



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년11월10일
(11) 등록번호 10-2176937
(24) 등록일자 2020년11월04일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) A61K 31/36 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) A61K 45/06 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 48/00 (2013.01)
A61K 31/36 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-0112714
(22) 출원일자 2019년09월11일
심사청구일자 2019년09월11일
- (56) 선행기술조사문헌
Oncotarget. 2017. Vol.8, No.60,
pp.101418-101436.*
Recent Progress in Hormone Research. 2001.
Vol.56, pp.309-328.*
US20110107439 A1
KR1020160076519 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
서울대학교산학협력단
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)
재단법인 국가마우스표현형분석사업단
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동, 서울대학교
교수의과대학생명공학연구동5층)
- (72) 발명자
서준영
경기도 고양시 일산동구 강송로 156, 209동 603
호(마두동, 강촌마을2단지아파트)
성제경
서울특별시 관악구 관악로 1,81동 생명공학연구동
514호 (신림동, 서울대학교)
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인충현

전체 청구항 수 : 총 2 항

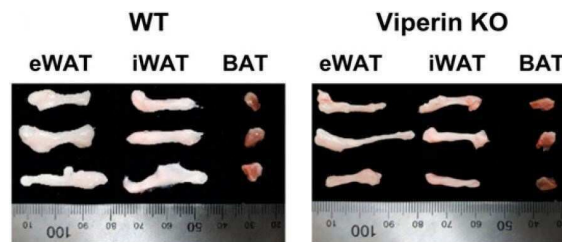
심사관 : 허명숙

(54) 발명의 명칭 바이페린 억제제를 유효성분으로 포함하는 대사질환의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 대사질환(metabolic disorder)의 예방 또는 치료용 조성물 및 이의 스크리닝 방법에 관한 것이다. 본 발명은 지방 조직에서의 열생성과 대사활성을 현저히 증가시켜 체내 지방의 급격한 감소를 야기함으로써, 비만을 비롯한 다양한 대사증후군의 효율적인 치료 조성물로 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도1b



(52) CPC특허분류

A61K 39/395 (2013.01)

A61K 45/06 (2013.01)

A61P 3/00 (2018.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

(72) 발명자

윤슬기

서울시 서대문구 연희대로 7-21(연희동)

손수진

서울시 관악구 신원로3마길 21,301호(신림동)

서현주

인천광역시 연수구 원인재로 124, 108동 201호(동춘동, 한양1차아파트)

김일용

서울특별시 관악구 문성로 93(신림동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016R1A2B4014630

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원사업

연구과제명 Human Cytomegalovirus 감염에 대한 Viperin의 기능 및 상호작용 기전 규명

기 여 율 80/100

과제수행기관명 연세대학교 산학협력단

연구기간 2019.03.01 ~ 2019.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013M3A9D5072550

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 바이오·의료기술개발(R&D)

연구과제명 마우스 표현형서비스 구축 및 대사 운동 표현형 분석

기 여 율 20/100

과제수행기관명 재단법인 국가마우스표현형분석사업단

연구기간 2019.07.20 ~ 2020.03.19

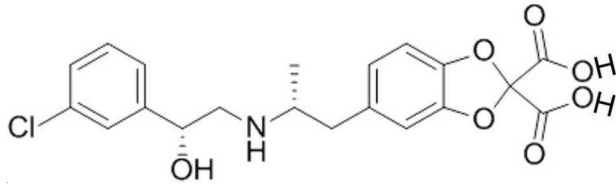
공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) 바이페린(viperin) 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편; 또는 바이페린 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드의 발현을 억제하는 핵산 분자; 및
- (b) 하기 화학식 1의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 비만의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물:



청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 *Ucp1*, *Pgc1 α* , *Cidea*, *Ppar α* , *Ppar β/δ* , *Cpt1*, 아디포넥틴, *Fabp4* 및 *C/ebp α* 로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 바이페린 억제제를 유효성분으로 포함하는 비만, 당뇨, 이상지방혈증, 지방간 및 인슐린 저항성 증후군을 비롯한 대사질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 많은 인터페론(IFN)-유도 단백질은 바이러스 감염에 대응한 방어에서 역할을 하며, 이들 단백질이 유도되는 메카니즘은 잘 연구되어 있다. 최근, RNA 시퀀싱이나 프로테오믹스와 같은 고속대량분석(high-throughput analysis) 기술의 발달로 인해 다양한 조직의 유전자 또는 단백질 발현 프로파일의 생성이 가능해졌다. 놀랍게도, Mx 단백질(MX 다이아민-유사 GTPases), GBP (구아닐레이트-결합 단백질), ISG15(15kDa의 IFN-자극 유전자 산물), ISG20(20kDa의 IFN-자극 엑소뉴클레아제), IFIT(반복된 트라트리코펩타이드를 가지는 IFN-유도 단백질), IFITM(IFN-유도 막관통 단백질), BST2(골수기질세포 항원 2) 및 바이페린(바이러스-억제 단백질)를 포함하는 대부분의 IFN-유도 단백질들은 특정 조직에서 어떠한 자극 없이도 발현되어, 이들 조직에서 새로운 기능을 하고 있을 것이라는 점을 시사한다.

[0004] 바이페린(RSAD2, cig5 또는 vig1)은 항바이러스 활성을 가지고, 신호경로 또는 Th2 세포 발달을 매개하며, 세포 대사를 조절하는, IFN-유도 다중기능 단백질이다. 바이페린이 다양한 세포에서 기능을 하는 메카니즘은 잘 알려져 있다. 바이페린은 ER(endoplasmic reticulum)에서 골지체로의 가용성 단백질의 수송을 차단하며, 미토콘드리아의 지방산 β -산화를 억제하여 ATP 생성을 감소시키고 세포 지방생성을 증가시킨다.

[0005] 지방 조직은 에너지 균형과 항상성을 조절하는 중추적 대사기관이다. 지방 조직에는 백색 지방조직(WAT)과 갈색 지방조직(BAT)의 2가지 주요 형태가 있다. WAT는 지방을 저장하는 기능을 하며, BAT는 주로 열생성을 위해 지방을 태우는 역할을 한다. BAT은 다중 미토콘드리아 및 다방성 지질방울(lipid droplet)을 가지는데, 이는 미토콘드리아 UCP1(uncoupling protein 1)의 유도를 통해 열 생성에 중요한 역할을 한다. WAT은 갈색화(browning) 과정을 통해서도 열 생성에 기여한다. 열생성의 활성화는 에너지 소모를 증가시키고 비만, 인슐린 저항성 2형 당뇨와 같은 대사 질환을 개선시킨다. 열생성의 유도에는 지방산 β -산화가 필요하다. UCP1-결핍 마우스에서처럼, 지방산 β -산화가 결핍된 마우스에서는 지방 과다가 나타나면서 저온 스트레스에 민감해져, 지방산 β -산화가 열생성 및 지방조직 분화에 관여한다고 예상할 수 있다. 그러나, 지방산 β -산화-매개 열생성과 지방세포의 분화가 어떠한 기작에 의해 조절되는지는 알려져 있지 않다.

[0007] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0009] (비특허문헌 0001) 비특허문헌 1. J Interferon Cytokine Res. 2011 Jan; 31(1): 131-135.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명자들은 생체 내 지방 대사를 효율적으로 조절함으로써 비만, 당뇨, 이상지방혈증, 지방간 및 인슐린 저항성 증후군을 포함하는 다양한 대사질환에 대한 우수한 치료 활성을 가지는 조성물을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 인터페론(IFN)-유도 단백질인 바이페린을 억제하는 물질을 개체에 투여할 경우 개체의 간, 심장, 지방 등의 조직에서 열 생성물, 산소 소모 및 CO₂ 생성물이 증가하고, 열생성 및 지방산 β -산화와 관련된 유전자의 발현이 증가하며, 이를 통해 궁극적으로 체내 지방량이 현저히 감소됨을 발견함으로써, 본 발명

을 완성하게 되었다.

[0011] 따라서 본 발명의 목적은 대사질환(metabolic disorder)의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 데 있다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 대사질환(metabolic disorder)의 예방 또는 치료용 조성물의 스크리닝 방법을 제공하는 데 있다.

[0014] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0016] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 바이페린(viperin) 억제제를 유효성분으로 포함하는 비만, 당뇨, 이상 지방혈증(dyslipidemia), 지방간 및 인슐린 저항성 증후군(insulin resistance syndrome)으로 구성된 군으로부터 선택되는 대사질환(metabolic disorder)의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0017] 본 발명자들은 생체 내 지방 대사를 효율적으로 조절함으로써 비만, 당뇨, 이상지방혈증, 지방간 및 인슐린 저항성 증후군을 포함하는 다양한 대사질환에 대한 우수한 치료 활성을 가지는 조성물을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 인터페론(IFN)-유도 단백질인 바이페린을 억제하는 물질을 개체에 투여할 경우 개체의 간, 심장, 지방 등의 조직에서 열 생성물, 산소 소모율 및 CO₂ 생성물이 증가하고, 열생성 및 지방산 β-산화와 관련된 유전자의 발현이 증가하며, 이를 통해 궁극적으로 체내 지방량이 현저히 감소됨을 발견하였다.

[0018] 본 명세서에서 용어 “억제제”는 바이페린의 활성 또는 발현의 저하를 야기시키는 물질을 의미하며, 이에 의해 바이페린의 활성 또는 발현이 탐지 불가능해지거나 무의미한 수준으로 존재하게 되는 경우 뿐 아니라, 바이페린에 의한 지방산 β-산화와 열생성의 억제가 유의하게 저하될 수 있을 정도로 바이페린의 활성 또는 발현을 저하시키는 물질을 의미한다.

[0019] 바이페린의 억제제는 예를 들어 당업계에서 이미 그 서열 및 구조가 공지된 단백질인 바이페린의 발현을 유전자 수준에서 억제하는 shRNA, siRNA, miRNA, 리보자임(ribozyme), PNA(peptide nucleic acids) 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드와, 단백질 수준에서 억제하는 항체 또는 앵타머 뿐 아니라, 바이페린의 활성을 억제하는 화합물, 펩타이드 및 천연물을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0020] 본 명세서에서 용어 “shRNA(small hairpin RNA)”는 *in vivo* 상에서 스템-루프(stem-loop) 구조를 이루는 단일 가닥으로 50-70개로 구성된 뉴클레오타이드로서, RNA 간섭을 통해 타겟 유전자의 발현을 억제하기 위한 타이트한 헤어핀 구조를 만드는 RNA 서열을 의미한다. 통상적으로 5-10개의 뉴클레오타이드의 루프 부위 양쪽으로 상보적으로 19-29개의 뉴클레오타이드의 긴 RNA가 염기쌍을 이루어 이중가닥의 스템을 형성하며, 언제나 발현되도록 하기 위하여 U6 프로모터를 포함하는 벡터를 통해 세포 내로 형질도입되며 대개 딸세포로 전달되어 타겟 유전자의 발현억제가 유전되도록 한다.

[0021] 본 명세서에서 용어 “siRNA”는 특정 mRNA의 절단(cleavage)을 통하여 RNAi(RNA interference) 현상을 유도할 수 있는 짧은 이중사슬 RNA를 의미한다. 타겟 유전자의 mRNA와 상동인 서열을 가지는 센스 RNA 가닥과 이와 상보적인 서열을 가지는 안티센스 RNA 가닥으로 구성된다. 전체 길이는 10 내지 100 염기, 바람직하게는 15 내지 80 염기, 가장 바람직하게는 20 내지 70 염기이고, 타겟 유전자의 발현을 RNAi 효과에 의하여 억제할 수 있는 것이면 평활(blunt)말단 혹은 점착(cohesive) 말단 모두 가능하다. 점착 말단 구조는 3 말단 돌출한 구조와 5 말단 쪽이 돌출한 구조 모두 가능하다.

[0022] 본 명세서에서 용어 “miRNA(microRNA)”는 세포내에서 발현되지 않는 올리고뉴클레오타이드로서 짧은 스템-루프 구조를 가지면서 타겟 유전자의 mRNA와 상보적인 결합을 통하여 타겟 유전자 발현을 억제하는 단일 가닥 RNA 분자를 의미한다.

[0023] 본 명세서에서 용어 “리보자임(ribozyme)”은 RNA의 일종으로 특정한 RNA의 염기 서열을 인식하여 자체적으로 이를 절단하는 효소와 같은 기능을 가진 RNA 분자를 의미한다. 리보자임은 타겟 mRNA 가닥의 상보적인 염기서열로 특이성을 가지고 결합하는 영역과 타겟 RNA를 절단하는 영역으로 구성된다.

[0024] 본 명세서에서 용어 “PNA(Peptide nucleic acid)”는 핵산과 단백질의 성질을 모두 가지면서 DNA 또는 RNA와 상보적으로 결합이 가능한 분자를 의미한다. PNA는 자연계에서는 발견되지 않고 인공적으로 화학적인 방법으로 합성되며, 상보적인 염기 서열의 천연 핵산과 혼성화(hybridization)를 통해 이중가닥을 형성하여 타겟 유전자

의 발현을 조절한다.

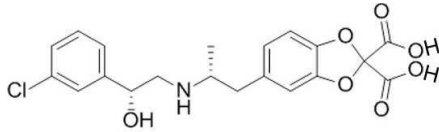
- [0025] 본 명세서에서 용어 “안티센스 올리고뉴클레오타이드”는 특정 mRNA의 서열에 상보적인 뉴클레오타이드 서열로서 타겟 mRNA 내의 상보적 서열에 결합하여 이의 단백질로의 번역, 세포질내로의 전위(translocation), 성숙(maturation) 또는 다른 모든 전체적인 생물학적 기능에 대한 필수적인 활성을 저해하는 핵산 분자를 의미한다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 효능을 증진시키기 위하여 하나 이상의 염기, 당 또는 골격(backbone)의 위치에서 변형될 수 있다(De Mesmaeker et al., *Curr Opin Struct Biol.*, 5(3):343-55, 1995). 올리고뉴클레오타이드 골격은 포스포로티오에이트, 포스포트리에스테르, 메틸 포스포네이트, 단쇄 알킬, 시클로알킬, 단쇄 헤테로아토믹, 헤테로시클릭 당솔포네이 등으로 변형될 수 있다.
- [0026] 본 발명에 따르면, 본 발명의 바이페린 억제제는 바이페린의 활성을 단백질 수준에서 저해하는 바이페린 특이적 항체일 수 있다. 바이페린을 특이적으로 인식하는 항체는 폴리클로날 또는 모노클로날 항체이며, 바람직하게는 모노클로날 항체이다.
- [0027] 본 발명의 항체는 당업계에서 통상적으로 실시되는 방법들, 예를 들어, 융합 방법(Kohler and Milstein, *European Journal of Immunology*, 6:511-519 (1976)), 재조합 DNA 방법(미국 특허 제4,816,567호) 또는 파아지 항체 라이브러리 방법(Clackson et al., *Nature*, 352:624-628(1991) 및 Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:58, 1-597(1991))에 의해 제조될 수 있다. 항체 제조에 대한 일반적인 과정은 Harlow, E. and Lane, D., *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, New York, 1999; 및 Zola, H., *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1984에 상세하게 기재되어 있다.
- [0028] 본 발명은 항체 대신 바이페린에 특이적으로 결합하는 앵타머를 이용하여 이의 활성을 억제할 수도 있다. 본 명세서에서 용어 “앵타머”는 특정 표적물질에 높은 친화력과 특이성으로 결합하는 단일 줄기의(single-stranded) 핵산(RNA 또는 DNA) 분자 또는 펩타이드 분자를 의미한다. 앵타머의 일반적인 내용은 Hoppe-Seyler F, Butz K "Peptide aptamers: powerful new tools for molecular medicine". *J Mol Med.* 78(8):426-30(2000); Cohen BA, Colas P, Brent R. "An artificial cell-cycle inhibitor isolated from a combinatorial library". *Proc Natl Acad Sci USA.* 95(24):14272-7(1998)에 상세하게 개시되어 있다.
- [0030] 본 명세서에서 용어 “대사질환”은 신진대사 이상을 원인으로 발생하는 각종 심혈관 질환과 제2형 당뇨병의 위험 요인들이 서로 군집을 이루는 현상을 한 가지 질환군으로 개념화시킨 것으로 인슐린 저항성 및 이와 관련된 복잡하고 다양한 여러 대사이상과 임상 양상을 모두 포괄하는 개념이다.
- [0031] 본 명세서에서 용어 “비만(obesity)”은 장기간에 걸쳐 에너지 섭취량이 에너지 소비량을 초과하여 잉여 에너지가 지방으로 저장됨으로써 체내에 지방조직이 과다해지는 상태를 의미한다. 통상 체질량지수(Body mass index: 체중(kg)/[신장(m)]²)가 25 이상이면 임상적으로 비만으로 정의된다.
- [0032] 본 명세서에서 용어 “당뇨”는 포도당-비관용(intolerance)을 초래하는 인슐린의 상대적 또는 절대적 부족으로 특징되는 만성질환을 의미한다. 본 발명의 조성물로 치료 또는 예방되는 당뇨는 모든 종류의 당뇨병을 포함하며, 예를 들어, 제1형 당뇨, 제2형 당뇨 및 유전성 당뇨를 포함한다. 제1형 당뇨는 인슐린 의존성 당뇨병으로서, β -세포의 파괴에 의해 주로 초래된다. 제2형 당뇨는 인슐린 비의존성 당뇨병으로서, 식사 후 불충분한 인슐린 분비에 의해 초래되거나 또는 인슐린 내성에 의해 초래된다.
- [0033] 본 명세서에서 용어 “이상지방혈증(dyslipidemia)”은 혈액 내의 지방농도 수치가 정상범위 밖에 있는 병적 상태(pathologic condition)를 의미하며, 예를 들어 고콜레스테롤혈증, 고중성지방혈증, 저-HDL-콜레스테롤혈증 및 고-LDL-콜레스테롤혈증 외에도 지단백의 대사 이상을 원인으로 하는 비정상적 지질상태를 모두 포함한다.
- [0034] 본 명세서에서 용어 “지방간”은 간의 지방대사 장애로 지방이 간세포에 과도한 양으로 축적된 상태를 말하며, 이는 협심증, 심근경색, 뇌졸중, 동맥경화, 지방간 및 췌장염 등과 같은 다양한 질병의 원인이 된다.
- [0035] 본 명세서에서 용어 “인슐린 저항성”은 혈당을 낮추는 인슐린의 기능이 떨어져 세포가 포도당을 효과적으로 연소하지 못하는 상태를 의미한다. 인슐린 저항성이 높을 경우, 인체는 너무 많은 인슐린을 만들어 내고 이로 인해 고혈압이나 이상지방혈증은 물론 심장병, 당뇨병 등까지 초래할 수 있다. 특히 제2형 당뇨병에서는 근육과 지방조직에서 인슐린의 증가를 알아채지 못하여, 인슐린의 작용이 일어나지 않는다. 용어 “인슐린 저항성 증후군”은 상기 인슐린 저항성에 의하여 유발된 질환을 총칭하는 개념으로 인슐린 작용에 대한 세포의 저항성, 고인슐린혈증 및 초저밀도지단백(very low density lipoprotein, VLDL)과 중성지방의 증가, 고밀도지단백(high

density lipoprotein, HDL)의 감소 및 고혈압 등을 특징으로 하는 질환을 의미하며, 심혈관질환과 제2형 당뇨병의 위험인자로 인식되고 있는 개념이다(Reaven GM, Diabetes, 37: 1595-607, (1988)).

- [0036] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물로 예방 또는 치료되는 이상지방혈증은 고지혈증이다.
- [0037] 본 명세서에서 사용되는 용어 “고지혈증”은 중성지방과 콜레스테롤 등의 지방대사가 제대로 이루어지지 않아 혈액 중에 높은 지질농도가 유지되어 유발되는 질환을 의미한다. 보다 구체적으로 고지혈증이란 혈액내의 중성지방, LDL 콜레스테롤, 인지질 및 유리 지방산 등의 지질 성분이 증가된 상태로 발생빈도가 높은 고콜레스테롤혈증 또는 고중성지방혈증을 포함한다.
- [0038] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물로 예방 또는 치료되는 지방간은 비알콜성 지방간이다.
- [0039] 본 명세서에서 용어 “비알콜성 지방간(Non-alcoholic fatty liver, NAFL)”은 알코올 흡수와 무관하게 간세포에 과도한 양의 지방이 축적되는 질환을 의미하고, 여기에는 단순지방간(steatosis)과 비알코올성 지방간염(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)이 포함된다. 단순 지방간은 임상적으로 예후가 양호한 편이나, 염증 혹은 섬유화를 동반하는 NASH는 진행성 간질환으로 간경변 또는 간암을 유발하는 전구질환으로 인지되고 있다. 비만과 인슐린저항성은 대표적인 비알콜성 지방간질환의 위험인자이다. 간섬유증 진행의 위험인자로는 가령, 비만(BMI>30), 혈중 간기능지표 비율(AST/ALT >1) 및 당뇨를 들 수 있고, 특히 C형 간염 보균자가 비알콜지방간일 경우 간암까지 진행될 수 있다. 비알콜성 지방간 환자의 69-100%는 비만환자이고, 비만환자의 20-40%는 비알콜성 지방간을 동반하며, 특히 유럽, 미국, 아시아의 비만아동의 10~77%가 비알콜성 지방간 병변을 보이는데, 이는 비알콜성 간질환의 가장 중요한 위험인자가 비만이기 때문이다.
- [0041] 본 명세서에서 용어 “예방”은 질환 또는 질병을 보유하고 있다고 진단된 적은 없으나, 이러한 질환 또는 질병에 걸릴 가능성이 있는 대상체에서 질환 또는 질병의 발생을 억제하는 것을 의미한다.
- [0042] 본 명세서에서 용어 “치료”는 (a) 질환, 질병 또는 증상의 발전의 억제; (b) 질환, 질병 또는 증상의 경감; 또는 (c) 질환, 질병 또는 증상을 제거하는 것을 의미한다. 본 발명의 조성물을 대상체에 투여하면 바이페린의 활성 또는 발현을 억제함으로써 열생성 및 지방 소모를 유도하여, 과도한 지방의 축적으로 인한 대사질환 증상의 발전을 억제하거나, 이를 제거하거나 또는 경감시키는 역할을 한다. 따라서, 본 발명의 조성물은 그 자체로 이들 질환 치료의 조성물이 될 수도 있고, 혹은 다른 약리성분과 함께 투여되어 상기 질환에 대한 치료 보조제로 적용될 수도 있다. 이에, 본 명세서에서 용어 “치료” 또는 “치료제”는 “치료 보조” 또는 “치료 보조제”의 의미를 포함한다.
- [0043] 본 명세서에서 용어 “투여” 또는 “투여하다”는 본 발명의 조성물의 치료적 유효량을 대상체에 직접적으로 투여함으로써 대상체의 체내에서 동일한 양이 형성되도록 하는 것을 말한다.
- [0044] 본 발명에서 용어 “치료적 유효량”은 본 발명의 약제학적 조성물을 투여하고자 하는 개체에게 조성물 내의 약리성분이 치료적 또는 예방적 효과를 제공하기에 충분한 정도로 함유된 조성물의 함량을 의미하며, 이에 “예방적 유효량”을 포함하는 의미이다.
- [0045] 본 명세서에서 용어 “대상체”는 제한없이 인간, 마우스, 래트, 기니아 피그, 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 원숭이, 침팬지, 비비 또는 붉은털 원숭이를 포함한다. 구체적으로는, 본 발명의 대상체는 인간이다.
- [0047] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 *Ucp1*, *Pgc1a*, *Cidea*, *Ppar α*, *Ppar β/δ*, *Cpt1*, *아디포넥틴*, *Fabp4* 및 *C/ebp α*로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 발현을 증가시킨다.
- [0048] 본 명세서에서 용어 “발현의 증가”는 상기 나열된 유전자의 발현 정량값이 본 발명의 바이페린 억제제를 투여하지 않은 대조군에 비하여 측정 가능할 정도로 증가한 경우를 의미하며, 구체적으로는 대조군에 비해 발현량이 110% 이상인 경우를 의미하고, 보다 구체적으로는 120% 이상인 경우를 의미하며, 가장 구체적으로는 130% 이상인 경우를 의미한다.
- [0049] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 아드레날린 신호 경로 활성화제를 추가적인 유효성분으로 포함한다.
- [0050] 후술하는 실시예에서 보는 바와 같이, 본 발명의 바이페린 억제제는 아드레날린 신호 경로를 경유하여 지방산 β-산화와 지방조직에서의 열생성 및 이에 따른 지방량의 감소를 유도하며, 바이페린을 억제하는 동시에 아드레날린 신호 경로를 활성화시킬 경우 이러한 지방 감소 효과는 더욱 증가하였다. 따라서 아드레날린 신호 경로 활성화제는 대사질환의 예방 또는 치료를 위해 병용 투여되는 보조적 유효성분으로서 이용될 수 있다.

[0051] 구체적으로는, 상기 아드레날린 신호 경로 활성화제는 $\beta 3$ -아드레날린 수용체(ADRB3) 아고니스트이며, 보다 구체적으로는 하기 화학식 1의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염이다:

[0052] **화학식 1**



[0053]

[0054] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 CL-316243 (5-[(2R)-2-[[(2R)-2-(3-클로로페닐)-2-하이드록시에틸]아미노]-1,3-벤조디옥솔-2,2-디카복실산)이다.

[0055] 본 명세서에서 용어 “약제학적으로 허용되는 염”은 약학적으로 허용되는 무기산, 유기산, 또는 염기로부터 유도된 염을 포함한다. 적합한 산의 예로는 염산, 브롬산, 황산, 질산, 과염소산, 푸마르산, 말레산, 인산, 글리콜산, 락트산, 살리실산, 숙신산, 톨루엔-p-설폰산, 타르타르산, 아세트산, 트리플루로초산, 시트르산, 메탄설폰산, 포름산, 벤조산, 말론산, 나프탈렌-2-설폰산, 벤젠설폰산 등을 들 수 있다. 적합한 염기로부터 유도된 염은 나트륨 등의 알칼리 금속, 마그네슘 등의 알칼리 토금속, 및 암모늄 등을 포함할 수 있다. 구체적으로는, 본 발명에서 사용되는 약제학적으로 허용되는 염은 나트륨염이다.

[0057] 본 발명의 조성물이 약제학적 조성물로 제조되는 경우, 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다.

[0058] 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

[0059] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 구체적으로는 경구, 정맥, 피하 또는 복강 투여될 수 있다.

[0060] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 바람직한 투여량은 성인 기준으로 0.001-100 mg/kg 범위 내이다.

[0061] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 분말제, 파립제, 정제 또는 캡셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0063] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 비만, 당뇨, 이상지방혈증(dyslipidemia), 지방간 및 인슐린 저항성 증후군(insulin resistance syndrome)으로 구성된 군으로부터 선택되는 대사질환(metabolic disorder)의 예방 또는 치료용 조성물의 스크리닝 방법을 제공한다:

[0064] (a) 바이페린(viperin)을 포함하는 생물학적 시료에 후보물질을 접촉시키는 단계;

[0065] (b) 상기 시료 내 바이페린의 활성 또는 발현량을 측정하는 단계,

[0066] 상기 바이페린의 활성 또는 발현량이 감소한 경우, 상기 후보물질은 대사질환의 예방 또는 치료용 조성물로 판정한다.

[0067] 본 발명에서 지시하는 “대사질환”의 의미에 대해서는 이미 상술하였으므로 과도한 중복을 피하기 위해 그 기재를 생략한다.

[0068] 본 발명에서 용어 “생물학적 시료”는 인간을 포함한 포유동물로부터 얻어지는, 바이페린을 발현하는 세포를 포

함하고 있는 모든 시료로서, 조직, 기관, 세포 또는 세포 배양액을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로는, 본 발명에서 이용되는 생물학적 시료는 간 조직, 심장 조직, 지방 조직, 이들로부터 유래한 세포 및 세포 배양액으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함한다.

[0069] 본 발명의 스크리닝 방법을 언급하면서 사용되는 용어 “시험물질”은 바이페린을 발현하는 세포를 포함하는 시료에 첨가되어 바이페린의 활성 또는 발현량에 영향을 미치는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 물질을 의미한다. 상기 시험물질은 화합물, 뉴클레오타이드, 펩타이드 및 천연 추출물을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 시험물질을 처리한 생물학적 시료에서 바이페린의 발현량 또는 활성을 측정하는 단계는 당업계에 공지된 다양한 발현량 및 활성 측정방법에 의해 수행될 수 있다. 측정 결과, 바이페린의 발현량 또는 활성이 감소한 경우 상기 시험물질은 대사질환의 예방 또는 치료용 조성물로 판정될 수 있다.

[0070] 본 명세서에서 용어 “발현의 감소”는 대상체 내에서 바이페린에 의한 열생성 및 지방분해의 억제활성이 유의하게 저해되어 대사질환 증상의 개선 및 회복에 이를 정도로 바이페린의 발현량이 감소하는 것을 의미한다. 구체적으로는 대조군에 비하여 활성 또는 발현량이 20% 이상 감소한 상태, 보다 구체적으로는 30% 이상 감소한 상태, 더욱 구체적으로는 40% 이상 감소한 상태를 의미할 수 있다.

[0071] 본 명세서에서 용어 “활성의 감소”란 대조군에 비하여 바이페린 단백질의 생체내 고유한 기능이 측정 가능할 정도로 유의하게 감소하는 것을 말하며, 구체적으로는 대사질환 증상의 개선 및 회복에 이를 정도로 바이페린의 활성이 감소하는 것을 말한다. 활성(activity)의 감소는 단순한 기능(function)의 감소 뿐 아니라 안정성(stability)의 감소로 기인한 궁극적인 활성 저해를 포함한다.

발명의 효과

[0073] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0074] (a) 본 발명은 대사질환(metabolic disorder)의 예방 또는 치료용 조성물 및 이의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0075] (b) 본 발명은 지방 조직에서의 열생성과 대사활성을 현저히 증가시켜 체내 지방의 급격한 감소를 야기함으로써, 비만을 비롯한 다양한 대사증후군의 효율적인 치료 조성물로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0077] 도 1은 지방 조직에서 바이페린의 내재적 발현이 대사 및 열생성을 조절함을 보여주는 그림이다. 도 1a는 SPF 및 GF 마우스의 다양한 조직에서의 바이페린 발현을 보여준다. 도 1b는 WT 및 바이페린 KO 마우스의 지방 조직인 eWAT, iWAT 및 BAT의 육안 형태를 나타낸다. WT 및 바이페린 KO 마우스에 15주령부터 30주령까지 RC 또는 HFD를 먹이고(15 주간 섭식) 체중(n=4-7)(도 1c), 신체 조성(n=4-7)(도 1d), 지방 조직의 바이페린 발현(n=3)(도 1e), 지방 조직과 간에서의 대표적인 H&E-염색 이미지(스케일바: 200 μ m)(도 1f); 혈청 대사체(HDL, TG, TCHO 및 GLU), AST 및 ALT(n = 4-7)(도 1g); 복강 글루코스 내성(n = 7-8)(도 1h); 및 열생성율(n = 4-7; 간접 열량측정)(도 1i)을 조사한 결과를 각각 나타낸다. 데이터는 생물학적으로 독립적인 시료들의 평균±표준오차로 나타났다. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001 vs. WT.

도 2는 바이페린 결핍이 지방조직에서의 열생성-관련 유전자 및 단백질의 발현을 촉진시킴을 보여주는 그림이다. RC 또는 HFD를 15주간 먹인 WT 및 바이페린 KO 마우스에서 지방 조직을 분리하였다. 도 2a는 지방 조직에서 열생성 및 지방산 β -산화 관련 유전자의 상대적인 mRNA 수준을 보여준다(n=6). 도 2b는 BAT에서 바이페린 및 UCP1의 단백질 발현을 나타낸다(n=3). 도 2c는 지방 조직에서 UCP1에 대한 면역조직화학 염색결과를 보여준다(스케일바:200 μ m). 도 2d는 지방 조직의 면역형광 염색 결과를 나타낸다. DAPI, 핵(파란색); 바이페린(녹색); MFN-1, 미토콘드리아 마커(붉은색). 화살표는 미토콘드리아에 위치한 바이페린을 가리킨다(스케일바:50 μ m). 데이터는 생물학적으로 독립적인 시료들의 평균±표준오차로 나타났다. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 vs. WT.

도 3은 바이페린 결핍이 열생성을 촉진하고 저온 내성을 가져옴을 보여주는 그림이다. 도 3a는 7일간의 저온 노출기간 동안 21주령 WT 및 바이페린 KO 마우스의 직장 온도를 보여준다(n=4-7). 만성적인 저온에 노출시킨 WT 및 바이페린 KO 마우스에서의 지방조직의 총중량(n=4-7)(도 3b), 지방조직에서 열생성 및 지방산 β -산화 관련 유전자의 상대적인 mRNA 수준(n=4-7)(도 3c), BAT에서 바이페린 및 UCP1의 단백질 발현(n=3)(도 3d) 및 지방 조직에서 UCP1에 대한 면역조직화학 염색 결과(스케일바: 200 μ m)(도 3e)를 각각 나타내었다.

도 4는 ADRB3 아고니스트가 바이페린 KO 마우스에서 열발생 표현형을 촉진함으로 보여주는 그림이다. WT 및

바이페린 KO 마우스에 CL-316243 및 ADRB3 아고니스트를 복강(1mg/kg 체중/일)으로 3일간 투여하였다. CL-처리 마우스에 대해서, 도 4a는 열생성률($n = 6$; 간접 열량측정), 도 4b는 복강 글루코스 내성($n = 6$), 도 4c는 지방 조직의 총중량($n = 6$), 도 4d는 지방 조직에서의 열생성- 및 지방산 β -산화-관련 유전자의 상대적인 mRNA 수준($n = 6$), 도 4e는 iWAT에서의 바이페린과 UCP1의 단백질 발현 수준($n = 3$), 그리고 도 4f는 지방 조직의 UCP1에 대한 면역조직화학 염색 결과(스케일바: 200 μ m)를 각각 나타낸다. 데이터는 생물학적으로 독립적인 시료들의 평균 \pm 표준오차로 나타났다. * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$ vs. WT.

도 5는 바이페린이 지방세포-자율적으로 지방산 β 산화-매개 열생성을 조절함을 보여주는 그림이다. SVF를 BAT로부터 분리한 뒤 성숙한 갈색 지방세포로 분화시켰다. 도 5a는 분화하는 동안 갈색 지방세포에서의 지방생성-, 열생성- 및 지방산 β -산화-관련 유전자의 상대적인 mRNA 수준을 나타낸다. 도 5b 및 5c는 CL-처리된 갈색 지방세포(도 5b) 및 ETO(에토목실; 좌측)- 또는 RAN(라노라진; 우측)-처리된 갈색 지방세포(도 5c)에서의 열생성-관련 유전자의 상대적인 mRNA 수준을 각각 보여준다. 도 5d는 CL 처리(상단) 또는 ETO 처리(하단) 후 WT 및 바이페린 KO 갈색 지방세포에서의 OCR 및 미토콘드리아 파라미터(기저 호흡, ATP 생성, 양이온 누출 및 최대 호흡)를 보여준다. 데이터는 2개의 독립적인 실험값에 대한 평균 \pm 표준오차로 나타났다. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ vs. WT.

도 6은 15주령부터 30주령까지 RC 또는 HFD를 먹인(15주간 섭식) 중간 연령 WT 및 바이페린 KO 마우스의 표현형을 보여주는 그림이다. 각각 기관 무게($n=4-7$)(도 6a), 지방 조직(eWAT, iWAT 및 BAT)과 간 조직 단면의 H&E 염색을 통해 관찰한 지방세포와 간 지질방울 크기($n=4-7$)(도 6b), 산소 소모율(VO_2), 이산화탄소 생성율(VCO_2), 음식 섭취율, 활동성 및 호흡 교환비(RER)($n=4-7$; 간접 열량측정)(도 6c)를 보여준다. 데이터는 생물학적으로 독립적인 시료들의 평균 \pm 표준오차로 나타났다 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs.

도 7는 RC 또는 HFD를 6주령에서 21주령까지 먹인(15주간 섭식) 어린 WT 및 바이페린 KO 마우스의 표현형을 보여주는 그림으로, 체중($n=3-6$)(도 7a), 신체 조성($n=3-6$)(도 7b), 혈청 대사체(HDL, TG, TCHO 및 GLU)($n=3-6$)(도 7c), 기관 무게($n=3-6$)(도 7d), 지방 조직과 간에서의 대표적인 H&E-염색 이미지(스케일바: 200 μ m)(도 7e), VO_2 , VCO_2 , 음식 섭취율, 활동성 및 호흡 교환비($n=3-6$)(도 7f)를 각각 보여준다. 데이터는 생물학적으로 독립적인 시료들의 평균 \pm 표준오차로 나타났다. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ vs. WT

도 8은 RC 또는 HFD를 단기간 동안 먹인 중간 연령 WT 및 바이페린 KO 마우스의 표현형을 보여주는 그림이다. WT 및 바이페린 KO 마우스에 RC 또는 HFD를 16주령에서 20주령까지 먹였다(4주간 섭식). 도 8a는 체중변화를($n=5-7$), 도 8b는 신체 조성율($n=5-7$), 도 8c는 혈청 대사체(HDL, TG, TCHO 및 GLU)를($n=5-7$), 도 8d는 기관 무게를($n=5-7$), 도 8e는 VO_2 , VCO_2 , 음식 섭취율, 활동성 및 호흡 교환비($n=5-7$)(도 8e)를 각각 나타낸다. 데이터는 생물학적으로 독립적인 시료들의 평균 \pm 표준오차로 나타났다.

도 9는 RC 또는 HFD를 장기간 동안 먹인 어린 마우스의 지방조직에서 열생성-관련 유전자의 발현을 보여주는 그림이다. WT 및 바이페린 KO 마우스에 RC 또는 HFD를 6주령에서 21주령까지 먹였다(15주간 섭식). RC(도 9a) 또는 HFD(도 9b)를 먹인 마우스의 지방조직에서 열생성- 및 지방산 β -산화 관련 유전자의 상대적인 mRNA 수준을 각각 나타낸다($n=3-4$). 데이터는 생물학적으로 독립적인 시료들의 평균 \pm 표준오차로 나타났다. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. WT.

도 10은 RC 또는 HFD를 단기간 동안 먹인 중간 연령 마우스의 지방조직에서 열생성-관련 유전자의 발현을 보여주는 그림이다. WT 및 바이페린 KO 마우스에 RC 또는 HFD를 16주령에서 20주령까지 먹였다(4주간 섭식). RC(도 10a) 또는 HFD(도 10b)를 먹인 마우스의 지방조직에서 열생성- 및 지방산 β -산화 관련 유전자의 상대적인 mRNA 수준을 각각 나타낸다($n=3-4$). 데이터는 생물학적으로 독립적인 시료들의 평균 \pm 표준오차로 나타났다. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. WT.

도 11은 RC 또는 HFD를 장기간 먹인 중간 연령 마우스의 지방조직에서 사이토카인 발현을 관찰한 결과이다. WT 및 바이페린 KO 마우스를 RC 또는 HFD를 15주령에서 30주령까지 먹였다(15주간 섭식). 도 11a는 지방조직에서 바이페린에 대한 면역조직화학 염색 결과를 나타내며(스케일바: 200 μ m), 도 11b는 지방조직의 면역형광 염색 결과를 보여준다. DAPI, 핵(blue); 바이페린(파란색); F4/80, 대식세포 마커(붉은색). 화살표는 대식세포에 위치한 바이페린을 가리킨다. 닫힌 화살표 머리는 바이페린을, 열린 화살표 머리는 대식세포를 각각 나타낸다. 도 11c 및 d는 RC를 먹인 마우스(도 11c)와 HFD를 먹인 마우스(도 11d)의 지방조직에서 사이토카인의 상대적인 mRNA 수준을 각각 나타낸다($n=3-4$). 데이터는 생물학적으로 독립적인 시료들의 평균 \pm 표준오차로 나타났다. * $P < 0.05$ vs. WT.

도 12은 CL 처리 후 WT 및 바이페린 KO 마우스의 대사 표현형을 보여주는 그림이다. 21주령의 WT 및 바이페린 KO 마우스에 β 3-아드레날린 수용체(ADRB3)-아고니스트인 CL-316243을 3일간 복강투여(1mg/kg 체중/일)하고 VO_2 , VCO_2 , 음식 섭취율, 활동성 및 호흡 교환비($n=6$, 간접 열량측정)를 측정하였다. 데이터는 생물학적으로 독립적인 시료들의 평균±표준오차로 나타냈다. * $P<0.05$ vs. WT

도 13은 저온 노출 또는 CL를 처리한 뒤 HFD를 먹인 WT 및 바이페린 KO 마우스의 열발생 표현형을 보여주는 그림이다. WT 및 바이페린 KO 마우스에 HFD를 6주령부터 21주령까지 먹였다(15주간 섭식). 7일간 저온 노출된 21주령 마우스의 직장 온도를($n=4-5$)(도 13a), BAT($n=3$)에서 바이페린 및 UCP1의 발현을(도 13b), 지방조직에서 UCP1에 대한 면역조직화학 염색 결과를(도 13c) 각각 나타내었다. HFD를 먹인 21주령 WT 및 바이페린 KO 마우스에 CL-316243을 3일간 복강투여(1mg/kg 체중/일)한 뒤, 글루코스 내성을 측정하고(도 13d), iWAT과 BAT에서의 바이페린 및 UCP1 단백질의 발현을 각각 측정하며($n=3$)(도 13e 및 도 13f)($n=3$), 지방조직에서의 UCP1에 대한 면역조직화학 염색을 수행하였다(도 13g)(스케일바:200 μ m). 데이터는 생물학적으로 독립적인 시료들의 평균±표준오차로 나타냈다. * $P<0.05$ 및 ** $P<0.01$ vs. WT.

도 14는 HFD 섭식 및/또는 저온 노출 후 WT 마우스의 갈색 지방조직에서의 바이페린 발현수준을 비교한 결과를 보여준다. WT 마우스에 RC 또는 HFD를 15주간 먹이거나 또는 저온상태에 7일간 노출시킨 후 BAT에서의 단백질 발현을 측정하였다($n=3$). 데이터는 생물학적으로 독립적인 시료들의 평균±표준오차로 나타냈다.

도 15은 갈색 지방세포에서 바이페린의 세포 자율기능(Cell-autonomous function)을 보여주는 그림이다. BAT으로부터 SVF를 분리하여 성숙 갈색 지방세포로 분화시켰다. 도 15a는 분화하는 동안 갈색 지방세포에서 지방생성 및 열생성-관련 유전자의 상대적인 RNA 수준을 나타낸다. 도 15b는 분리된 SVF 및 SVF-분화된 갈색 지방세포에서 사이토카인의 상대적 mRNA 수준을 나타낸다. 데이터는 2개의 독립적인 실험값에 대한 평균±표준오차로 나타냈다. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 및 *** $P<0.001$ vs. WT.

도 16은 백색 지방세포에서 바이페린의 세포 자율기능(Cell-autonomous function)을 보여주는 그림이다. eWAT으로부터 SVF를 분리하여 성숙 백색 지방세포로 분화시켰다. 도 16a는 분화하는 동안 백색 지방세포에서 지방생성 및 열생성-관련 유전자의 상대적인 mRNA 수준을 나타낸다. 도 16b는 ETO(에토복솔)- 또는 RAN(라노라진)을 처리한 백색 지방세포에서의 바이페린 및 UCP1의 상대적인 mRNA 수준을 나타낸다. 데이터는 2개의 독립적인 실험값에 대한 평균±표준오차로 나타냈다. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 및 *** $P<0.001$ vs. WT

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0078] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0080] 실시예

[0081] 실험방법

[0082] 동물 실험

[0083] 모든 동물실험은 연세대학교 의과대학의 동물실험윤리위원회의 승인 하에 그 가이드라인을 준수하면서 수행하였다. 마우스는 SPF (pathogen-free) 격리장치에서 22°C의 12시간 광조건/12시간 암조건에서 유지하고, 물과 먹이를 자유롭게 먹도록 하였다.

[0085] 동물식이

[0086] 본 발명에서는 야생형(WT) 및 바이페린(Rsad2) 녹아웃(KO) C57BL/6 수컷 마우스를 종래에 보고된 바와 같이 이용하였다(1). WT 및 바이페린 KO 마우스를 함께 배양하면서 일반식이(RC) 또는 고지방 식이(HFD)(60% of the 총 칼로리의 60%가 지방, 20%가 탄수화물, 20%가 단백질)(D12492; Research Diets)를 15주령에서 30주령까지(15 주간 섭식) 또는 6주령에서 21주령까지(15 주간 섭식) 먹였다.

[0088] 조직 분리

[0089] 간, 심장, 중뇌, eWAT, iWAT 및 BAT를 RC 또는 HFD를 먹인 WT 및 바이페린 KO 마우스로부터 적출하였다. GF(germ-free) C57BL/6 마우스의 조직은 Charles D. Surh 박사(POSTECH)로부터 제공받았다.

- [0091] 신체 조성 및 혈액화학분석
- [0092] 지방 및 제지방체중 값은 1H 자기공명분광계(Bruker)를 이용하여 측정하였다. 혈청은 모든 마우스로부터 채집하였다. 고밀도 지단백질 콜레스테롤(HDL-C), 중성지방(TG), 총 콜레스테롤(TCHO), 글루코스(GLU), AST, 및 ALT 농도는 Roche cobas c111 분석기를 이용하여 측정하였다.
- [0094] 글루코스 내성 시험
- [0095] 마우스를 16시간 동안 굶기고 글루코스(1g/kg 체중)를 복강투여한 뒤 혈중 글루코스 수준을 0, 15, 30, 45, 60 및 120분에 당측정기(glucometer, Allmedicus)를 이용하여 측정하였다.
- [0097] 간접적 열량 측정
- [0098] 대사 능력(에너지 흡수 및 에너지 소비)을 간접적 열량계산 시스템(Phenomaster; TSE Systems)을 이용하여 측정하였다. 실험 전에, 마우스를 2일 간 대사 챔버(metabolic chamber)에 적응시켰다. 이후 산소 소모율(VO_2 ; mL/kg/h), 이산화탄소 생성률(VCO_2 ; mL/kg/h), 열 생성율(에너지 소비; kcal/kg/h), 음식 섭취율(kcal/kg/h), 호흡 교환비(RER; VCO_2/VO_2) 및 활동성을 3일간 측정하였다. 열 생성 및 RER은 가스 교환 데이터로부터 계산하였다. 활동성은 적외선 빔을 이용하여 지정된 측정 기간 동안의 빔 깨짐 횟수를 측정함으로써 평가하였다. 대사 데이터는 제지방 체중에 대해 정규화하였다. 모든 마우스는 22°C의 12시간 광조건/12시간 암조건에서 유지하였다.
- [0100] 체온 및 저온 노출
- [0101] 열충격 적응을 위해, 20주령 WT 및 바이페린 KO 수컷 마우스(케이지당 한 마리)를 동물 인큐베이터(Dae Han Bio Link)에 넣고 30°C에서 12시간 광조건/12시간 암조건으로 2-3일간 RC 또는 HFD를 먹였다(2, 3). 저온 노출을 위해 인큐베이터를 4°C까지 감온하고 마우스를 넣은 뒤 7일간 자유롭게 물과 먹이를 먹도록 하였다. 저온노출 동안 상이한 시간간격으로 심부체온(core body temperature)을 측정하였다. 또한, HFD를 먹인 21주령 WT 및 바이페린 KO 마우스에 ADRB3 아고니스트인 CL-316243(Sigma-Aldrich)을 1mg/kg 체중/일로 3일간 복강투여하였다.
- [0103] 조직학적 분석
- [0104] 지방 조직을 채집하고 PBS에 용해된 4%(wt/vol) 파라포름알데히드로 고정된 뒤 파라핀에 포매하였다. 파라핀-포매된 조직 단면을 자일렌으로 탈파라핀화하고 100%, 95% 및 70%(vol/vol) 에탄올로 재수화하였다. 이들 샘플을 H&E(hematoxylin and eosin) 염색, 면역조직화학 및 면역형광 분석에 사용하였다. 압력 용기(Dako Denmark) 내 타겟 회수용액에서 항원을 회수하였다. 내인성 퍼옥시다제 활성을 3% H_2O_2 (vol/vol)로 블로킹하고 무혈청의 바로 사용 가능한(ready-to-use) 단백질 블로킹 용액(Dako Denmark)에서 단백질을 블로킹하였다. 면역형광을 위해 샘플을 were then treated with 바이페린 특이적 1차 항체(MaP.VIP), MFN-1 특이적 1차 항체(Santa Cruz Biotechnology) 및 UCP1(uncoupling protein 1) 특이적 1차 항체(Abcam)와, Alexa Fluor 488- 또는 555-접합 2차(Invitrogen)로 처리하였다. 이미지는 공초점 현미경(LSM 700; Carl Zeiss)으로 캡처하였다.
- [0106] 정량적 이미지 분석
- [0107] 대표적 이미지들을 광학 현미경(Olympus BX43)으로 캡처하였다. 지방세포의 크기 및 간의 지질방울을 Toup view 3.7.으로 분석하였다. 정량화를 위해, 각 샘플에 대해 5개 필드(field)를 임의로 선정하고, 200×배율의 광학 필드에서 지방세포의 직경 및 간의 지질방울을 측정하였다. 측정된 수의 지방세포 및 간의 지질방울로부터 평균 직경을 계산하였다.
- [0109] 면역블롯 분석.
- [0110] WT 및 바이페린 KO 마우스에서 채집한 지방 조직을 프로테아제 억제제(Complete Mini; F. Hoffmann-La Roche) 및 포스파타제 억제제(PhosSTOP; F. Hoffmann-La Roche)와 함께 1×RIPA 완충액에서 균질화하였다 1× RIPA buffer with 프로테아제 억제제 (Complete Mini; F. Hoffmann-La Roche) and 포스파타제 억제제 (PhosSTOP; F. Hoffmann-La Roche). 모든 샘플을 6,000×g로 20분간 4°C에서 원심분리하고 상층액을 수집하였다. 단백질 농도는 비시초닌산 어세이(Thermo Fisher Scientific)를 통해 측정하였다. 단백질을 10% SDS/PAGE 겔을 통해 분리하고 PVDF 막으로 옮겼다. 블롯을 PBS에 용해된 5% 탈지유 및 0.05% Tween에서 1시간 동안 블로킹하고 1차 항체와 함께 배양한 뒤 probed with 항-Ig 호스래디쉬-접합 2차 항체로 표지한 다음 강화 화학발광 시약(Thermo

Fisher Scientific)과 함께 배양하였다. GRP94(Abcam, Cambridge, UK) 또는 α -튜블린을 로딩 대조군으로 사용하였다.

[0112] RNA 추출, cDNA 제작 및 정량적 실시간 PCR.

[0113] Qiagen RNeasy Mini Kit을 이용하여 세포 또는 지방 조직으로부터 총 RNA를 분리하였다. cDNA 합성은 RNA 1 μ g을 가지고 Prime Script First-Strand cDNA 합성 키트(TaKaRa Bio)를 이용하여 제조자의 지시에 따라 수행하였다. cDNA는 SYBR Green PCR Kit(Applied Biosystems)을 이용하여 qRT-PCR로 정량화하였다. 반응을 95°C에서 10분간 수행한 뒤 95°C에서 30초, 55°C에서 1분, 72°C에서 30초의 3단계 PCR 프로그램을 50사이클 반복하였다. PCR에 사용된 프라이머는 표 1에 나열하였다. CPT1는 CPT1A, CPT1B 및 CPT1C의 3개의 이성질체를 가지는데, 본 발명에서는 *Cpt1b*에 대한 프라이머를 사용하였다. PCR은 각 시료에 대해 3회 반복하였다. 정량화는 $Ct(2^{-\Delta\Delta Ct})$ 비교 방법으로 수행하였다. 각 샘플의 Ct 값은 β -액틴 유전자에 대해 정규화하였다. 2개의 독립적 실험을 통계적으로 분석하여 P 값을 각 도면에 표시하였다.

표 1

[0114] 정량적 실시간 PCR에 사용된 마우스 특이적 프라이머 서열

유전자	정"넙*	역방향
Viperin	GTGAATACTTGGGCAAGCT	CAAATACTCCCCATAGTCC
Ucp1	GGCCTCTACGACTCAGTCCA	TAAGCCGGCTGAGATCTTGT
Pgc1 α	CCCTGCCATTGTTAAGACC	TGCTGCTGTTCTCTGTTTTC
Prdm16	CAGCACGGTGAAGCCATTC	GCGTGCATCCGCTTGTTG
Cidea	TGCTCTTCTGTATCGCCAGT	GCCGTGTTAAGGAATCTGCTG
Ppar γ	GTGCCAGTTTCGATCCGTTAGA	GGCCAGCATCGTGTAGATGA
Ppar α	TCGGCGAACTATTCGGCTG	GCACTTGTTGAAAACGGCAGT
Ppar β / δ	TTGAGCCCAAGTTCGAGTTTG	CGGTCTCCACACAGAATGATG
Cpt1b	TCTATGAGGGCTCGCG	CGTCAGGGTGTAGCA
IL-6	CCTCTGGTCTTCTGGAGTACC	ACTCCTTCTGTGACTCCAGC
IL-10	ATAACTGCACCCACTTCCCA	GGGCATCACTTCTACCAGGT
IL-13	GCAGCATGGTATGGAGTGTG	TGGCGAAACAGTTGCTTTGT
IL-1 β	GTGGCTGTGGAGAAGCTGTG	GAAGGTCCACGGGAAAGACAC
TNF- α	ATGAGCACAGAAAGCATG	AGTAGACAGAAGAGCGTGGT
TGF- β	CCTGCAAGACCATCGCATG	TGTTGTACAAAGCGAGCACC
C/ebp α	CAAAGCCAAGAAGTCGGTGGACAA	TCATTGTGACTGGTCAACTCCAGC
아디포넥틴	CCGGGACTCTACTACTTCTCTT	TTCCTGATACTGGTCGTAGGT
Fabp4	ACACCGAGATTTCCTTCAAACCTG	CCATCTAGGGTTATGATGCTCTTC
β -액틴	GCTCCGGCATGTGCAA	AGGATCTTCATGAGGTAGT

[0116] SVF 분리 및 지방세포로의 분화.

[0117] RC를 먹인 3주령 내지 6주령 수컷 마우스로부터 갈색 및 백색 지방 간질혈관분획(stromal vascular fraction, SVF)을 종래에 보고된 방법을 조금 변형하여 수득하였다(4). 요약하면, 지방 조직을 잘게 다진 뒤 1형 콜라게나아제(Worthington Biochemical) 1mg/mL를 포함하는 HBSS(Hanks' balanced salt solution)용액에서 37°C에서 50분 간 분해하였다. 조직 부유액을 45 μ m 세포 스트레이너로 여과하고 470 \times g로 15분간 원심분리하였다. 펠렛을 10% FBS와 1% 페니실린/스트렙토마이신이 보충된 지방세포 배양 배지에 재부유하고 플레이팅하였다. 컨플루언스에 도달하면, 500 μ M 3-이소부틸-1-메틸잔틴(IBMX), 0.5 μ M 텍사메타손, 20nM 인슐린, 125 μ M 인도메타신 및 1nM T3(이상 Sigma-Aldrich)를 이용하여 1차 갈색 지방세포의 분화를 자극하였다. 백색 지방 전구세포는 500 μ M IBMX, 1 μ M 텍사메타손 및 10 μ g/mL 인슐린이 보충된 표준 배양액에서 배양하였다. 세포는 자극 6일째에 완전히 분화하여 1nM T3 및 20nM 인슐린이 보충된 보존 배지로 옮겼다. 완전 분화된 지방세포에 100nM CL-316243, 50 μ M 에토목실(etomoxir) 또는 50 μ g/mL 라노라진(ranolazine) (이상 Sigma-Aldrich)을 24시간 동안 처리하였다. 세포는 5% CO₂의 가습 인큐베이터에서 37°C로 배양하였으며, 배양액은 2일에 한 번씩 교체하였다.

[0119] 1차 갈색 지방세포의 세포 호흡 분석.

[0120] 1차 갈색 지방세포의 세포 OCR은 Seahorse XF96 세포의 유동 분석기 (Seahorse Bioscience)를 이용하여 측정하

였다. 분화된 지방세포를 10,000세포/웰의 밀도로 플레이팅하였다. 지방세포에 100nM CL-316243 또는 50 μ M 에토평몰을 24시간 동안 처리하였다. 기준선 세포 OCR은 비처리 세포에서 측정하였다. 미토콘드리아 호흡 사슬 복합체의 억제제인 올리고마이신(complex V 억제제) 1 μ M, 카르보닐사이아나이드-4-(트리플루오로메톡시)페닐하이드라존(FCCP;미토콘드리아 언커플러(uncoupler)) 1 μ M 및 로테논/안티마이신 A(complex I/III 억제제) 0.5 μ M를 순차적으로 처리하였다. 기저 호흡, ATP 생성, 양이온 누출 및 최대 호흡을 포함하는 미토콘드리아 파라미터는 억제제 첨가 전후로 OCR로부터 계산하였다. 기저 호흡은 기준선 세포 OCR에서 비미토콘드리아 호흡을 뺀으로써 도출하였다. ATP 생성은 기준선 세포 OCR에서 올리고마이신 rate를 뺀으로써 측정하였으며, 양이온 누출은 올리고마이신 rate에서 비미토콘드리아성 호흡을 뺀으로써 도출하였다. 최대 호흡은 FCCP rate에서 비미토콘드리아성 호흡을 뺀으로써 계산하였다. 비미토콘드리아성 호흡은 로테논/안티마이신 A의 첨가 후 측정하였다.

[0122] 통계적 분석.

[0123] 데이터는 평균 \pm 표준오차로 나타냈었다. 통계적 유의성은 비대응 양측분포 Student *t*-검정을 이용하여 결정하였다. $P < 0.05$ 인 경우 통계적 유의성을 가지는 것으로 간주하였다.

[0125] 실험결과

[0126] *바이페린의 내재적 발현이 지방대사 및 열생성을 조절한다.*

[0127] 본 발명자들은 IFN-유도 단백질인 바이페린의 내재적 발현이 특정 조직에서 새로운 기능을 제공할 것이라 가정하였다. 이런 관점에서, SPF 마우스 및 GF 마우스의 다양한 조직에서 바이페린 발현을 스크리닝하였다(도 1a). 바이페린은 간, 심장, 부고환 WAT(eWAT), 서혜 WAT(iWAT) 및 BAT에서 발현되었으나, 뇌에서는 발현되지 않았다. WT 및 바이페린 KO 마우스의 조직 크기 비교 결과 바이페린 KO 마우스에 비해 WT 마우스가 eWAT 및 iWAT의 크기가 더 컸다(도 1b). 이러한 결과는 지방 조직에서 바이페린의 내재적 발현은 대사조절 기능과 관련되어있을 수 있음을 시사한다.

[0128] 이러한 가설을 시험하기 위해, WT 및 바이페린 KO 마우스에 RC 또는 HFD를 15주령에서 30주령까지 먹였다(15주간 섭식;장기간). 놀랍게도, RC를 먹인 WT 및 바이페린 KO 마우스 간에는 체중이 조금 차이가 있었으나, HFD를 먹인 마우스 간에는 그렇지 않았다(도 1c). 그러나, 신체조성 분석 결과 지방 질량은 RC 또는 HFD를 먹인 바이페린 KO 마우스에서 감소되었다(도 1d). 지방 조직의 무게를 제외하고, WT 및 바이페린 KO 마우스 간에 지방, 신장 및 고환과 같은 다른 조직의 무게는 큰 차이가 없었다(도 6 a). 이는 바이페린이 조직-특이적으로 효과를 나타냄을 시사한다. 바이페린 발현은 HFD를 먹인 WT 마우스의 지방 조직에서 증가하였다(도 1e). 따라서, 바이페린 결핍은 지방세포의 크기를 감소시키며, HFD를 먹인 마우스에 축적된 간의 지질방울 크기의 감소를 가져왔다(도 1f 및 도 6b). 바이페린 결핍은 또한 혈청의 총 콜레스테롤, AST(aspartate aminotransferase) 및 ALT(alanine aminotransferase)를 감소시켜 HFD-유도 글루코스 내성을 개선시켰다(도 1g 및 1h).

[0129] 본 발명자들은 간접 열량측정을 통해 WT 및 바이페린 KO 마우스의 대사 표현형을 분석한 결과(도 1I 및 도 6c), 바이페린 결핍이 열 생성률, 산소 소모율 및 이산화탄소 생성률을 유의하게 증가시킴을 확인하였다. 지방조직의 지방산 β -산화는 열생성에 필요하므로, 이러한 발견은 지방조직에서의 열생성에 바이페린이 관여함을 시사한다. 나아가, 바이페린 KO 마우스에서 먹이 섭식율이 높은 것은 이들 동물에서의 지방 감소 표현형이 활발한 열생성에서 기인한다는 점을 보여준다.

[0130] 본 발명자들은 상이한 연령과 기간 동안 RC 또는 HFD를 먹인 WT 및 바이페린 KO 마우스의 표현형을 비교하였다. 마우스에 RC 또는 HFD를 6주령에서 21주령까지(15주간 섭식)(도 7) 또는 16주령에서 20주령까지(4주간 섭식; 단기간)(도 8) 먹였다. HFD를 단기간 먹인 마우스를 제외한 모든 마우스에서 표현형을 반복적으로 비교하였으며(도 7 및 도 8), 그 결과 바이페린-매개 표현형은 마우스의 연령보다는 섭식 기간에 좌우된다는 사실을 발견하였다.

[0132] *바이페린 결핍은 지방 조직에서의 열발생 유전자 발현을 촉진시킨다.*

[0133] 바이페린 발현이 지방산 β -산화 매개된 열생성에 관련되었는지를 조사하기 위해, *Ucp1*, *Pgc1a* 및 *Cidea*와 같은 열생성 관련 유전자와 *Ppar α* , *Ppar β/δ* 및 *Cpt1*와 같은 지방산 β -산화 관련 유전자의 발현 수준을 지방 조직에서 측정하였다(도 2a, 도 9 및 도 10). 이들 유전자의 발현 수준은 지방조직, 특히 RC를 먹인 바이페린 KO 마우스의 eWAT 및 iWAT에서 유의하게 증가하였다(도 2a, 도 9a 및 도 10a). 이들 유전자는 HFD를 장기간 먹인 바이페린 KO 마우스의 iWAT 및 BAT에서도 유의하게 증가하였지만, HFD를 단기간 먹인 경우에는 그렇지 않았다(도 2a, 도 9b 및 도 10b). UCP1 단백질 발현은 RC 또는 HFD를 먹인 바이페린 KO 마우스의 지방 조직에서 증

가하였다(도 2b 및 2c). 바이페린 발현은 HFD를 먹인 WT 마우스의 지방조직에서도 증가하였다(도 2b 및 도 11a). 나아가, 바이페린은 RC 또는 HFD를 먹인 WT 마우스의 BAT에서 미토콘드리아로 이동하였다(도 2d). 이러한 데이터는 바이페린이 지방조직의 열생성을 저해하며, 이는 지방세포의 미토콘드리아에서 지방산 β -산화를 억제함으로써 이루어짐을 시사한다. 대식세포와 호산구 등의 면역세포에서 분비되는 IL-10 및 IL-13 등의 사이토카인은 지방조직의 열생성을 조절한다고 보고되었다(5-7). 본 발명자들은 최근 바이페린 결핍이 완전 분화된 골수유래 대식세포의 전염증성 및 항염증성 사이토카인의 발현을 촉진함을 밝혔다(8). 그러나, RC를 먹인 마우스 BAT의 대식세포에서 바이페린은 검출되지 않았다. HFD를 먹인 마우스의 BAT에서 소수의 바이페린-발현 대식세포가 관찰되었으나, HFD를 먹인 후 BAT로 침투하는 대식세포의 수는 증가하였다(도 11b). RC를 먹인 마우스의 BAT를 제외하고, RC 또는 HFD를 먹인 WT 및 바이페린 KO 마우스 간에 지방 조직에서의 사이토카인 유전자의 발현 수준은 거의 차이하지 않았다(도 11c 및 11d).

[0135] 바이페린 결핍은 열생성을 촉진하고 저온 내성을 부여한다.

[0136] 지방 조직의 열생성 조절에서 바이페린이 필수적임을 확인하기 위하여, RC를 먹인 WT 및 바이페린 KO 마우스를 7일간 4℃에서 유지하고 상이한 시간 간격으로 심부 체온을 측정하였다. 7일간의 저온 노출 동안 바이페린 KO 마우스의 체온이 WT 마우스에 비하여 높았으며(도 3a), 이를 통해 바이페린 결핍이 저온 내성을 증진시킴을 알 수 있었다. 저온에 노출된 바이페린 KO 마우스의 지방조직 질량은 감소하였는데(도 3b), 이를 통해 저온 노출 기간 동안 바이페린 KO 마우스에서 열생성이 WT 마우스에서보다 활발함을 알 수 있었다. 저온에 노출된 바이페린 KO 마우스의 지방조직에서 열생성 및 지방산 β -산화 관련 유전자 발현이 크게 증가되어 있었다(도 3c). 저온 노출 후 WT 마우스의 BAT에서 바이페린 단백질 발현이 증가하였으나(도 3d), BAT과 지방세포에서의 UCP1 단백질 발현은 바이페린 KO 마우스에서 WT 마우스보다 훨씬 높았다(도 3d 및 3e). 이들 데이터는 바이페린 발현 증가가 저온 환경에서의 열생성을 억제하고 저온 내성을 저해함을 말해준다. 따라서, 바이페린이 지방조직에서의 저온-유도 열생성의 조절에 필수적임을 알 수 있다.

[0138] 바이페린 결핍은 아드레날린 신호경로를 통해 저온-유도 열생성을 촉진한다.

[0139] 다음으로, 바이페린 KO 마우스 지방조직에서의 저온-유도 열생성 표현형이 아드레날린 신호경로에 의해 매개되는지 여부를 조사하기 위하여, 마우스를 ADRB3 아고니스트인 CL-316243로 3일간 자극하였다. 간접 열량측정 결과 CL-처리 바이페린 KO 마우스에서 열 생성물, 산소 소모율 및 CO₂ 생성물이 유의하게 증가함을 확인하였다(도 4b 및 도 12). 그러나, CL-처리 WT 및 바이페린 KO 마우스 간 음식 섭취량에는 차이가 없었다(도 12). 이러한 결과는 바이페린이 음식 섭취와 무관하게 지방조직에서의 열생성을 조절함을 말해준다. 글루코스 내성이 개선되었으며, CL-처리 바이페린 KO 마우스에서 지방 조직의 질량이 감소하여(도 4c), CL-처리 바이페린 KO 마우스에서의 열생성이 매우 활발함을 알 수 있었다. CL-처리 바이페린 KO 마우스의 지방조직에서 열생성 및 지방산 β -산화 관련 유전자의 발현 수준도 크게 증가하였다(도 4d). 바이페린 단백질 발현이 CL-처리 바이페린 WT 마우스의 iWAT에서 증가하였다(도 4e). 저온에 노출된 마우스와 마찬가지로, 지방 조직의 UCP1 단백질의 발현 증가는 CL-처리 바이페린 KO 마우스에서 CL-처리 바이페린 WT 마우스에 비해 더 두드러졌다(도 4e 및 4f). 이러한 결과를 통해 바이페린 KO 마우스의 저온환경으로 유도된 표현형이 아드레날린 신호 경로에 의해 유도됨을 알 수 있었다.

[0141] HFD-유도된 바이페린 발현은 저온-유도 열생성 표현형을 강화한다.

[0142] 바이페린 발현이 HFD 섭식 또는 저온 노출 후 WT 마우스의 지방 조직을 증가시켰기 때문에, HFD를 먹인 WT 및 바이페린 KO 마우스의 저온 노출 또는 CL 처리 후의 열발생 표현형을 관찰하였다. 마우스에 HFD를 먹이고 7일 동안 4℃ 환경에 둔 뒤 상이한 시간간격으로 심부 체온을 측정하였다. 저온 노출 후 RC를 먹인 마우스에서의 결과와 유사하게, 7일간의 저온 노출 기간 동안 HFD를 먹인 바이페린 KO 마우스의 체온이 WT 마우스에 비해 더 높았다(도 13a). HFD를 먹인 WT 마우스의 BAT에서 저온 노출 후 바이페린 발현은 크게 증가하였다(도 13b 및 도 14). 저온 노출 시 BAT과 지방세포에서의 UCP1 발현 증가는 HFD를 먹인 WT 마우스에서보다 HFD를 먹인 바이페린 KO 마우스에서 더 두드러졌다(도 13b 및 13c). 이는 HFD 및 저온으로 유도된 바이페린 발현으로 이의 열생성 억제활성이 더 증진되고 WT 및 바이페린 KO 마우스의 열발생 표현형을 더 강화시킴을 보여준다. 본 발명자들은 또한 HFD를 먹인 바이페린 KO 마우스의 지방조직에서의 저온-유도 열생성 표현형이 아드레날린 신호 경로로 매개되는지 여부를 조사하였다. HFD를 먹인 마우스를 ADRB3 아고니스트인 CL-316243로 3일간 자극하였다. HFD-유도 글루코스 내성이 개선되어, HFD를 먹인 CL-처리 바이페린 KO 마우스에서의 열생성이 매우 활발함을 알 수 있었다(도 13d). 바이페린 단백질 발현은 HFD를 먹인 CL-처리 WT 마우스의 iWAT 및 BAT에서 증가하였다(도 13e 및 13f). 지방 조직에서 UCP1 발현의 증가는 HFD를 먹인 CL-처리 바이페린 KO 마우스에서 WT 마우스에

비해 더 두드러졌다(도 13e-13g). 이러한 결과는 HFD를 먹인 바이페린 KO 마우스의 저온-유도된 표현형이 아드레날린 신호 경로를 통해 매개된다는 사실을 보여준다. 이를 종합하면, 바이페린은 지방 조직의 열생성을 조절하는 데 필수적이며, 그 기능은 HFD 섭식 및/또는 저온 조건에서 보다 강화됨을 알 수 있다.

[0144] 바이페린은 지방세포-자율적으로 지방산 β -산화 매개된 열생성을 조절한다

[0145] 지방조직에서 바이페린의 세포-자율적인 기능을 시험하기 위해, BAT 또는 eWAT로부터 SVF를 분리하고 성숙한 갈색 또는 백색 지방세포로 분화시켰다(도 5, 도 15 및 도 16). 바이페린 결핍은 성숙한 갈색 지방세포(도 5a 및 도 15a)와 백색 지방세포(도 16a)에서 아디포넥틴, *Fabp4* 및 *C/ebp a*와 같은 지방생성-관련 유전자의 발현을 증진시킨다. 이를 통해 지방산 β -산화의 증가가 지방세포에서의 지방생성과 열생성을 모두 촉진함을 알 수 있다.

[0146] 지방조직의 면역세포에서 분비된 사이토카인이 지방세포의 열발생 표현형에 영향을 미칠 가능성을 차단하기 위해, WT 및 바이페린 KO 마우스의 BAT에서 분리한 SVF와 SVF로부터 분화된 갈색 지방세포의 사이토카인 발현량을 측정하였다(도 15b). SVF는 지방전구세포 뿐 아니라 면역세포도 포함하므로, 사이토카인은 배양액 내 면역세포로부터 유래할 수도 있다. WT 및 바이페린 KO 마우스의 SVF 또는 지방세포간 사이토카인 발현량에 거의 차이가 없었으며, 이를 통해 바이페린이 지방세포-자율적으로 열생성을 조절함을 알 수 있다. CL의 처리에 따른 열생성-관련 유전자 발현의 증가는 바이페린 KO 갈색 지방세포에서 크게 두드러졌는데, 이는 바이페린 발현이 CL 처리에 따라 WT 갈색 지방세포에서 증가했기 때문이다(도 5b). 이는 바이페린이 BAT에서 열발생 활성을 억제함을 보여준다.

[0147] 마지막으로, 바이페린이 지방조직의 열생성을 조절하는 메커니즘을 밝히기 위해, 지방산 β -산화의 억제제인 에토크실 또는 라노라진을 처리한 지방세포의 열생성-관련 유전자의 발현을 측정하였다(도 5c 및 도 16b). 그 결과, 바이페린 KO 지방세포의 열생성-관련 유전자의 발현은 억제제 처리 후에만 유의하게 감소하였다. 이를 통해 바이페린 결핍이 지방세포의 지방산 β -산화를 촉진함으로써 열생성을 증가시킨다는 것을 알 수 있었다.

[0148] 세포외 유입에 대한 분석을 통해 바이페린 KO 갈색 지방세포에서 산소 소모율(OCR)이 증가함을 확인하였다. 미토콘드리아 호흡 사슬 억제제의 첨가 전후에 기저 호흡, ATP 생성, 양이온 누출 및 최대 호흡을 포함하는 미토콘드리아 파라미터를 OCR로부터 계산하였다. 열생성의 핵심 요소인 양이온 누출(연합해지호흡; uncoupled respiration)과 다른 파라미터들은 바이페린 KO 갈색 지방세포에서 증가하였다. 나아가, CL 처리에 따른 양이온 누출 증가는 바이페린 KO 갈색 지방세포에서 더 두드러졌다(도 5d). 반면, 양이온 누출은 바이페린 KO 갈색 지방세포에서는 에토크실 처리 후에만 감소하였다(도 5d). 이러한 데이터를 통해 바이페린 발현이 지방산 β -산화를 억제하여 지방생성 및 지방세포의 열생성을 저해함을 알 수 있다.

[0150] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[0152] 참고문헌

[0153] 1. L. Q. Qiu, P. Cresswell, K. C. Chin, *Blood* 113, 3520-3529 (2009).

[0154] 2. B. Cannon, J. Nedergaard, *J. Exp. Biol.* 214, 242-253 (2011).

[0155] 3. E. Gospodarska, P. Nowialis, L. P. Kozak, *J. Biol. Chem.* 290, 8243- 8255 (2015).

[0156] 4. Y. H. Tseng et al., *Nature* 454, 1000-1004 (2008)

[0157] 5. P. Rajbhandari et al., *Cell* 172, 218-233.e17 (2018).

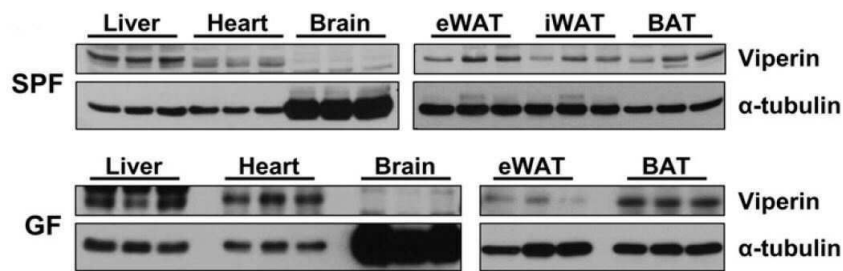
[0158] 6. Y. Qiu et al., *Cell* 157, 1292-1308 (2014).

[0159] 7. R. R. Rao et al., *Cell* 157, 1279-1291 (2014).

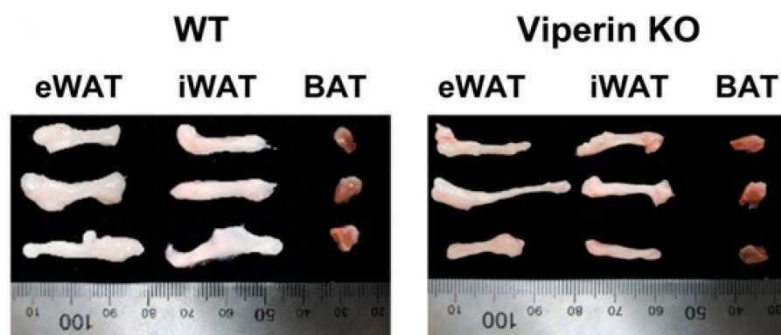
[0160] 8. J. Eom et al., *Immune Netw.* 18, e32 (2018).

도면

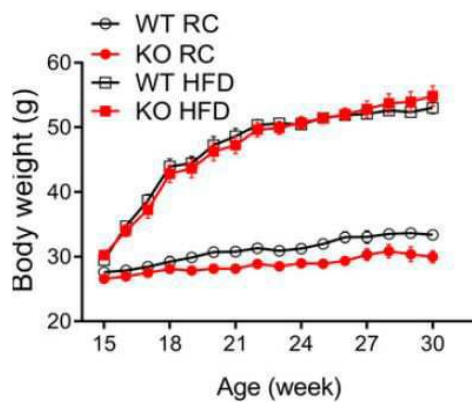
도면1a



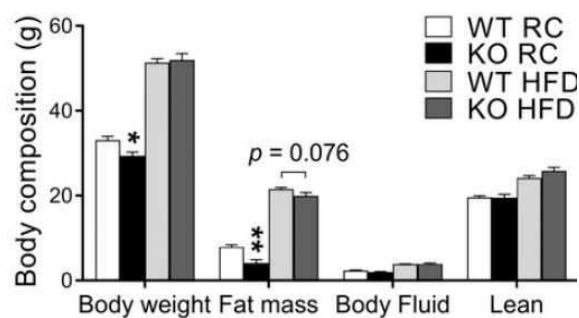
도면1b



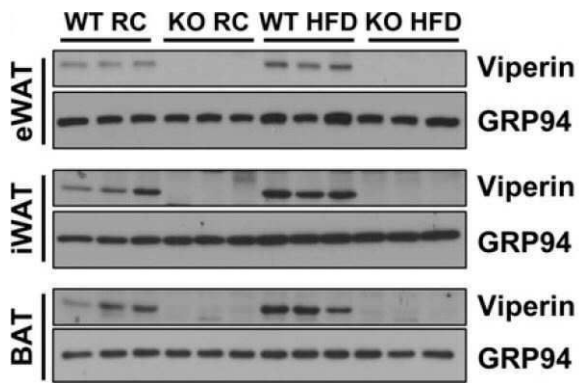
도면1c



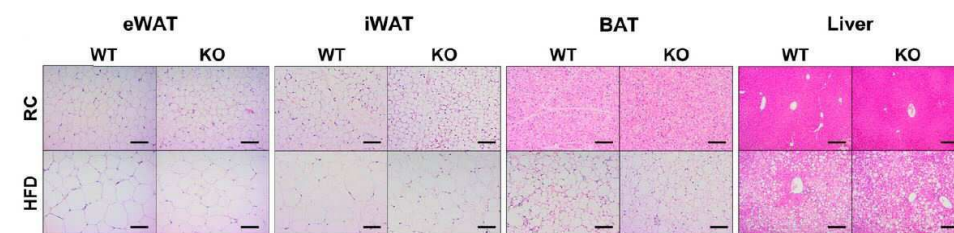
도면1d



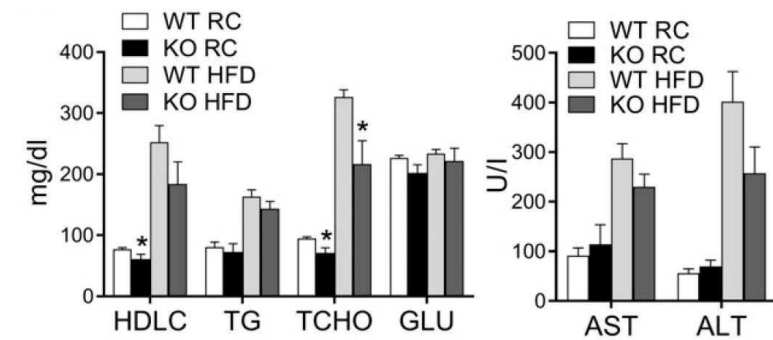
도면1e



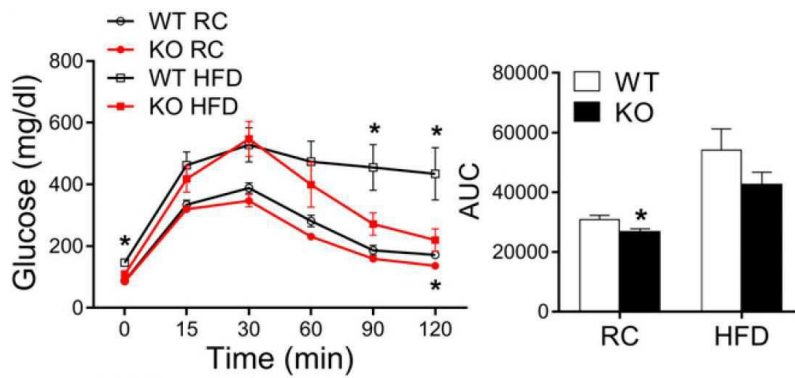
도면1f



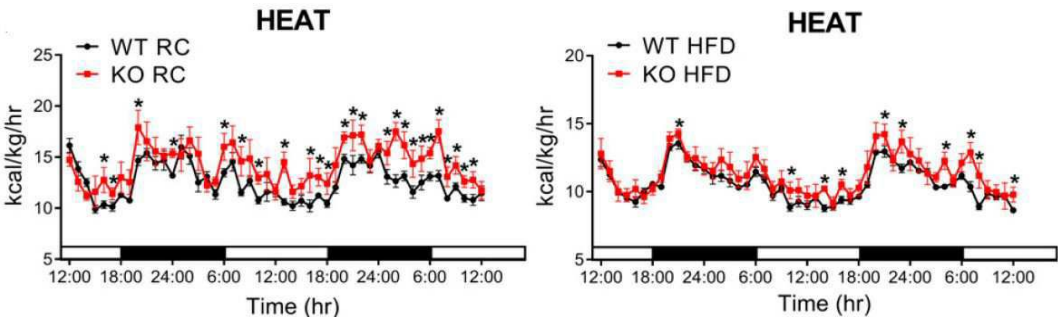
도면1g



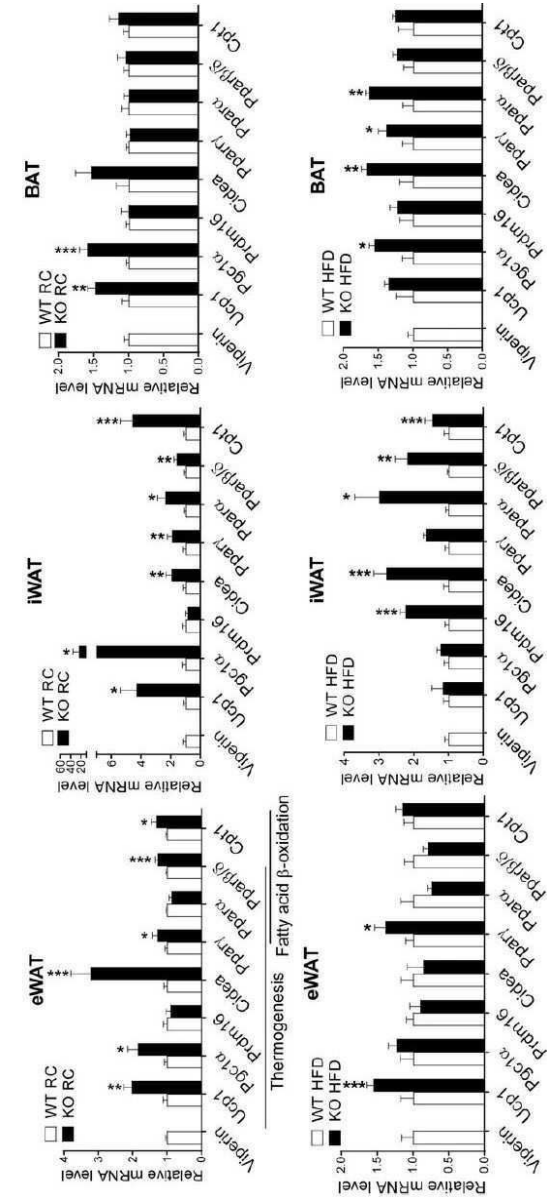
도면1h



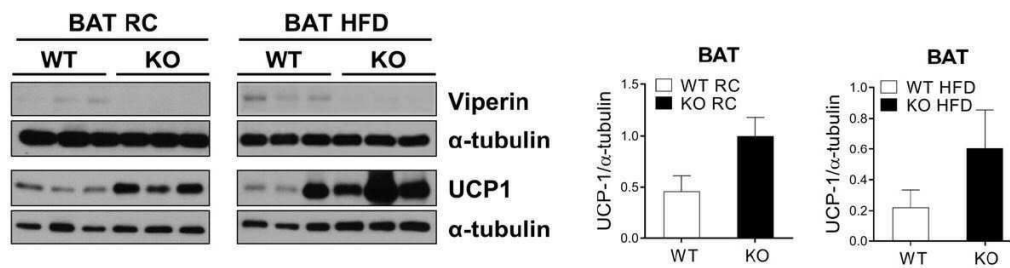
도면1i



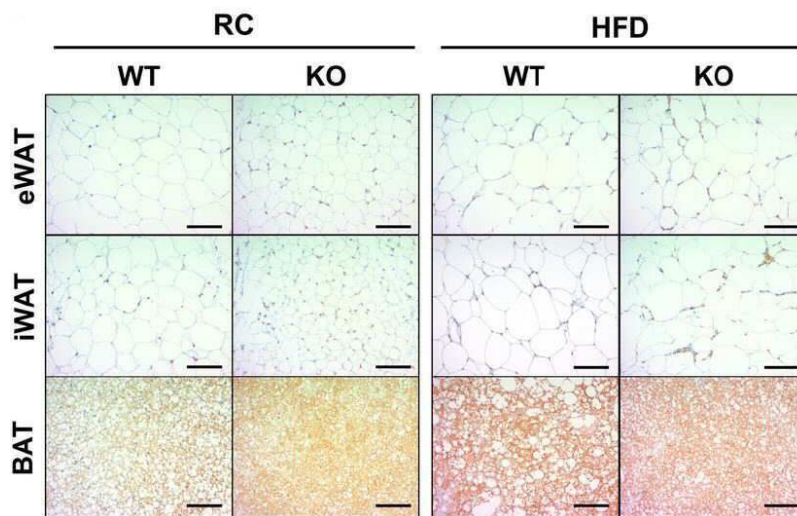
도면2a



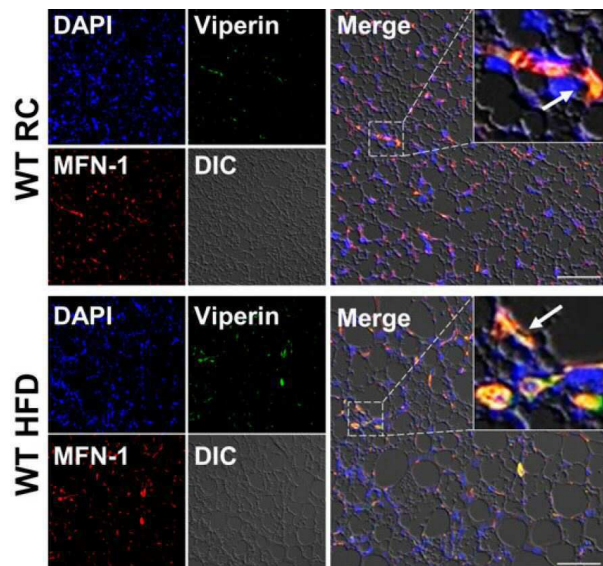
도면2b



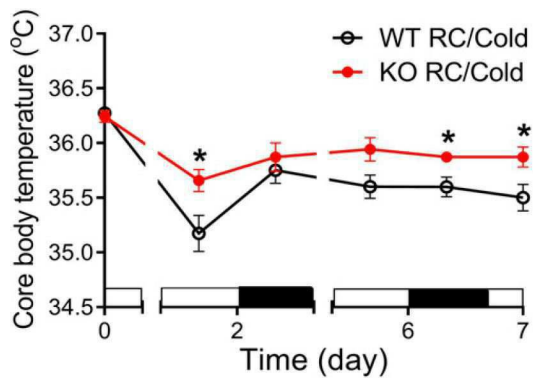
도면2c



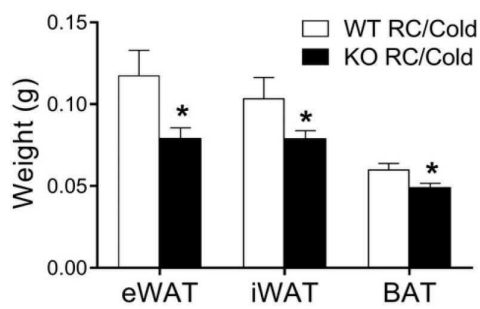
도면2d



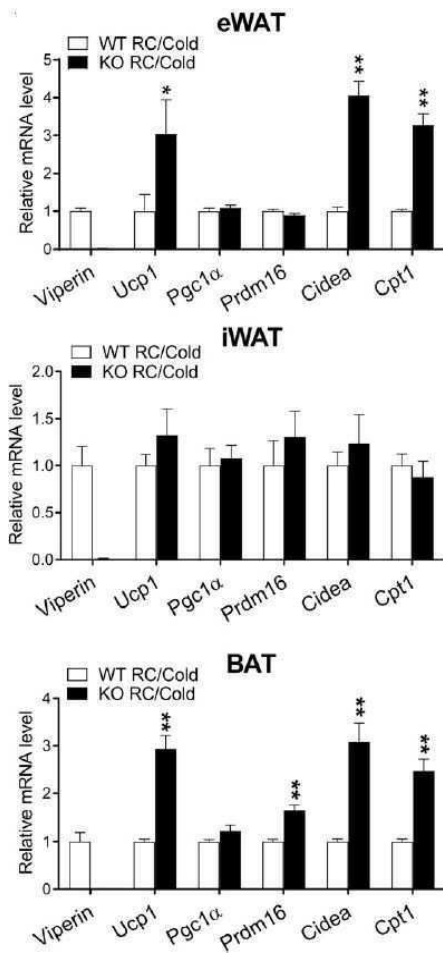
도면3a



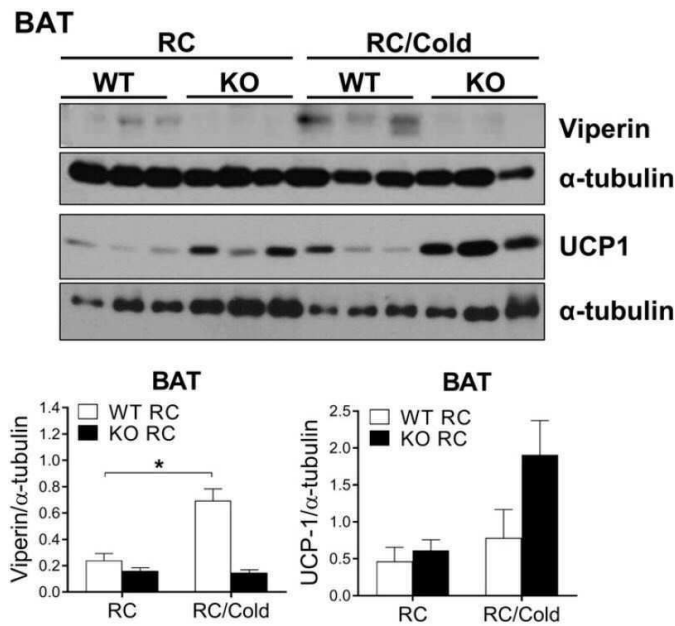
도면3b



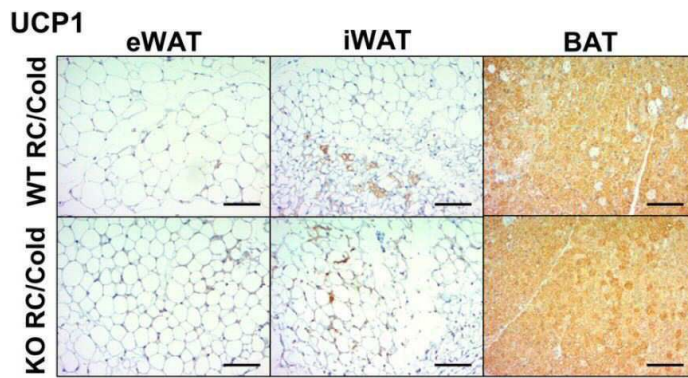
도면3c



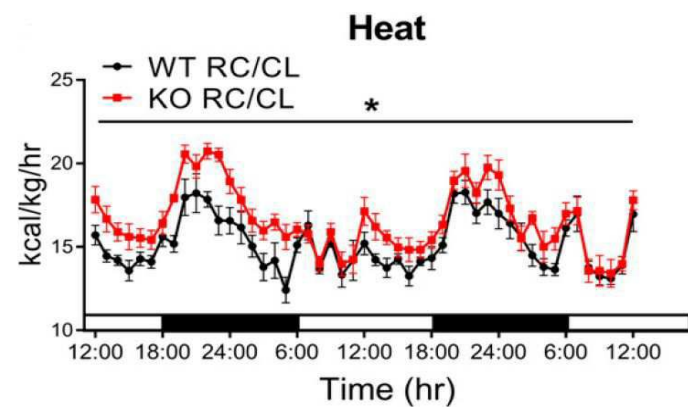
도면3d



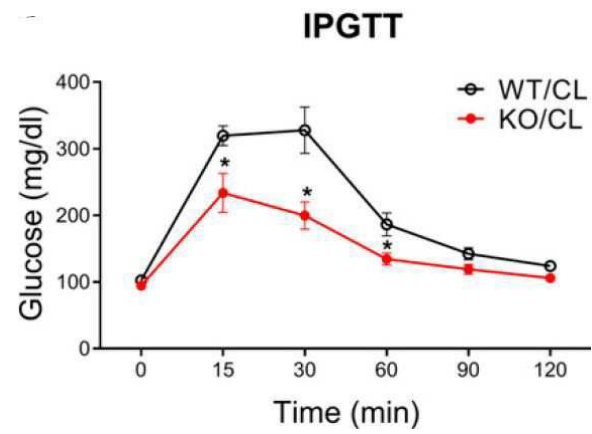
도면3e



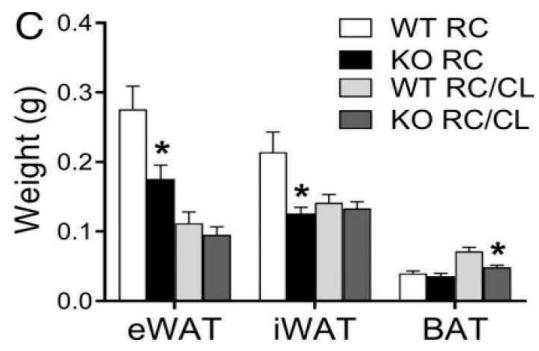
도면4a



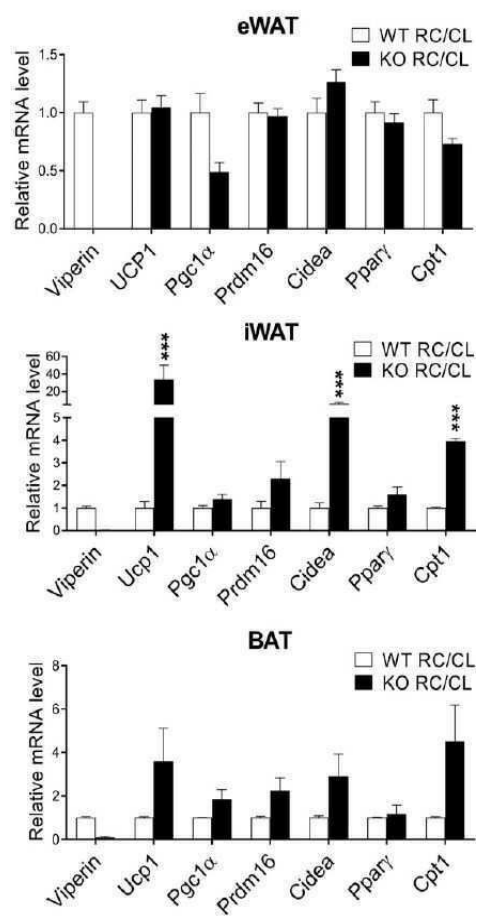
도면4b



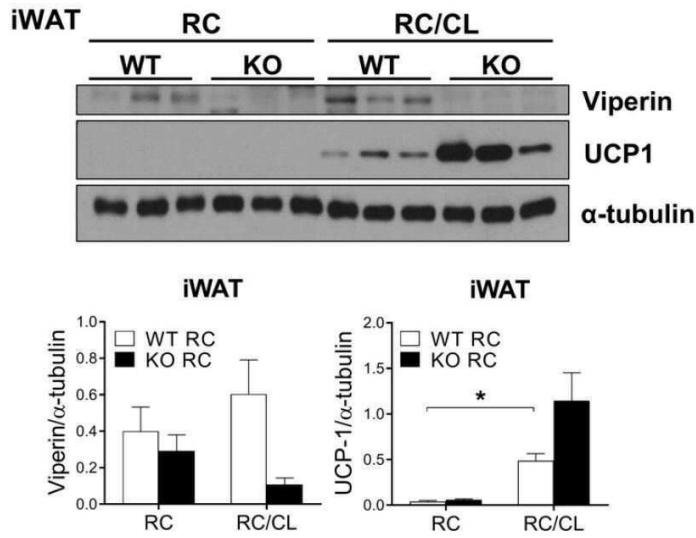
도면4c



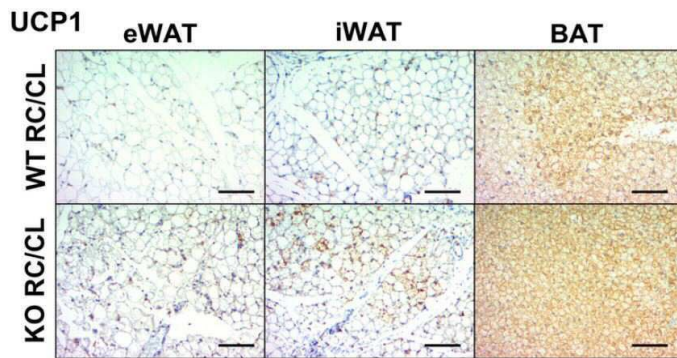
도면4d



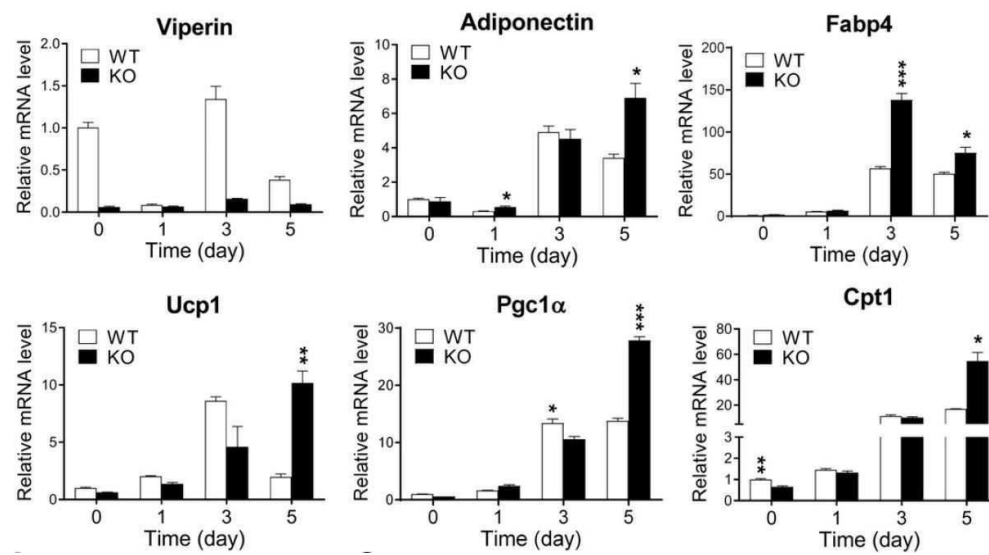
도면4e



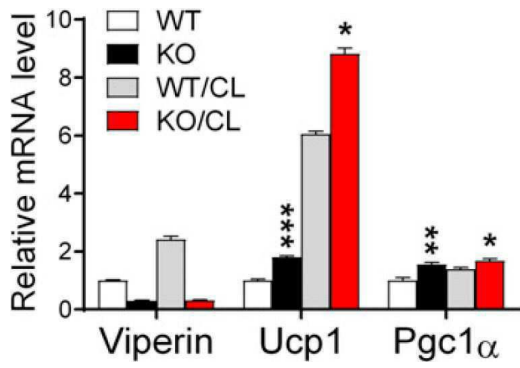
도면4f



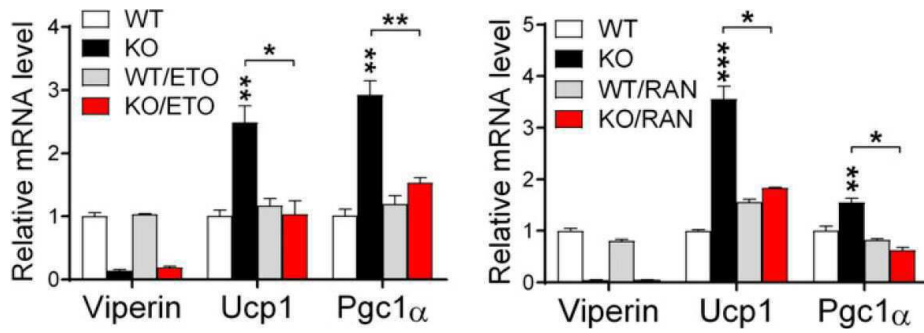
도면5a



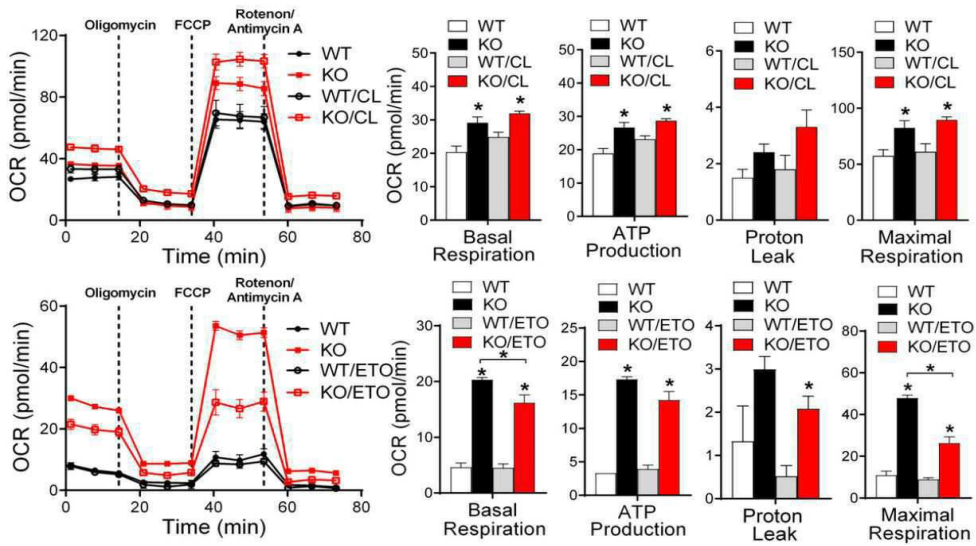
도면5b



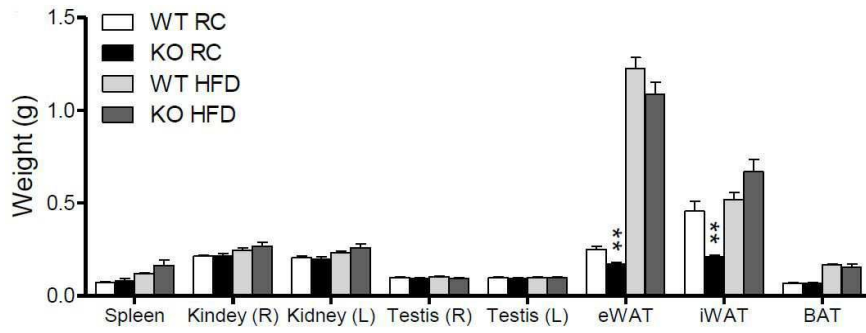
도면5c



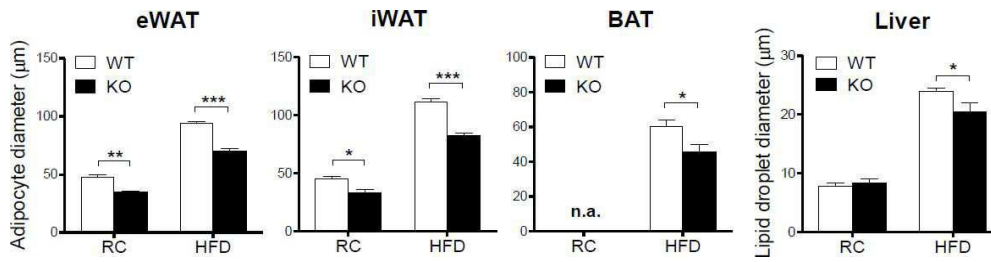
도면5d



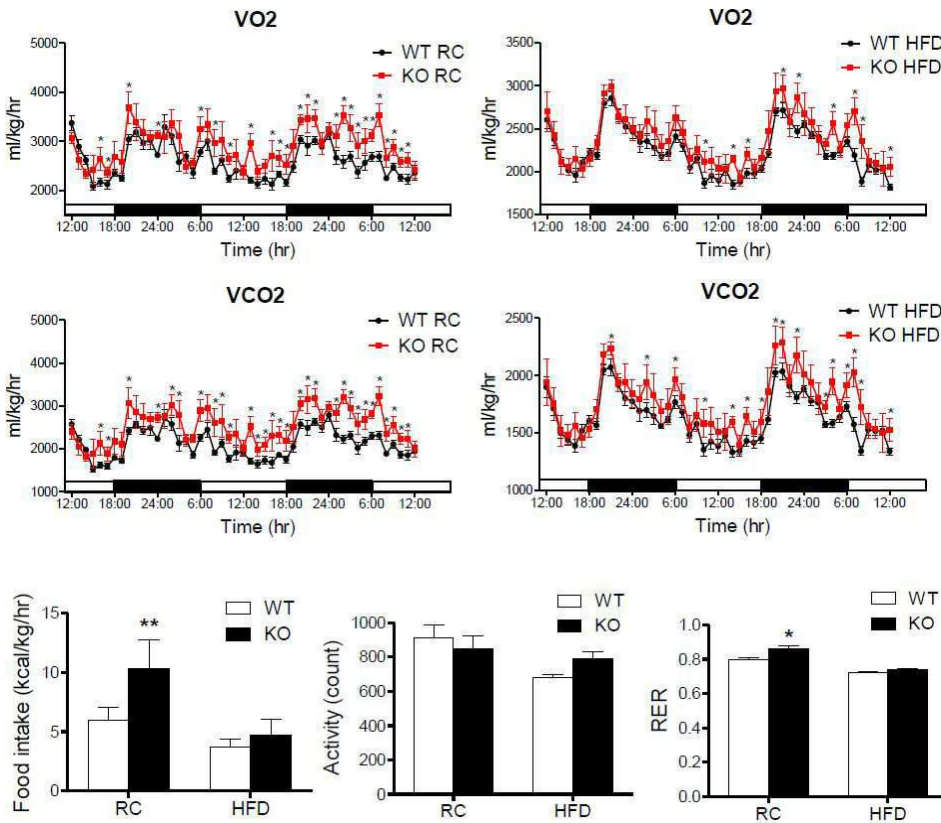
도면6a



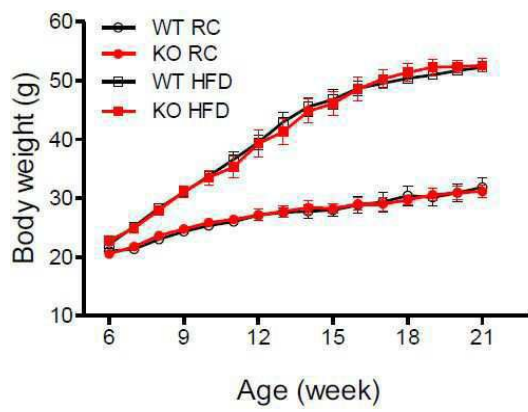
도면6b



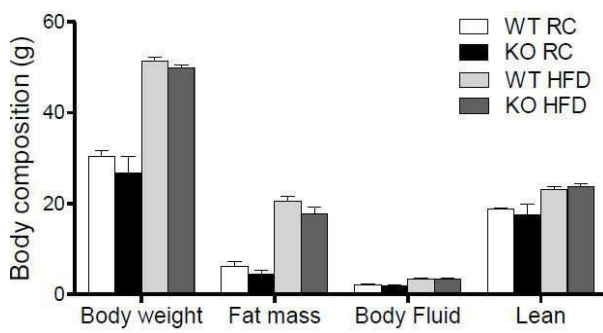
도면6c



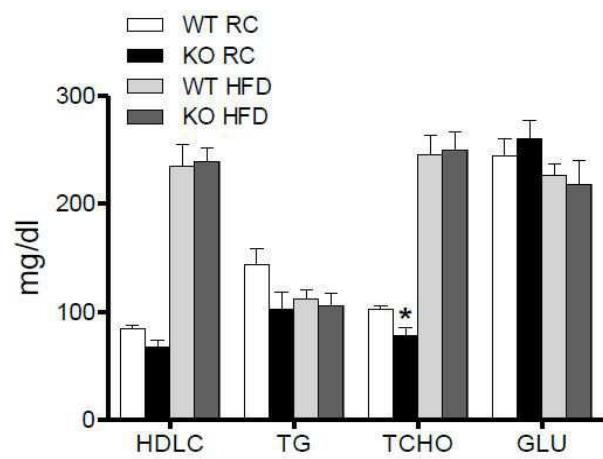
도면7a



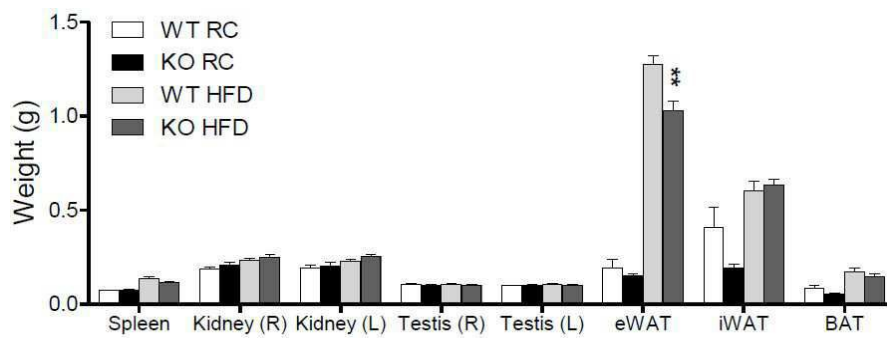
도면7b



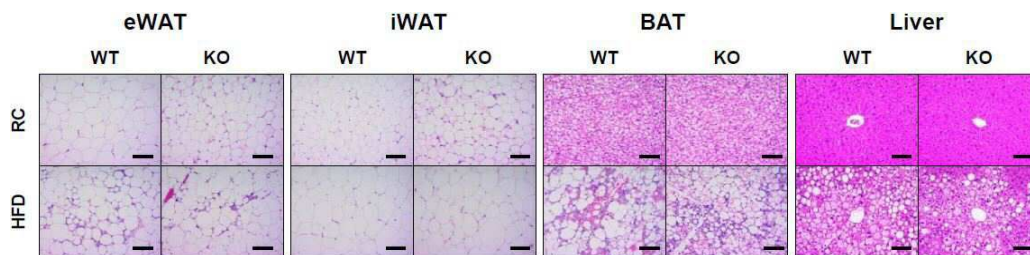
도면7c



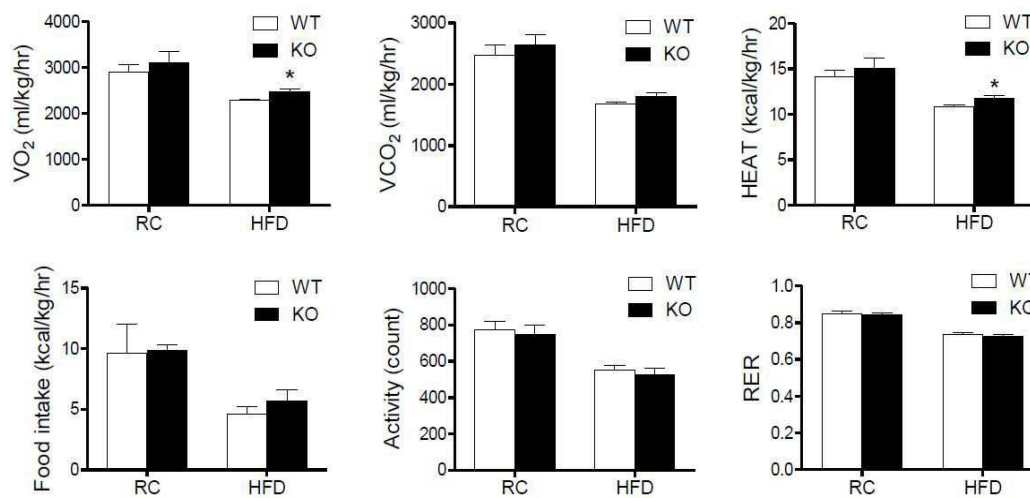
도면7d



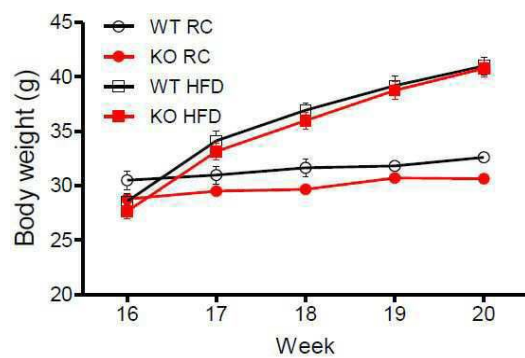
도면7e



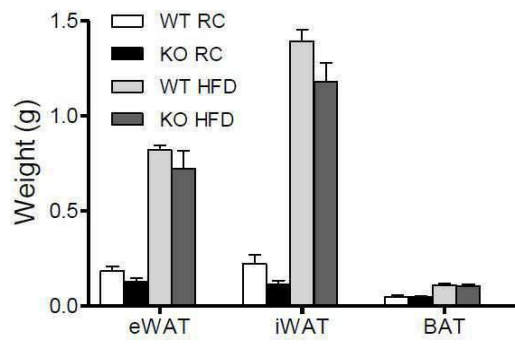
도면7f



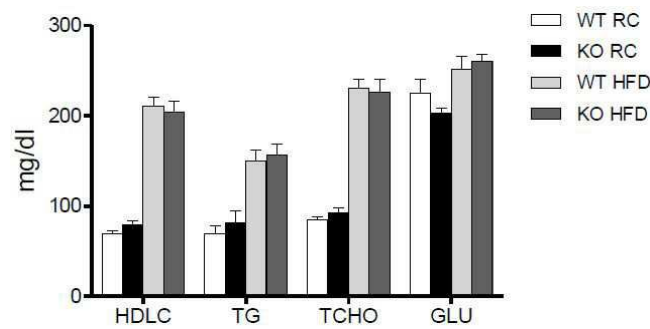
도면8a



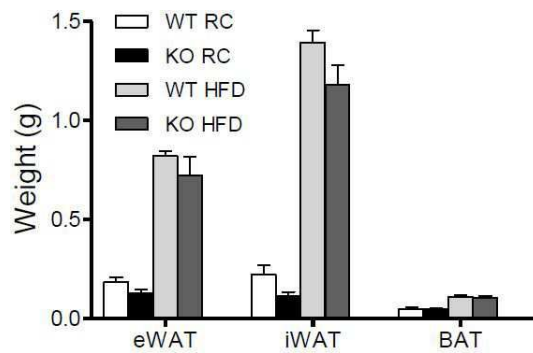
도면8b



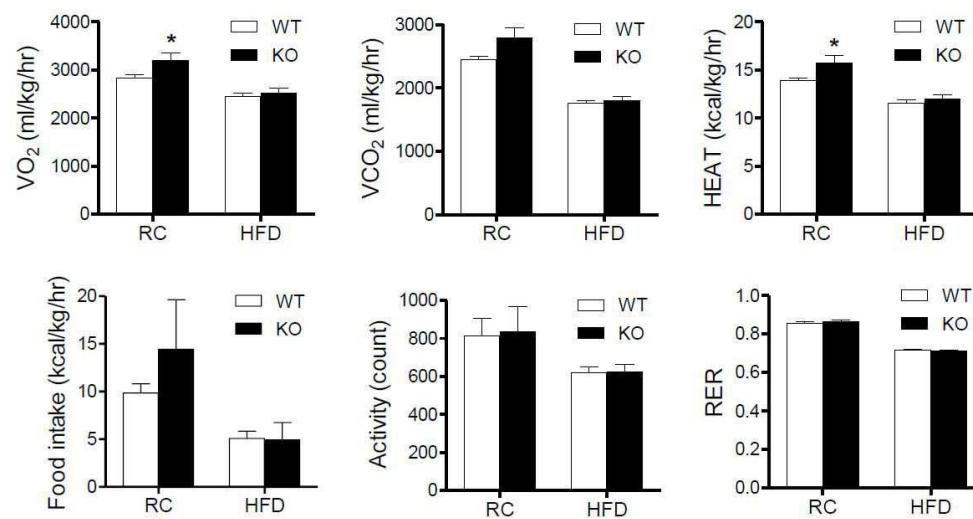
도면8c



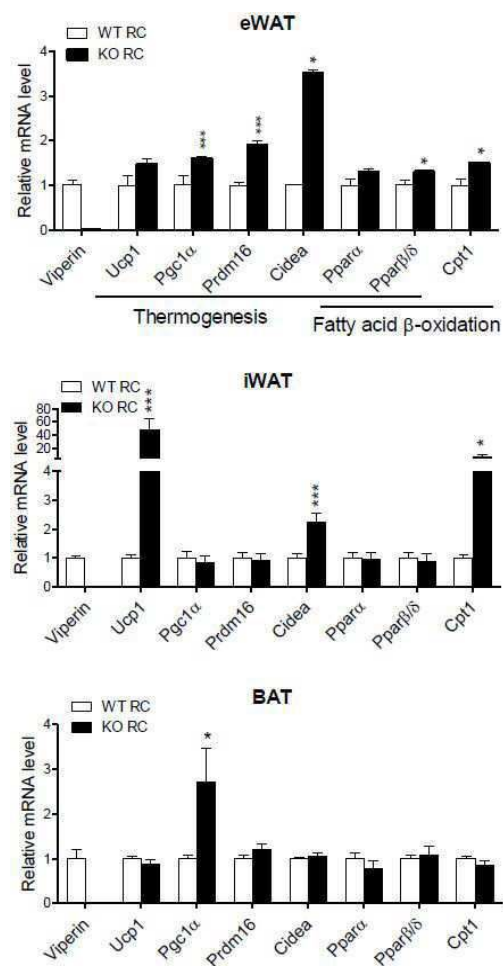
도면8d



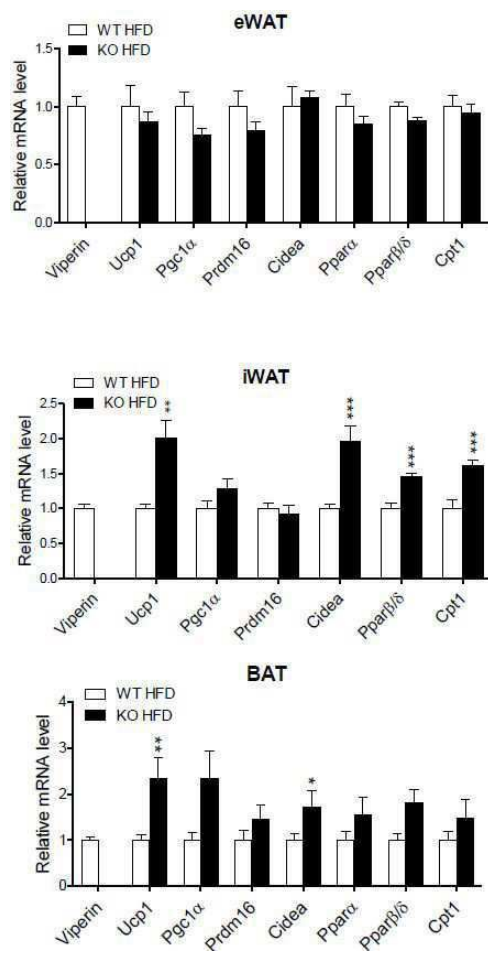
도면8e



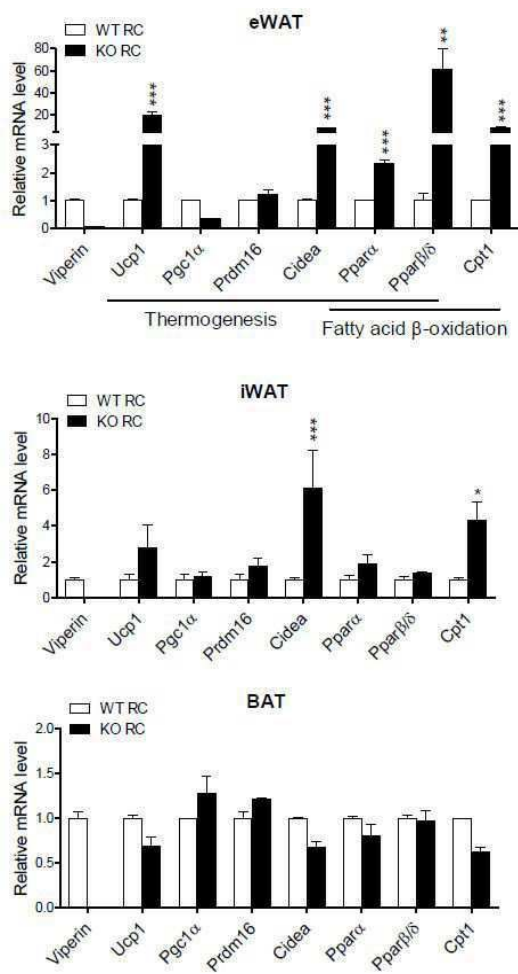
도면9a



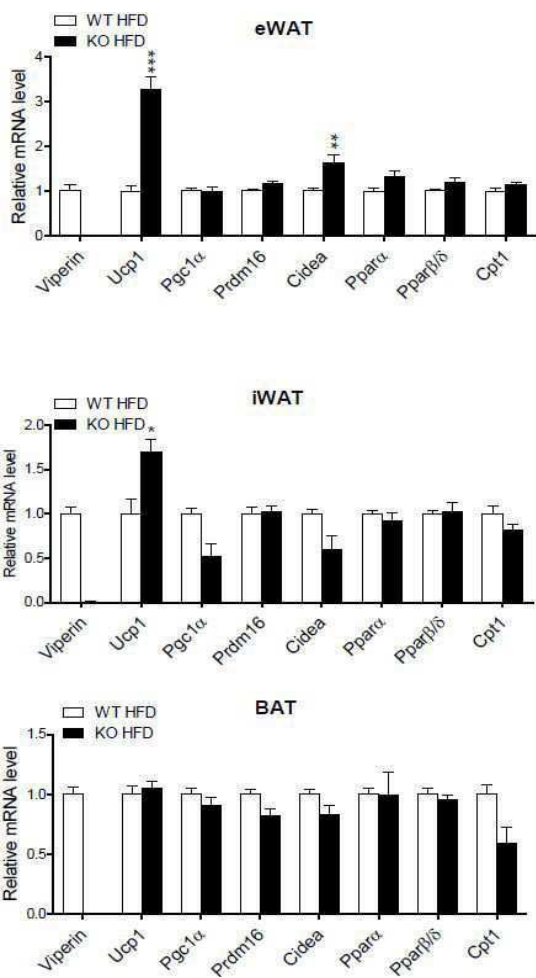
도면9b



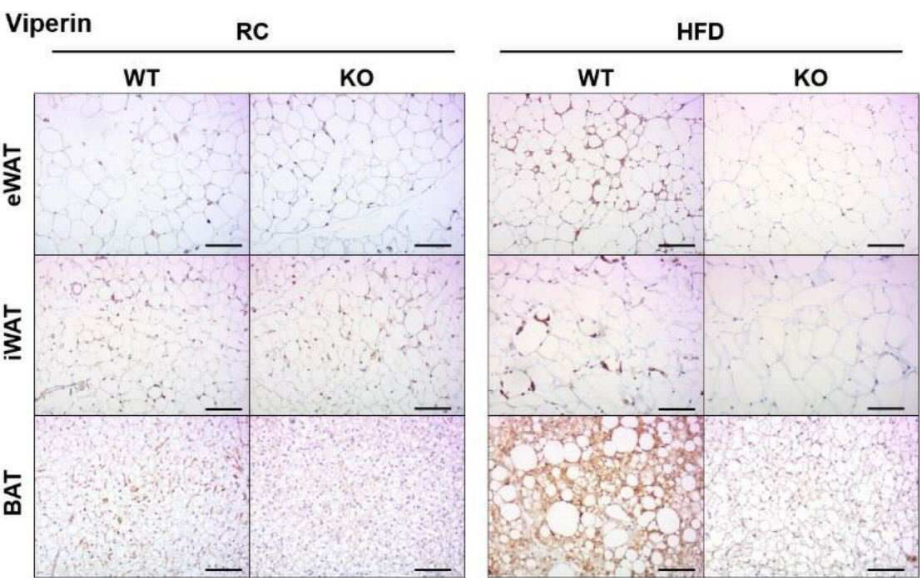
도면10a



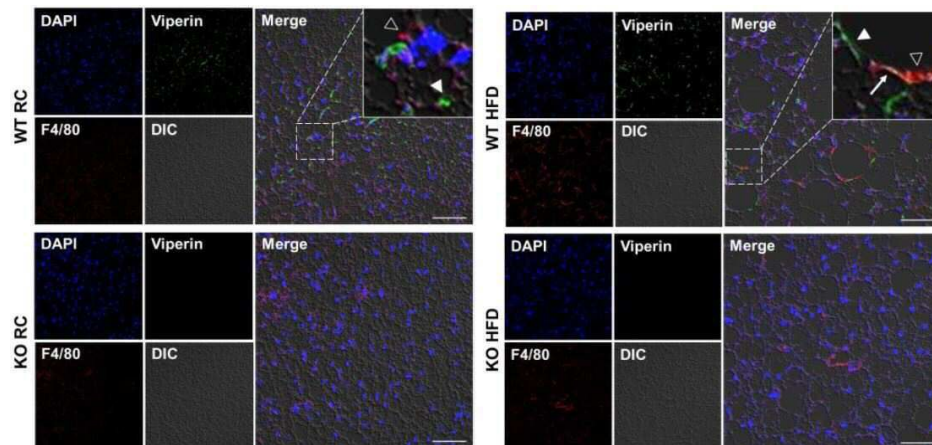
도면10b



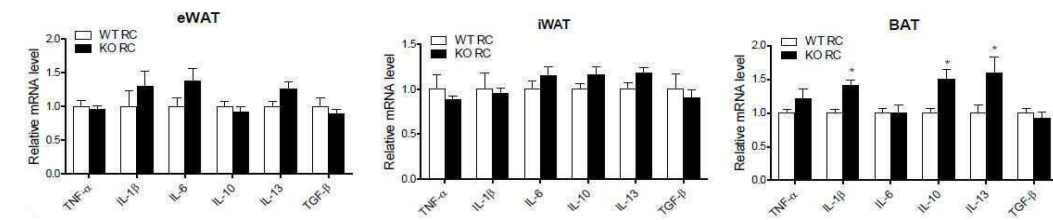
도면11a



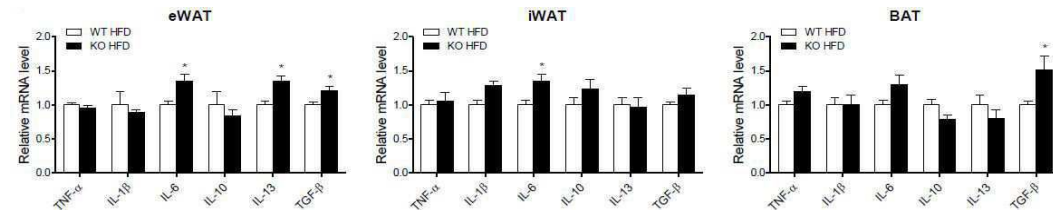
도면11b



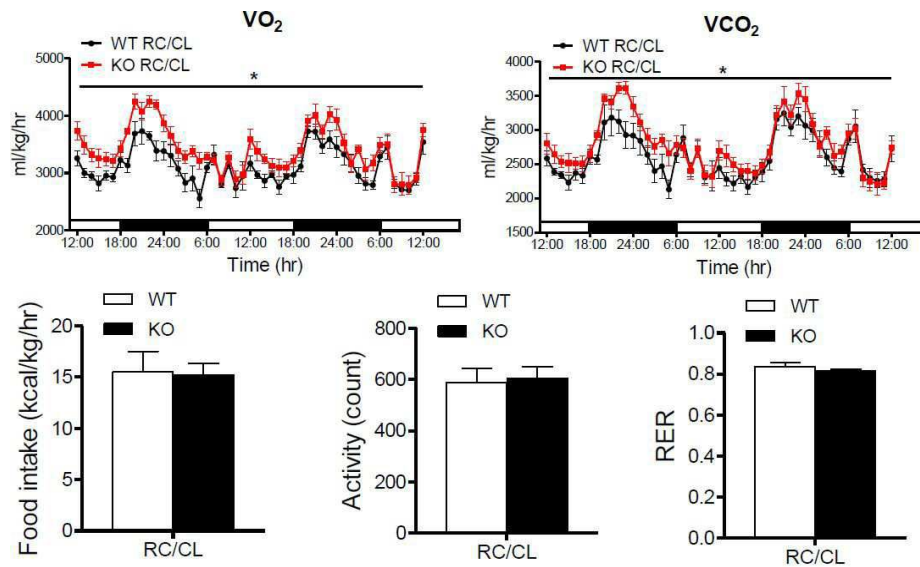
도면11c



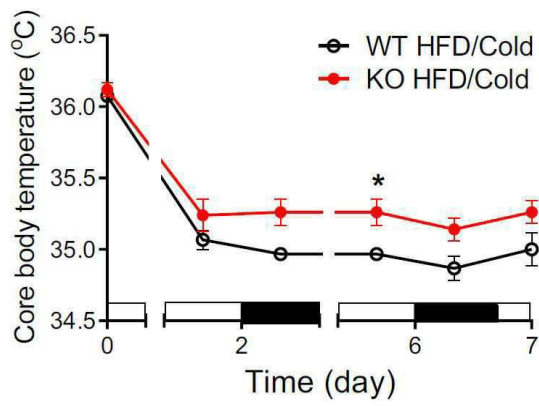
도면11d



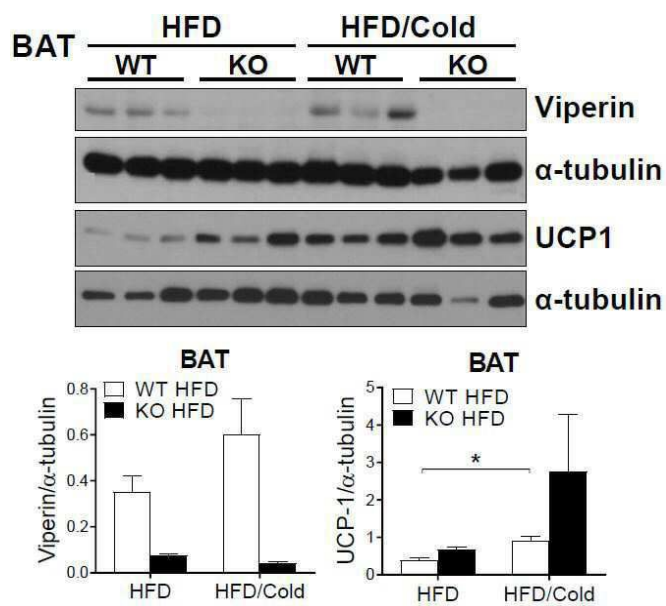
도면12



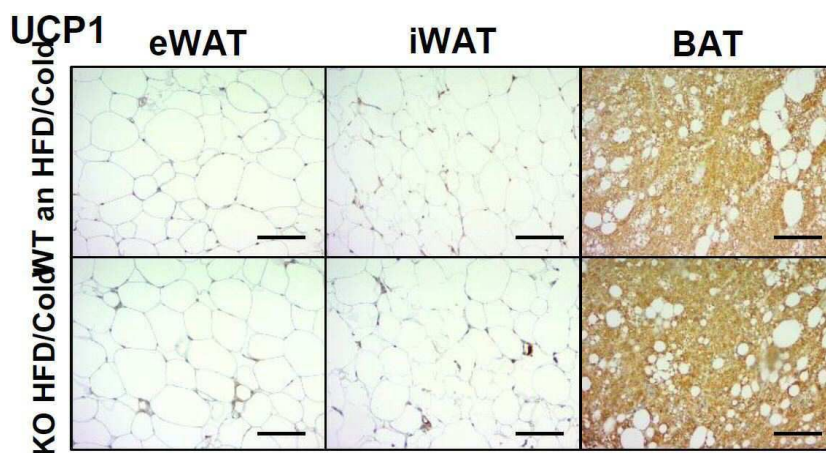
도면13a



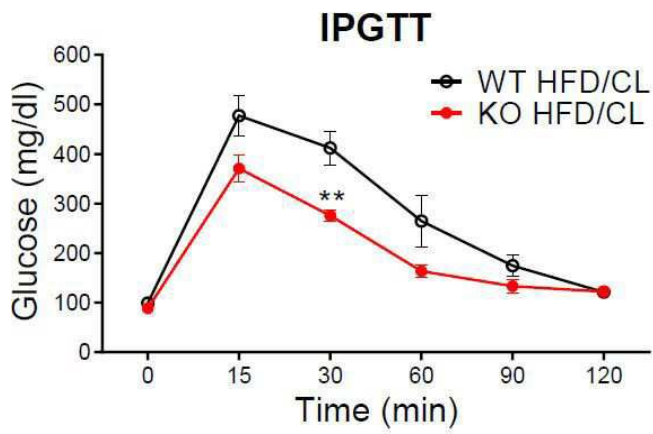
도면13b



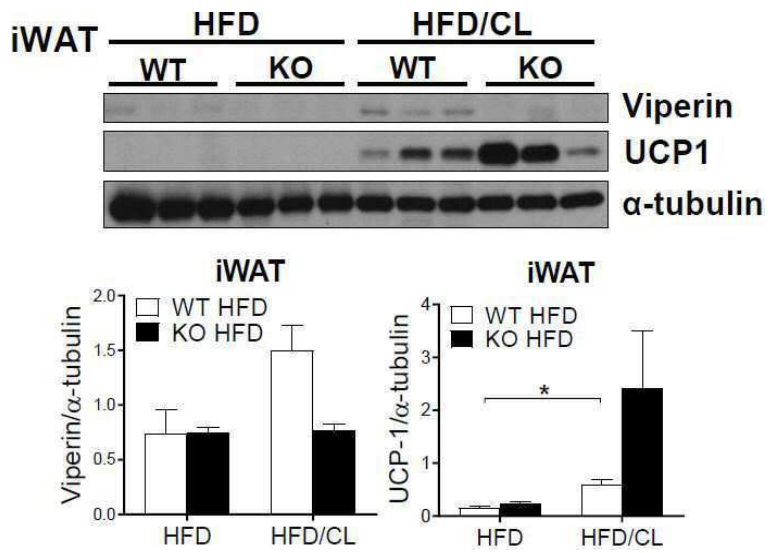
도면13c



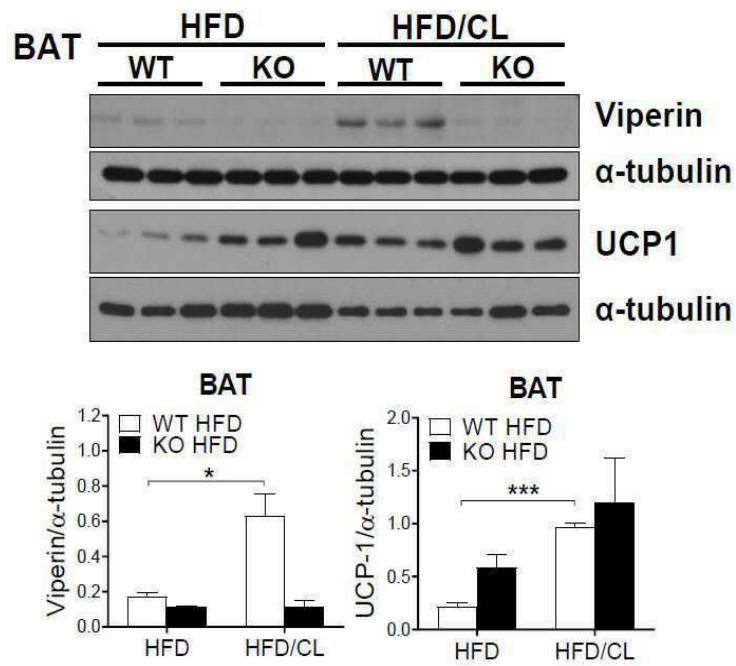
도면13d



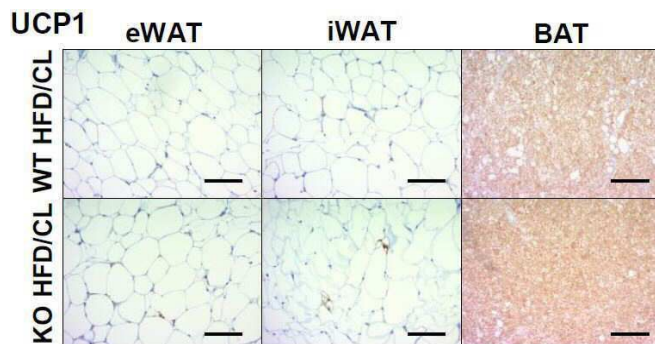
도면13e



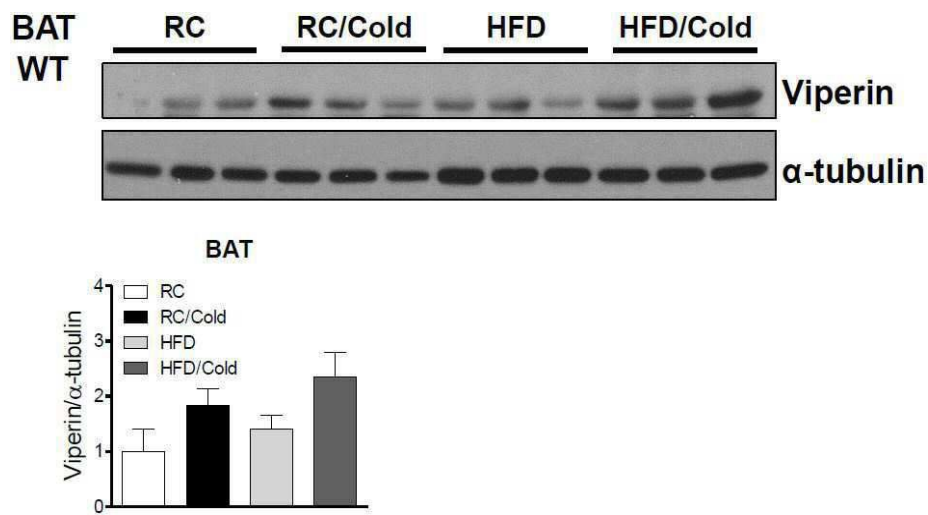
도면13f



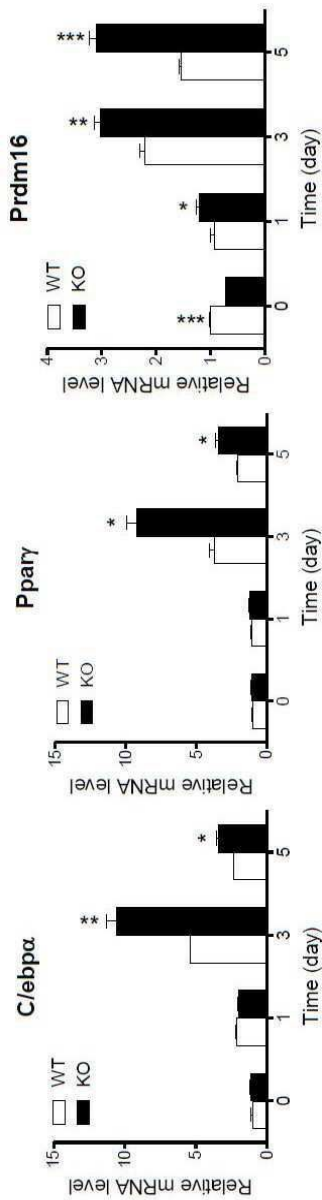
도면13g



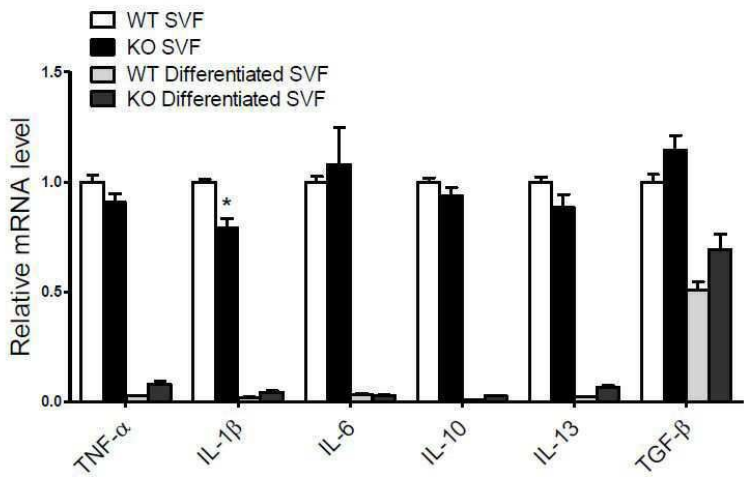
도면14



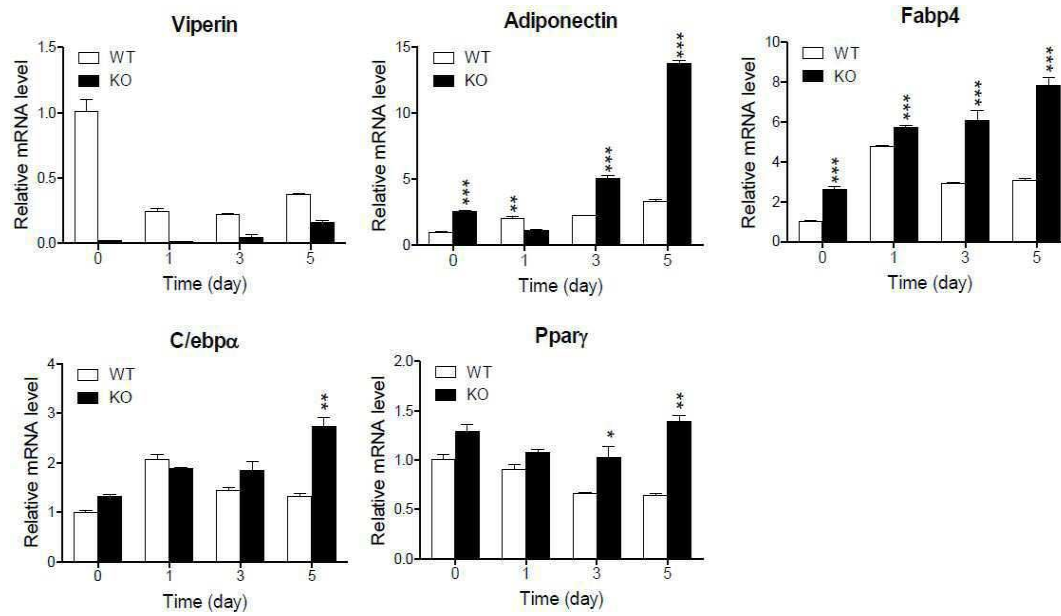
도면15a



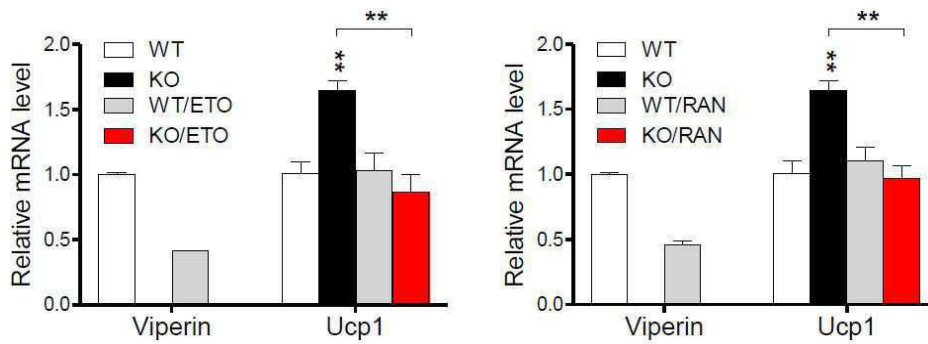
도면15b



도면16a



도면16b



서열목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation Yonsei University
SNU R&DB Foundation
- <120> A Composition for Preventing or Treating Metabolic Disorders
Comprising Viperin Inhibitors as Active Ingredients
- <130> HPC-8909
- <160> 38
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 19
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Viperin F primer
- <400> 1

gtgaatactt gggcaagct	19
<210> 2	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Viperin R primer	
<400> 2	
caaatactcc ccatagtcc	19
<210> 3	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Ucp1 F primer	
<400> 3	
ggcctctacg actcagtcca	20
<210> 4	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Ucp1 R primer	
<400> 4	
taagccggct gagatcttgt	20
<210> 5	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Pgc1 alpha F primer	
<400> 5	
ccctgccatt gttaagacc	19
<210> 6	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Pgc1 alpha R primer

<400> 6

tgctgctgtt cctgttttc

19

<210> 7

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Prdm16 F primer

<400> 7

cagcacggtg aagccattc

19

<210> 8

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Prdm16 R primer

<400> 8

gcgtgcatcc gcttgtg

17

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cidea F primer

<400> 9

tgctcttctg tatgcccag t

21

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cidea R primer

<400> 10

gccgtgttaa ggaatctgct g

21

<210> 11

<211> 21

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Ppar gamma F primer
 <400> 11
 gtgccagttt cgatccgtag a 21
 <210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Ppar gamma R primer
 <400> 12
 ggccagcatc gtgtagatga 20

 <210> 13
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Ppar alpha F primer
 <400> 13
 tcggcgaact attcggctg 19
 <210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Ppar alpha R primer
 <400> 14
 gcacttgtga aaacggcagt 20
 <210> 15
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Ppar beta/delta F primer

 <400> 15
 ttgagcccaa gttcagttt g 21

<210> 16
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Ppar beta/delta R primer
 <400> 16
 cgggtctccac acagaatgat g 21
 <210> 17
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Cpt1b F primer
 <400> 17
 tctatgaggg ctcgcg 16
 <210> 18

 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Cpt1b R primer
 <400> 18
 cggtcagggtt gtagca 16
 <210> 19
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IL-6 F primer
 <400> 19
 cctctgtgtct tctggagtac c 21
 <210> 20
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IL-6 R primer
 <400> 20

actccttctg tgactccagc	20
<210> 21	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> IL-10 F primer	
<400> 21	
ataactgcac ccacttccca	20
<210> 22	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> IL-10 R primer	
<400> 22	
gggcatcact tctaccaggt	20
<210> 23	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> IL-13 F primer	
<400> 23	
gcagcatggt atggagtgtg	20
<210> 24	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> IL-13 R primer	
<400> 24	
tggcgaaca gttgctttgt	20
<210> 25	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> IL-1 beta F primer
 <400> 25
 gtggctgtgg agaagctgtg 20
 <210> 26
 <211> 21
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> IL-1 beta R primer
 <400> 26
 gaaggtccac gggaaagaca c 21
 <210> 27
 <211> 18
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> TNF-alpha F primer
 <400> 27
 atgagcacag aaagcatg 18
 <210> 28
 <211> 20
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> TNF-alpha R primer
 <400> 28
 agtagacaga agagcgtggt 20
 <210> 29
 <211> 20
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> TNF-beta F primer
 <400> 29
 cctgcaagac catcgacatg 20
 <210> 30
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TNF-beta R primer
 <400> 30
 tgttgtacaa agcgagcacc 20
 <210> 31
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> C/ebp alpha F primer
 <400> 31
 caaagccaag aagtcggtgg acaa 24
 <210> 32
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> C/ebp alpha R primer
 <400> 32
 tcattgtgac tggtaactc cagc 24
 <210> 33
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Adiponectin F primer
 <400> 33
 ccgggactct actacttctc tt 22
 <210> 34
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Adiponectin R primer
 <400> 34
 ttcttgatac tggtcgtagg t 21

<210>	35	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Fabp4 F primer	
<400>	35	
	acaccgagat ttccttcaaa ctg	23
<210>	36	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Fabp4 R primer	
<400>	36	
	ccatctaggg ttatgatget cttc	24
<210>	37	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	beta-actin F primer	
<400>	37	
	gctccggcat gtgcaa	16
<210>	38	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	beta-actin R primer	
<400>	38	
	aggatcttca tgaggtagt	19