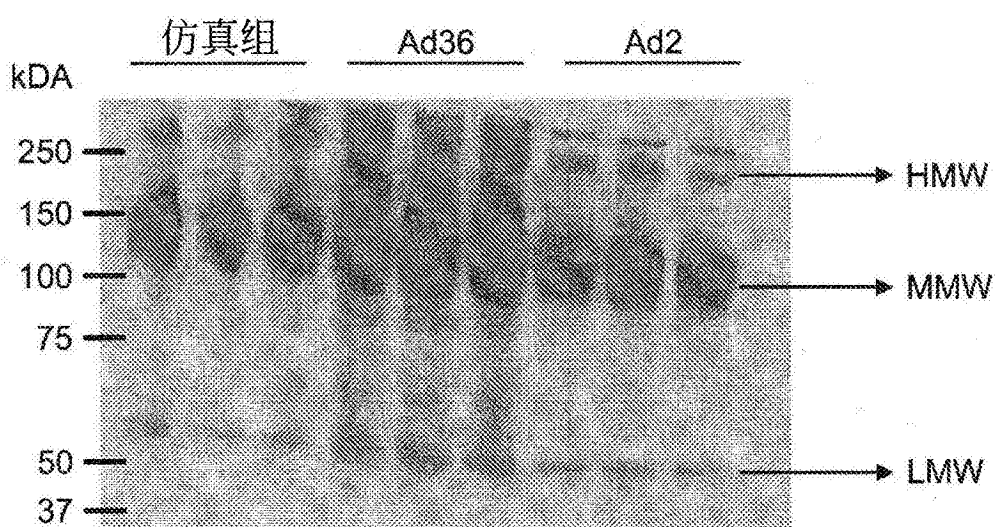


图7B

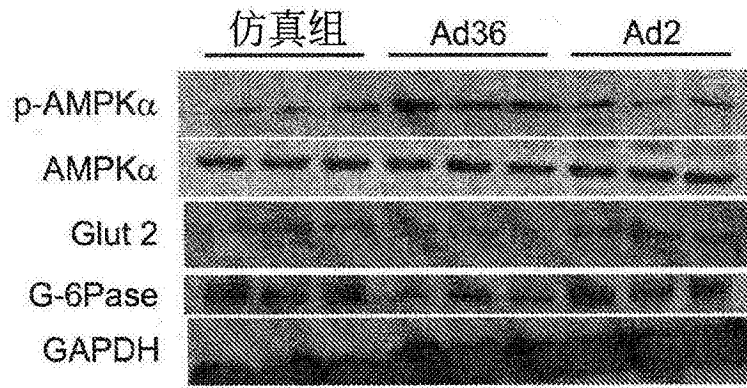


图8

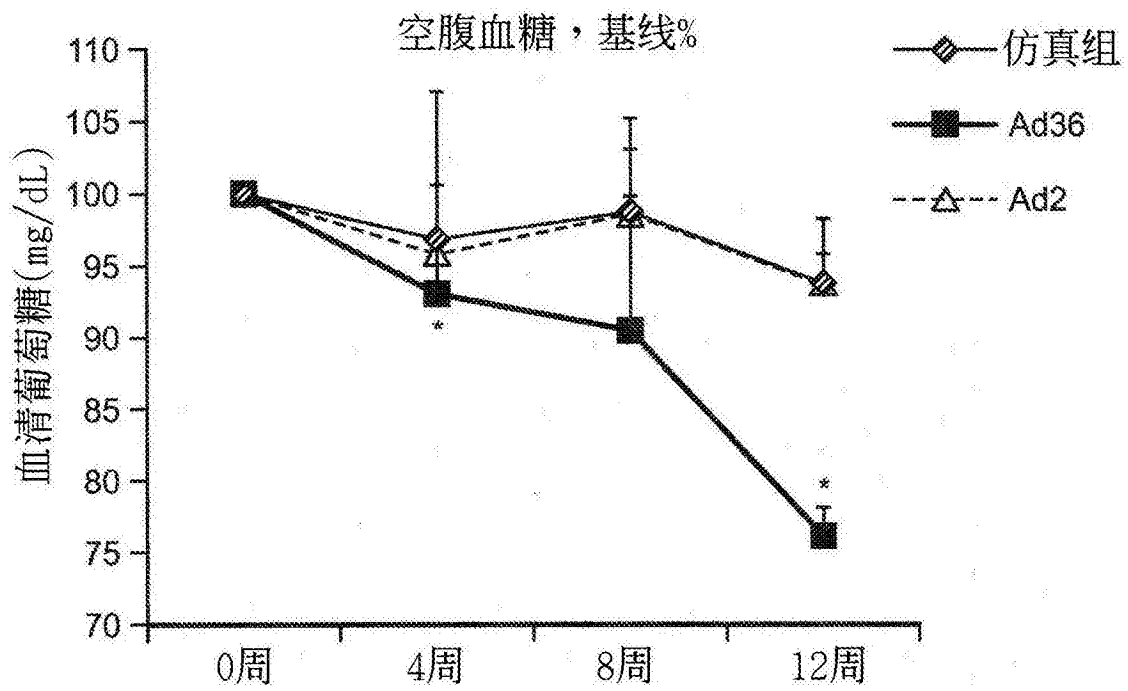


图9A

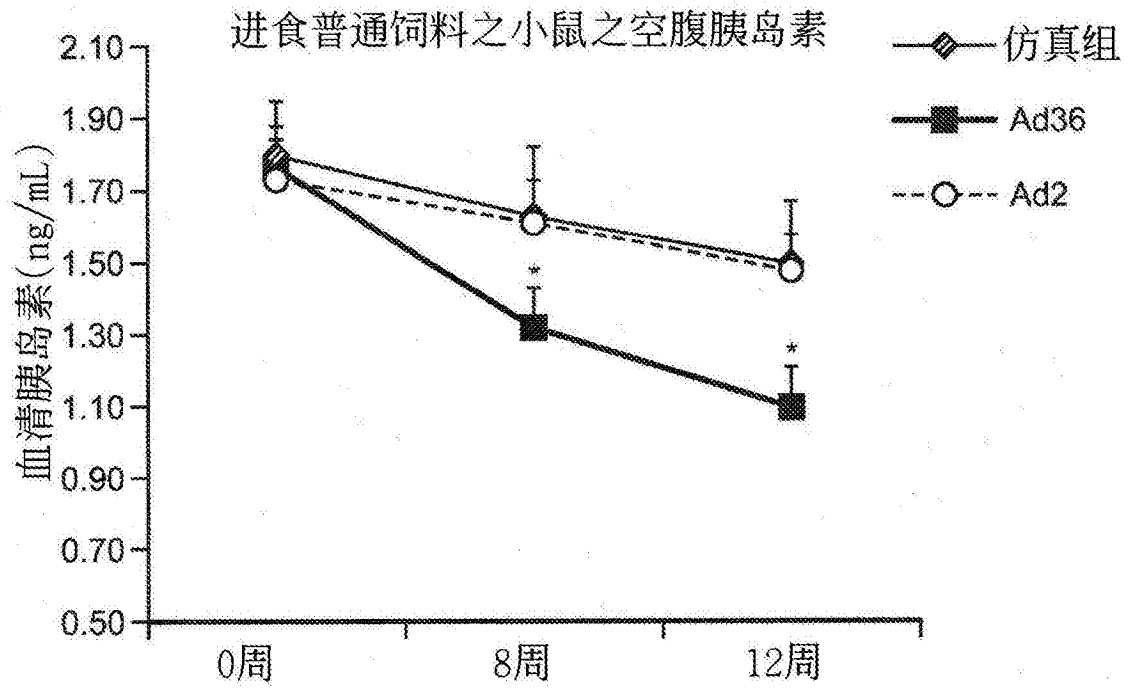


图9B

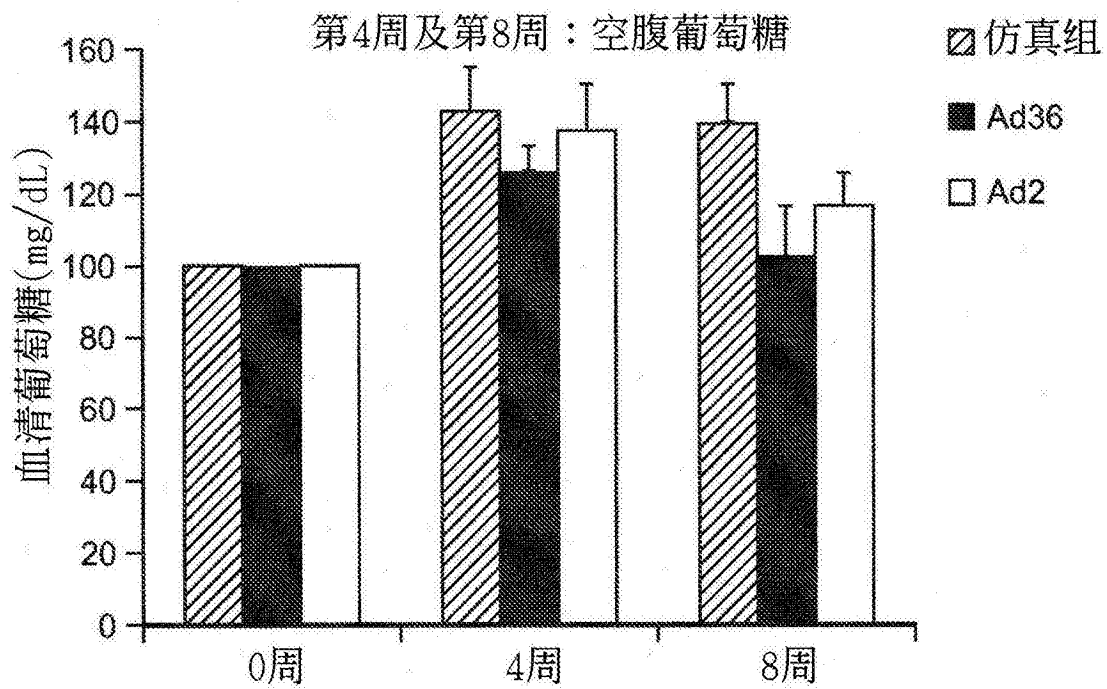


图10A

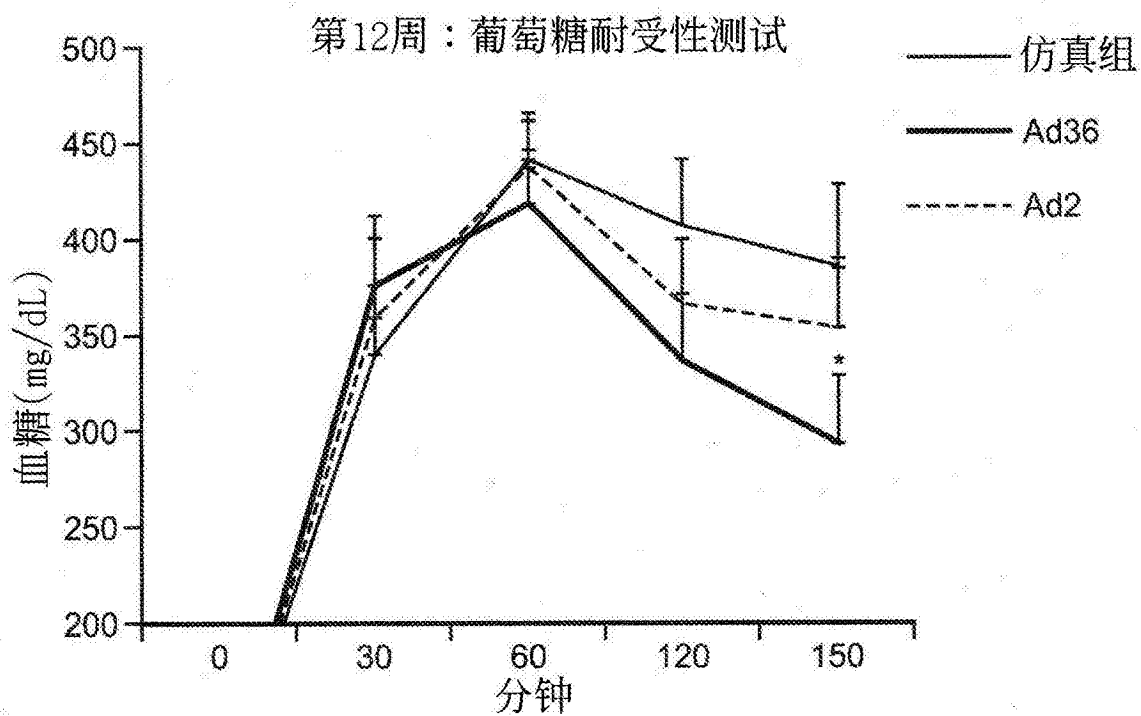


图10B

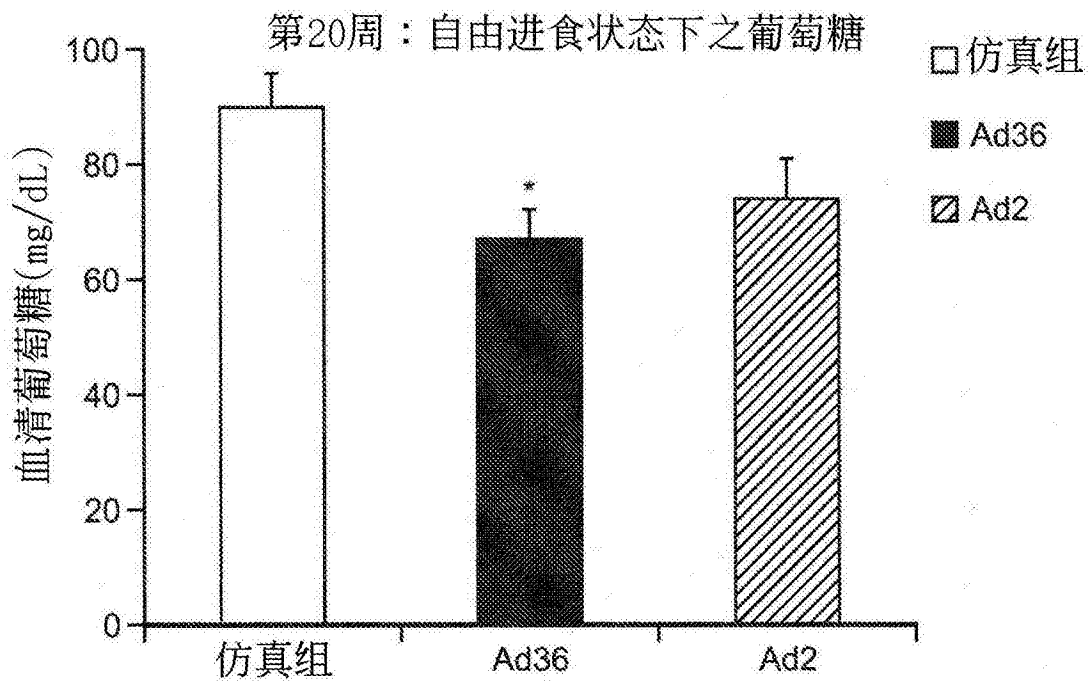


图10C

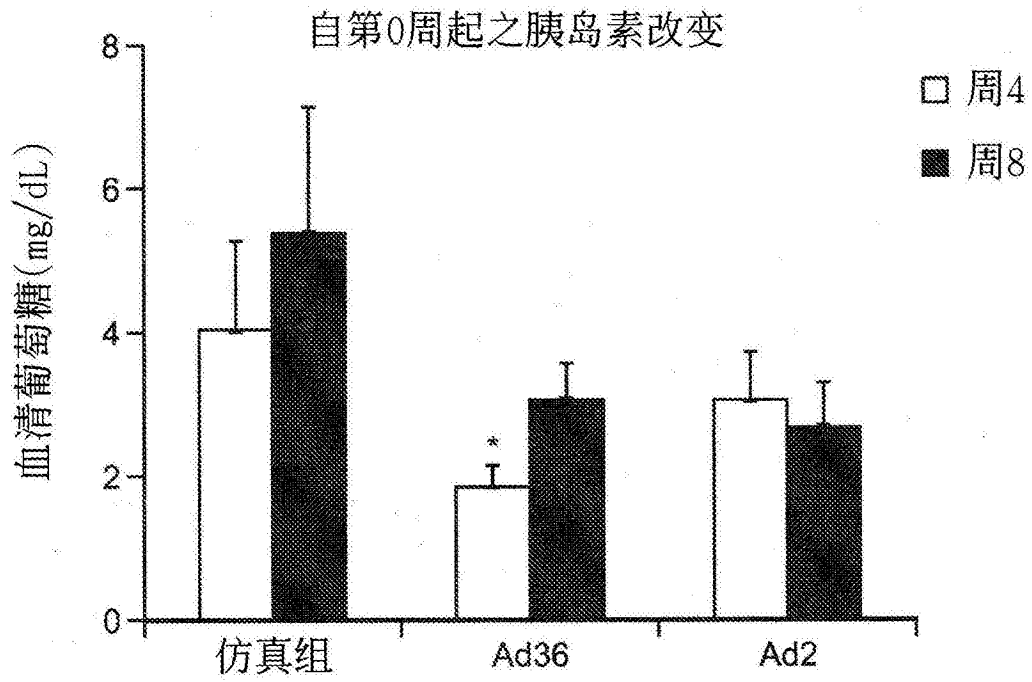


图10D

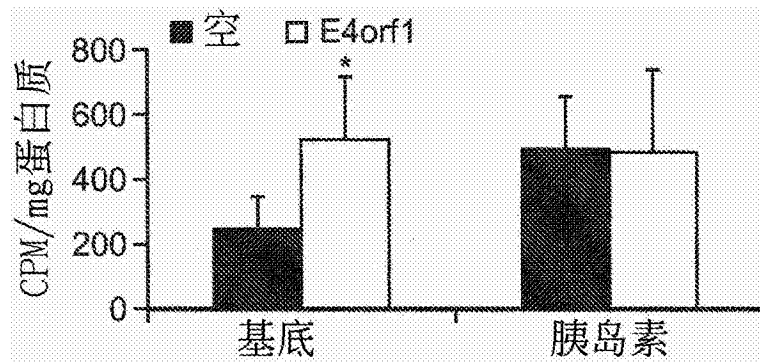


图11A

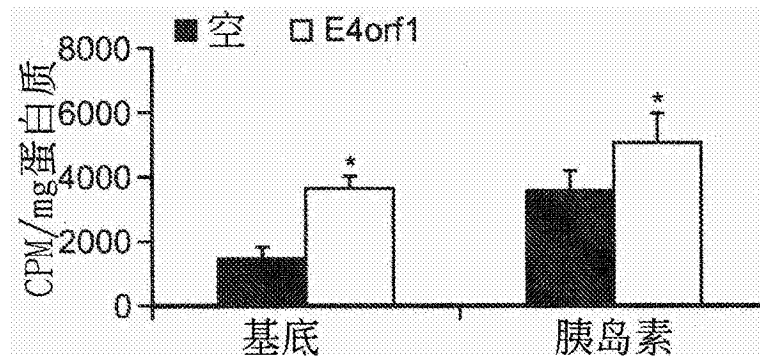


图11B

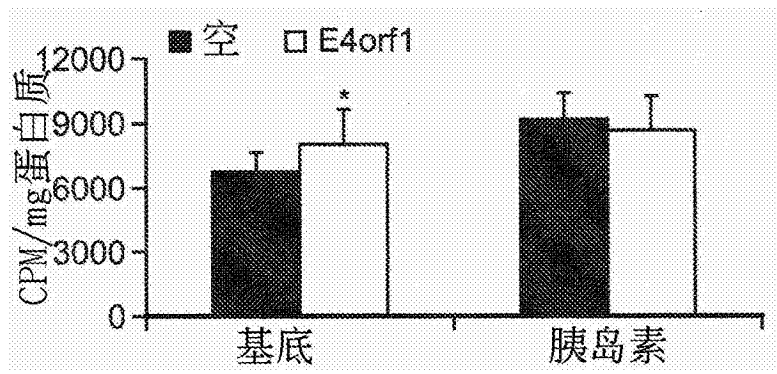


图11C

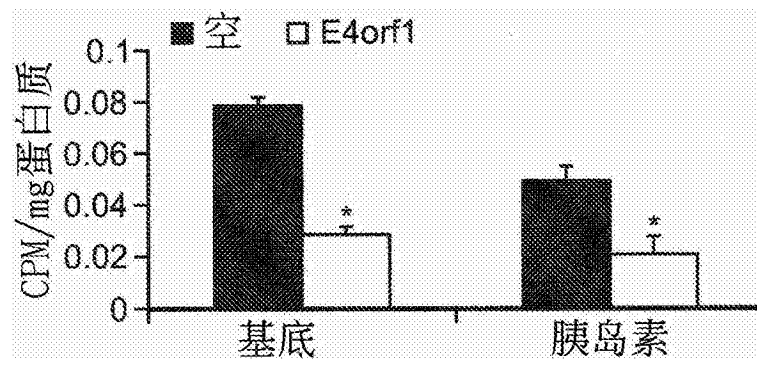


图11D