



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년09월07일

(11) 등록번호 10-2152974

(24) 등록일자 2020년09월01일

(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 43/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 48/00 (2013.01)

A61K 31/36 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0112713

(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)

(72) 발명자

서준영

경기도 고양시 일산동구 강송로 156, 209동 603호(마두동, 강촌마을2단지아파트)

(74) 대리인

특허법인충현

전체 청구항 수 : 총 4 항

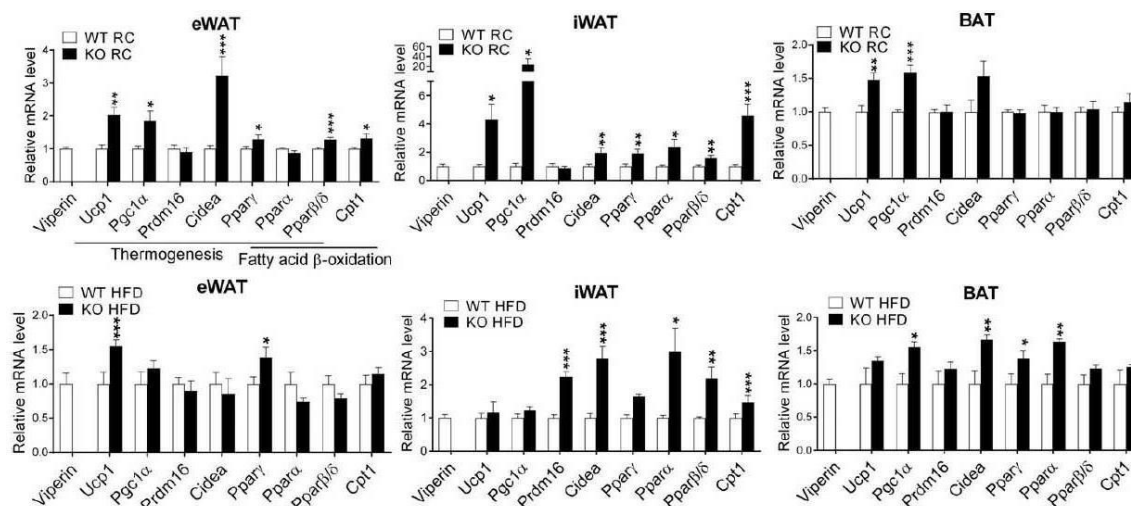
심사관 : 허명숙

(54) 발명의 명칭 바이페린 억제제를 유효성분으로 포함하는 생체 내 열생성 증진용 조성물

### (57) 요약

본 발명은 생체 내 열생성(thermogenesis) 증진용 조성물 및 저온 내성(cold-tolerance) 증진용 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 생체 내에서의 열생성을 증가시킴으로써 대사증후군을 비롯한 다양한 열생성 저하증(thermogenic hypofunction)을 치료하고 저온 노출 환경에 대한 내성을 부여할 수 있는 효율적인 열생성 증진제로 유용하게 이용될 수 있다.

### 대표도



(52) CPC특허분류

**A61K 39/395** (2013.01)

**A61K 45/06** (2013.01)

**A61P 43/00** (2018.01)

**A61K 2300/00** (2013.01)

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	1/2
과제수행기관명	연세대학교 산학협력
연구기간	2019.03.01 ~ 2019.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2019R1H1A2079735
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공분야기초연구사업
연구과제명	암세포에서 viperin 발현 기전 및 대사조절 기전 규명
기 여 율	1/2
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2019.06.01 ~ 2020.05.31

공지예외적용 : 있음

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

삭제

#### 청구항 2

삭제

#### 청구항 3

삭제

#### 청구항 4

삭제

#### 청구항 5

삭제

#### 청구항 6

삭제

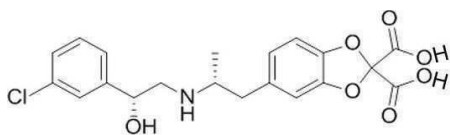
#### 청구항 7

바이페린(viperin) 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편; 또는 바이페린 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드의 발현을 억제하는 핵산 분자를 유효성분으로 포함하는 저체온증(hypothermia)의 예방 또는 치료용 조성물.

#### 청구항 8

제 7 항에 있어서, 상기 조성물은 하기 화학식 1의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물:

#### 화학식 1



#### 청구항 9

삭제

#### 청구항 10

삭제

#### 청구항 11

다음 단계를 포함하는 생체 내 열생성(thermogenesis) 증진용 조성물의 스크리닝 방법:

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

(b) 상기 시료 내 바이페린의 활성 또는 발현량을 측정하는 단계,

상기 바이페린의 활성 또는 발현량이 감소한 경우, 상기 후보물질은 생체 내 열생성(thermogenesis) 증진용 조성물로 판정한다.

## 청구항 12

제 11 항에 있어서, 상기 생물학적 시료는 간 조직, 심장 조직, 지방 조직, 이들로부터 유래한 세포 및 세포 배양액으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 바이페린 억제제를 유효성분으로 포함하는 생체 내 열생성 증진 및 저온 내성 증진용 조성물에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0003] 포유류는 추위에 노출되면 열손실에 대응하여 체내 열생성을 증가시킴으로써 일정한 체온을 유지하고자 한다. 열손실이 열생성을 초과하는 경우 저체온증(hypothermia) 상태로 진입하면서 저온 노출 기간이 계속될 경우 사망에 이를 수 있다. 응급 처치를 통해 외부로부터 열공급을 하여 장기간의 저온 노출에 대응할 수 있으나, 개체의 열생성 자체를 증가시킬 수 있다면 저체온증 및 이로 인한 사망의 위험을 크게 낮출 수 있다.

[0004] 저온 상황 이외에도, 열생성 저하증(thermogenic hypofunction)으로 인한 에너지 불균형은 소모되지 못한 에너지로부터 변형되어 축적되는 지방으로 인해 비만을 비롯한 다양한 대사 증후군의 원인이 된다. 열생성 저하증은 또한 체중 감량을 위한 식이요법 후 신체가 부족한 영양섭취에 대응하여 열생성을 감소시키는 반사성(reflexive) 작용으로 발생하기도 한다.

[0005] 테오피린(THEO)과 아미노필린(AMPY)이 심각한 저온 상황에서 인간과 다른 포유동물의 열생성을 증가시켜 저온 내성을 향상시킨다고 보고되었으나, 심계항진, 동빈맥, 기외수축, 심실성 부정맥 등의 부작용이 보고되어 만성질환 치료를 위한 장기 투여에는 적합하지 않다.

[0006] 바이페린(RSAD2, cig5 또는 vig1)은 항바이러스 활성을 가지고, 신호경로 또는 Th2 세포 발달을 매개하며, 세포 대사를 조절하는, IFN-유도 다중기능 단백질이다. 바이페린은 ER(endoplasmic reticulum)에서 골지체로의 가용성 단백질의 수송을 차단하며, 미토콘드리아의 지방산  $\beta$ -산화를 억제하여 ATP 생성을 감소시키고 세포 지방생성을 증가시키는 다양한 기능을 한다.

[0007] 지방 조직은 에너지 균형과 항상성을 조절하는 중추적 대사기관이다. 지방 조직에는 백색 지방조직(WAT)과 갈색 지방조직(BAT)의 2가지 주요 형태가 있는데, WAT는 지방을 저장하는 기능을 하며, BAT는 주로 열생성을 위해 지방을 태우는 역할을 한다. BAT는 다중 미토콘드리아 및 다방성 지질방울을 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 당뇨병과 같은 대사 질환을 개선시킨다. 한편, 지방산  $\beta$ -산화가 결핍된 마우스에서는 지방 과다가 나타나면서 저온 스트레스에 민감해져, 지방산  $\beta$ -산화가 열생성 및 지방조직 분화에 관여한다고 예상할 수 있으나, 지방산  $\beta$ -산화-매개 열생성이 어떠한 기작에 의해 조절되는지는 알려져 있지 않다.

[0009] 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

[0011] (비특허문헌 0001) 비특허문헌 1. J Interferon Cytokine Res. 2011 Jan; 31(1): 131-135.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0012] 본 발명자들은 생체 내에서의 열생성을 증가시킴으로써 대사증후군을 비롯한 다양한 열생성 저하증(thermogenic hypofunction)을 치료하고 저온 노출 환경에 대한 내성을 부여할 수 있는 효율적인 열생성 증진제를 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 인터페론(IFN)-유도 단백질인 바이페린을 억제하는 물질을 개체에 투여할 경우 개체의 간, 심장, 지방 등의 조직에서 열 생성물이 현저히 증가하고, 열생성/지방산  $\beta$ -산화 관련 유전자의 발현이 증가하며, 이를 통해 저온 환경 하에서도 체온이 유지될 수 있음을 발견함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0013] 따라서 본 발명의 목적은 생체 내 열생성(thermogenesis) 증진용 조성물을 제공하는 데 있다.

[0014] 본 발명의 다른 목적은 저온 내성(cold-tolerance) 증진용 조성물을 제공하는 데 있다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 생체 내 열생성(thermogenesis) 증진용 조성물의 스크리닝 방법을 제공하는 데 있다.

[0017] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

### 과제의 해결 수단

[0019] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 바이페린(viperin) 억제제를 유효성분으로 포함하는 생체 내 열생성(thermogenesis) 증진용 조성물을 제공한다.

[0020] 본 발명자들은 생체 내에서의 열생성을 증가시킴으로써 대사증후군을 비롯한 다양한 열생성 저하증(thermogenic hypofunction)을 치료하고 저온 노출 환경에 대한 내성을 부여할 수 있는 효율적인 열생성 증진제를 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 인터페론(IFN)-유도 단백질인 바이페린을 억제하는 물질을 개체에 투여할 경우 개체의 간, 심장, 지방 등의 조직에서 열 생성물이 현저히 증가하고, 열생성/지방산  $\beta$ -산화 관련 유전자의 발현이 증가하며, 이를 통해 저온 환경 하에서도 체온이 유지될 수 있음을 발견하였다.

[0021] 본 명세서에서 용어 “열생성(thermogenesis) 증진”은 외부로부터의 열공급이 없는 상태에서 대상체 내의 열생성량이 자율적으로(autonomously) 증가하도록 하는 것을 의미한다. 따라서 “열생성 증진용 조성물”은 “열생성 저하증(thermogenic hypofunction)의 예방 또는 치료용 조성물”과 동일한 의미로 사용된다.

[0022] 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  $\beta$ -산화와 열생성의 억제가 유의하게 저하될 수 있을 정도로 바이페린의 활성 또는 발현을 저하시키는 물질을 의미한다.

[0023] 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.

[0024] 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.

[0025] 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 있

는 것이면 평활(blunt)말단 혹은 점착(cohesive) 말단 모두 가능하다. 점착 말단 구조는 3 말단 돌출한 구조와 5 말단 쪽이 돌출한 구조 모두 가능하다.

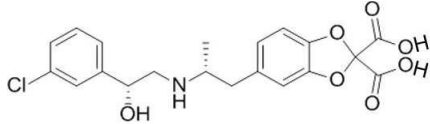
- [0026] 본 명세서에서 용어 “miRNA(microRNA)”는 세포내에서 발현되지 않는 올리고뉴클레오타이드로서 짧은 스템-루프 구조를 가지면서 타겟 유전자의 mRNA와 상보적인 결합을 통하여 타겟 유전자 발현을 억제하는 단일 가닥 RNA 분자를 의미한다.
- [0027] 본 명세서에서 용어 “리보자임(ribozyme)”은 RNA의 일종으로 특정한 RNA의 염기 서열을 인식하여 자체적으로 이를 절단하는 효소와 같은 기능을 가진 RNA 분자를 의미한다. 리보자임은 타겟 mRNA 가닥의 상보적인 염기서열로 특이성을 가지고 결합하는 영역과 타겟 RNA를 절단하는 영역으로 구성된다.
- [0028] 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 유전자의 발현을 조절한다.
- [0029] 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.
- [0030] 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.
- [0031] 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.
- [0032] 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.
- [0033] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물에 의한 열생성은 지방 조직에서의 열생성이다.
- [0034] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 *Ucp1*, *Pgc1 $\alpha$* , *Cidea*, *Ppar $\alpha$* , *Ppar $\beta/\delta$* , *Cpt1*, *아디포넥틴*, *Fabp4* 및 *C/ebp $\alpha$* 로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 발현을 증가시킨다.
- [0035] 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.
- [0036] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 아드레날린 신호 경로 활성화제를 추가적인 유효성분으로 포함한다.
- [0037] 후술하는 실시예에서 보는 바와 같이, 본 발명의 바이페린 억제제는 아드레날린 신호 경로를 경유하여 지방산  $\beta$ -산화와 지방조직에서의 열생성을 유도하며, 바이페린을 억제하는 동시에 아드레날린 신호 경로를 활성화시킬



경우 이러한 열생성은 더욱 증가하였다. 따라서 아드레날린 신호 경로 활성화제는 열생성 증진을 위해 추가되는 보조적 유효성분으로서 이용될 수 있다.

[0038] 구체적으로는, 상기 아드레날린 신호 경로 활성화제는  $\beta 3$ -아드레날린 수용체(ADRB3) 아고니스트이며, 보다 구체적으로는 하기 화학식 1의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염이다.

[0039] **화학식 1**



[0040]

[0041] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 C1-316243 (5-[(2R)-2-[[[(2R)-2-(3-클로로페닐)-2-하이드록시에틸]아미노]프로필]-1,3-벤조디옥솔-2,2-디카복실산)이다.

[0042] 본 명세서에서 용어 “약제학적으로 허용되는 염”은 약제학적으로 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.

[0043] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 바이페린(viperin) 억제제를 유효성분으로 포함하는 저온 내성(cold-tolerance) 증진용 조성물을 제공한다.

[0044] 본 발명에서 이용되는 바이페린 억제제에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위해 그 기재를 생략한다.

[0045] 본 명세서에서 용어 “저온 내성(cold-tolerance)”은 생존, 성장 및 생체 기능을 저하시킬 수 있는 낮은 온도에 일정 기간 노출된 경우에도 생존 능력, 성장 능력 및 정상적인 생체기능을 유지하는 개체의 능력을 의미하며, 구체적으로는 저온 노출시 본 발명의 조성물을 투여하지 않은 대조군에 비해 보다 높은 체온을 유지하는 능력을 의미한다. 구체적으로, “저온(cold)”은 상온(room temperature) 미만을 의미하며, 보다 구체적으로는 15℃ 이하, 보다 더 구체적으로는 10℃ 이하, 가장 구체적으로는 5℃ 이하의 환경을 의미한다.

[0046] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 생체 내 열생성(thermogenesis) 증진용 조성물의 스크리닝 방법을 제공한다:

[0047] (a) 바이페린(viperin)을 포함하는 생물학적 시료에 후보물질을 접촉시키는 단계;

[0048] (b) 상기 시료 내 바이페린의 활성 또는 발현량을 측정하는 단계,

[0049] 상기 바이페린의 활성 또는 발현량이 감소한 경우, 상기 후보물질은 생체 내 열생성(thermogenesis) 증진용 조성물로 판정한다.

[0050] 본 발명에서 지시하는 “열생성 증진”의 의미에 대해서는 이미 상술하였으므로 과도한 중복을 피하기 위해 그 기재를 생략한다.

[0051] 본 발명에서 용어 “생물학적 시료”는 인간을 포함한 포유동물로부터 얻어지는, 바이페린을 발현하는 세포를 포함하고 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.

[0052] 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 생체 내 열생성 증진용 조성물로 판정될 수 있다.

[0053] 본 명세서에서 용어 “발현의 감소”는 바이페린의 발현량이 대상체 내에서의 열생성이 유의하게 증가, 개선 또는 회복될 수 있을 정도로 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.

[0054] 본 명세서에서 용어 “활성의 감소”란 대조군에 비하여 단백질의 생체내 고유한 기능이 측정 가능할 정도로 유의하게 감소하는 것을 말하며, 구체적으로는 지방산  $\beta$ -산화 및 열생성을 억제하는 바이페린의 활성이 저하되어 대상체 내에서의 열생성이 유의하게 증가, 개선 또는 회복될 수 있을 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

[0056] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0057] (a) 본 발명은 생체 내 열생성(thermogenesis) 증진용 조성물 및 저온 내성(cold-tolerance) 증진용 조성물을 제공한다.

[0058] (b) 본 발명은 생체 내에서의 열생성을 증가시킴으로써 대사증후군을 비롯한 다양한 열생성 저하증(thermogenic hypofunction)을 치료하고 저온 노출 환경에 대한 내성을 부여할 수 있는 효율적인 열생성 증진제로 유용하게 이용될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0060] 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. 도 1c는 WT 및 바이페린 KO 마우스에 15주령부터 30주령까지 RC 또는 HFD를 먹이고(15 주간 섭식) 지방 조직의 바이페린 발현을 조사한 결과이다(n=3). 데이터는 생물학적으로 독립적인 실험들의 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  $\beta$ -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  $\mu$ 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  $\mu$ m). 데이터는 생물학적으로 독립적인 실험들의 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  $\beta$ -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  $\mu$ m)(도 3e)를 각각 나타내었다.

도 4는  $\beta$ 3-아드레날린 수용체(ADRB3) 아고니스트가 바이페린 KO 마우스에서 열발생 표현형을 촉진함으로 보여주는 그림이다. WT 및 바이페린 KO 마우스에 ADRB3 아고니스트인 CL-316243를 복강(1mg/kg 체중/일)으로 3일간 투여하였다. CL-처리 마우스에 대해서, 도 4a는 지방 조직의 총중량(n = 6), 도 4b는 지방 조직에서의 열생성 - 및 지방산  $\beta$ -산화-관련 유전자의 상대적인 mRNA 수준(n = 6), 도 4c는 iWAT에서의 바이페린과 UCP1의 단백질 발현 수준(n = 3), 그리고 도 4d는 지방 조직의 UCP1에 대한 면역조직화학 염색 결과(스케일바: 200  $\mu$ m)를 각각 나타낸다. 데이터는 생물학적으로 독립적인 실험들의 평균±표준오차로 나타났다. \*P<0.05; \*\*P<0.001 vs. WT.

도 5는 바이페린이 지방세포-자율적으로 지방산  $\beta$  산화-매개 열생성을 조절함을 보여주는 그림이다. 간질혈관 분획(stromal vascular fraction, SVF)을 BAT로부터 분리한 뒤 성숙한 갈색 지방세포로 분화시켰다. 도 5a는 분화하는 동안 갈색 지방세포에서의 지방생성-, 열생성- 및 지방산  $\beta$ -산화-관련 유전자의 상대적인 mRNA 수준



을 나타낸다. 도 5b 및 5c는 CL-처리된 갈색 지방세포(도 5b) 및 ETO(에토복셀; 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 RC 또는 HFD를 장기간 동안 먹인 어린 WT 및 바이페린 KO 마우스의 체중 변화를 보여주는 그림이다. WT 및 바이페린 KO 마우스에 RC 또는 HFD를 6주령에서 21주령까지 먹였다(15주간 섭식). 데이터는 생물학적으로 독립적인 시료들의 평균  $\pm$  표준오차로 나타났다.

도 7은 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 7a는 체중변화를 ( $n=5-7$ ), 도 7b는 기관 무게를( $n=5-7$ ) 각각 나타낸다. 데이터는 생물학적으로 독립적인 시료들의 평균  $\pm$  표준오차로 나타났다.

도 8은 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 8a) 또는 HFD(도 8b)를 먹인 마우스의 지방조직에서 열생성- 및 지방산  $\beta$ -산화 관련 유전자의 상대적인 mRNA 수준을 각각 나타낸다( $n=3-4$ ). 데이터는 생물학적으로 독립적인 시료들의 평균  $\pm$  표준오차로 나타났다. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$  vs. WT.

도 9는 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 9a) 또는 HFD(도 9b)를 먹인 마우스의 지방조직에서 열생성- 및 지방산  $\beta$ -산화 관련 유전자의 상대적인 mRNA 수준을 각각 나타낸다( $n=3-4$ ). 데이터는 생물학적으로 독립적인 시료들의 평균  $\pm$  표준오차로 나타났다. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$  vs. WT.

도 10은 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 10a는 지방조직에서 바이페린에 대한 면역조직화학 염색 결과를 나타내며(스케일바:200  $\mu$ m), 도 10b는 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 10c 및 d는 RC를 먹인 마우스(도 10c)와 HFD를 먹인 마우스(도 10d)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 11은 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 11a), BAT( $n=3$ )에서 바이페린 및 UCP1의 발현을(도 11b), 지방조직에서 UCP1에 대한 면역조직화학 염색 결과를(도 11c) 각각 나타내었다. WT 및 바이페린 KO 마우스에 CL-316243을 3일간 복강투여(1mg/kg 체중/d)하였다. HFD를 먹인 CL-처리 21주령 마우스에서 iWAT과 BAT에서의 바이페린 및 UCP1 단백질의 발현을 각각 측정하고( $n=3$ )(도 11d 및 도 11e)( $n=3$ ), 지방조직에서의 UCP1에 대한 면역조직화학 염색을 수행하였다(도 11f)(스케일바:200  $\mu$ m). 데이터는 생물학적으로 독립적인 시료들의 평균  $\pm$  표준오차로 나타났다. \* $P < 0.05$  및 \*\* $P < 0.01$  vs. WT.

도 12는 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  $\pm$  표준오차로 나타났다.

도 13은 갈색 지방세포에서 바이페린의 세포 자율기능(Cell-autonomous function)을 보여주는 그림이다. BAT로부터 SVF를 분리하여 성숙 갈색 지방세포로 분화시켰다. 도 13a는 분화하는 동안 갈색 지방세포에서 지방생성 및 열생성-관련 유전자의 상대적인 RNA 수준을 나타낸다. 도 13b는 분리된 SVF 및 SVF-분화된 갈색 지방세포에서 사이토카인의 상대적 mRNA 수준을 나타낸다. 데이터는 2개의 독립적인 실험값에 대한 평균  $\pm$  표준오차로 나타났다. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  및 \*\*\* $P < 0.001$  vs. WT.

도 14는 백색 지방세포에서 바이페린의 세포 자율기능(Cell-autonomous function)을 보여주는 그림이다. eWAT으

로부터 SVF를 분리하여 성숙 백색 지방세포로 분화시켰다. 도 14a는 분화하는 동안 백색 지방세포에서 지방생성 및 열생성-관련 유전자의 상대적인 mRNA 수준을 나타낸다. 도 14b는 ETO(에토목실)- 또는 RAN(라노라진)을 처리한 백색 지방세포에서의 바이페린 및 UCP1의 상대적인 mRNA 수준을 나타낸다. 데이터는 2개의 독립적인 실험값에 대한 평균±표준오차로 나타났다. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  및 \*\*\* $P<0.001$  vs. WT

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0061] 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.
- [0063] **실시예**
- [0064] **실험방법**
- [0065] **동물 실험**
- [0066] 모든 동물실험은 연세대학교 의과대학의 동물실험윤리위원회의 승인 하에 그 가이드라인을 준수하면서 수행하였다. 마우스는 SPF(특정 병원체 부재, specific pathogen-free) 격리장치에서 22℃의 12시간 광조건/12시간 암조건에서 유지하고, 물과 먹이를 자유롭게 먹도록 하였다.
- [0068] **동물식이**
- [0069] 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.
- [0071] **조직 분리**
- [0072] 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.
- [0074] **체온 및 저온 노출**
- [0075] 열충격 적응을 위해, 20주령 WT 및 바이페린 KO 수컷 마우스(케이지당 한 마리)를 동물 인큐베이터(Dae Han Bio Link)에 넣고 30℃에서 12시간 광조건/12시간 암조건으로 2-3일간 RC 또는 HFD를 먹였다(2, 3). 저온 노출을 위해 인큐베이터를 4℃까지 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 복강 투여하였다.
- [0077] **조직학적 분석.**
- [0078] 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 채수화하였다. 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(vol/vol)로 블로킹하고 무혈청의 바로 사용 가능한(ready-to-use) 단백질 블로킹 용액(Dako Denmark)에서 단백질을 블로킹하였다. 면역형광을 위해 샘플을 바이페린 특이적 1차 항체(MaP.VIP), MFN-1 특이적 1차 항체(Santa Cruz Biotechnology) 및 UCP1 특이적 1차 항체(Abcam)와, Alexa Fluor 488- 또는 555-접합 2차(Invitrogen)로 처리하였다. 이미지는 공초점 현미경(LSM 700; Carl Zeiss)으로 캡처하였다.
- [0080] **면역블롯 분석.**
- [0081] 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℃에서 원심분리하고 상층액을 수집하였다. 단백질 농

도는 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  $\alpha$ -튜블린을 로딩 대조군으로 사용하였다.

[0083] RNA 추출, cDNA 제작 및 정량적 실시간 PCR.

[0084] Qiagen RNeasy Mini Kit을 이용하여 세포 또는 지방 조직으로부터 총 RNA를 분리하였다. cDNA 합성은 RNA 1  $\mu$ 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  $\beta$ -액틴 유전자에 대해 정규화하였다. 2개의 독립적 실험을 통계적으로 분석하여 P 값을 각 도면에 표시하였다.

표 1

[0085] 정량적 실시간 PCR에 사용된 마우스 특이적 프라이머 서열

유전자	정"넉*	역방향
Viperin	GTGAATACTTGGGCAAGCT	CAAATACTCCCCATAGTCC
Ucp1	GGCCTCTACGACTCAGTCCA	TAAGCCGGCTGAGATCTTGT
Pgc1 $\alpha$	CCCTGCCATTGTTAAGACC	TGCTGCTGTTCTCTGTTTC
Prdm16	CAGCACGGTGAAGCCATTC	GCGTGCATCCGCTTGTG
Cidea	TGCTCTTCTGTATCGCCAGT	GCCGTGTTAAGGAATCTGCTG
Ppar $\gamma$	GTGCCAGTTTCGATCCGTAGA	GGCCAGCATCGTGTAGATGA
Ppar $\alpha$	TCGGCGAACTATTCGGCTG	GCACTGTGAAAACGGCAGT
Ppar $\beta$ / $\delta$	TTGAGCCCAAGTTCGAGTTTG	CGGTCTCCACACAGAATGATG
Cpt1b	TCTATGAGGGCTCGCG	CGTCAGGGTGTAGCA
IL-6	CCTCTGGTCTTCTGGAGTACC	ACTCCTTCTGTGACTCCAGC
IL-10	ATAACTGCACCACTTCCCA	GGGCATCACTTCTACCAGGT
IL-13	GCAGCATGGTATGGAGTGTG	TGGCGAAACAGTTGCTTTGT
IL-1 $\beta$	GTGGCTGTGGAGAAGCTGTG	GAAGGTCCACGGGAAAGACAC
TNF- $\alpha$	ATGAGCACAGAAAGCATG	AGTAGACAGAAGAGCGTGGT
TGF- $\beta$	CCTGCAAGACCATCGACATG	TGTTGTACAAAGCGAGCACC
C/ebp $\alpha$	CAAAGCCAAGAAGTCGGTGGACAA	TCATTGTGACTGGTCAACTCCAGC
아디포넥틴	CCGGGACTCTACTACTTCTCTT	TTCTTGATACTGGTCGTAGGT
Fabp4	ACACCGAGATTTCTTCAAACCTG	CCATCTAGGGTTATGATGCTCTTC
$\beta$ -액틴	GCTCCGGCATGTGCAA	AGGATCTTCATGAGGTAGT

[0087] SVF 분리 및 지방세포로의 분화.

[0088] 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  $\mu$ m 세포 스트레이너로 여과하고 470 $\times$ g로 15분간 원심분리하였다. 펠렛을 10% FBS와 1% 페니실린/스트렙토마이신이 보충된 지방세포 배양 배지에 재부유하고 플레이팅하였다. 컨플루언스에 도달하면, 500  $\mu$ M 3-이소부틸-1-메틸잔틴(IBMX), 0.5  $\mu$ M 텍사메타손, 20nM 인슐린, 125  $\mu$ M 인도메타신 및 1nM T3(이상 Sigma-Aldrich)를 이용하여 1차 갈색 지방세포의 분화를 자극하였다. 백색 지방 전구세포는 500  $\mu$ M IBMX, 1  $\mu$ M 텍사메타손 및 10  $\mu$ 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  $\mu$ M 에토목실(etomoxir) 또는 50  $\mu$ g/mL 라노라진(ranolazine) (이상 Sigma-Aldrich)을 24시간 동안 처리하였다. 세포는 5% CO<sub>2</sub>의 가습 인큐베이터에서 37°C로 배양하였으며, 배양액은 2일에 한 번씩 교체하였다.

[0090] 1차 갈색 지방세포의 세포 호흡 분석.

[0091] 1차 갈색 지방세포의 세포 OCR은 Seahorse XF96 세포의 유동 분석기 (Seahorse Bioscience)를 이용하여 측정하였다. 분화된 지방세포를 10,000세포/웰의 밀도로 플레이팅하였다. 지방세포에 100nM CL-316243 또는 50  $\mu$ M 에토모실을 24시간 동안 처리하였다. 기준선 세포 OCR은 비처리 세포에서 측정하였다. 미토콘드리아 호흡 사슬 복합체의 억제제인 올리고마이신(complex V 억제제) 1  $\mu$ M, 카르보닐사이아나이드-4-(트리플루오로메톡시)페닐하이드라존[FCCP;미토콘드리아 언커플러(uncoupler)] 1  $\mu$ M 및 로테논/안티마이신 A(complex I/III 억제제) 0.5  $\mu$ 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.

[0093] 통계적 분석.

[0094] 데이터는 평균±표준오차로 나타냈었다. 통계적 유의성은 비대응 양측분포 Student *t*-검정을 이용하여 결정하였다. *P* < 0.05인 경우 통계적 유의성을 가지는 것으로 간주하였다.

[0096] 실험결과

[0097] 바이페린의 내재적 발현이 지방대사 및 열생성을 조절한다.

[0098] 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. 이러한 가설을 시험하기 위해, WT 및 바이페린 KO 마우스에 RC 또는 HFD를 15주령에서 30주령까지 먹이고(15주간 섭식;장기간) 마우스 표현형을 비교하였다.

[0099] 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 6) 또는 16주령에서 20주령까지(4주간 섭식; 단기간)(도 7) 먹였다. HFD를 단기간 먹인 마우스를 제외한 모든 마우스에서 표현형을 반복적으로 비교하였으며(도 6 및 도 7), 그 결과 바이페린-매개 표현형은 마우스의 연령보다는 섭식 기간에 좌우됨을 발견하였다.

[0101] 바이페린 결핍은 지방 조직에서의 열발생 유전자 발현을 촉진시킨다.

[0102] 바이페린 발현이 지방산  $\beta$ -산화 매개된 열생성에 관련되었는지를 조사하기 위해, *Ucp1*, *Pgc1a* 및 *Cidea*와 같은 열생성 관련 유전자와 *Ppar  $\alpha$* , *Ppar  $\beta/\delta$*  및 *Cpt1a*와 같은 지방산  $\beta$ -산화 관련 유전자의 발현 수준을 지방 조직에서 측정하였다(도 2a, 도 8 및 도 9). 이들 유전자의 발현 수준은 지방조직, 특히 RC를 먹인 바이페린 KO 마우스의 eWAT 및 iWAT에서 유의하게 증가하였다(도 2a, 도 8a 및 도 9a). 이들 유전자는 HFD를 장기간 먹인 바이페린 KO 마우스의 iWAT 및 BAT에서도 유의하게 증가하였지만, HFD를 단기간 먹인 경우에는 그렇지 않았다(도 2a, 도 8b 및 도 9b). UCP1 단백질 발현은 RC 또는 HFD를 먹인 바이페린 KO 마우스의 지방 조직에서 증가하였다(도 2b 및 2c). 바이페린 발현은 HFD를 먹인 WT 마우스의 지방조직에서도 증가하였다(도 2b 및 도 10a). 나아가, 바이페린은 RC 또는 HFD를 먹인 WT 마우스의 BAT에서 미토콘드리아로 이동하였다(도 2d). 이러한 데이터는 바이페린이 지방조직의 열생성을 저해하며, 이는 지방세포의 미토콘드리아에서 지방산  $\beta$ -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 10b). RC를 먹인 마우스의 BAT을 제외하고, RC 또는 HFD를 먹인 WT 및 바이페린 KO 마우스 간에 지방 조직에서의 사이토카인 유전자의 발현 수준은 거의 차이나지 않았다(도 10c 및 10d).

[0104] 바이페린 결핍은 열생성을 촉진하고 저온 내성을 부여한다.

- [0105] 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  $\beta$ -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 발현의 증가가 저온 환경에서의 열생성을 억제하고 저온 내성을 저해함을 말해준다. 따라서, 바이페린이 지방조직에서의 저온-유도 열생성의 조절에 필수적임을 알 수 있다.
- [0107] *바이페린 결핍은 아드레날린 신호경로를 통해 저온-유도 열생성을 촉진한다.*
- [0108] 다음으로, 바이페린 KO 마우스 지방조직에서의 저온-유도 열생성 표현형이 아드레날린 신호경로에 의해 매개되는지 여부를 조사하기 위하여, 마우스를 ADRB3 아고니스트인 CL-316243로 3일간 자극하였다. CL-처리 바이페린 KO 마우스에서 지방 조직의 질량이 감소하여(도 4a), CL-처리 바이페린 KO 마우스에서의 열생성이 매우 활발함을 알 수 있었다. CL-처리 바이페린 KO 마우스의 지방조직에서 열생성 및 지방산  $\beta$ -산화 관련 유전자의 발현 수준도 크게 증가하였다(도 4b). 바이페린 단백질 발현이 CL-처리 바이페린 WT 마우스의 iWAT에서 증가하였다(도 4c). 저온에 노출된 마우스와 마찬가지로, 지방 조직의 UCP1 단백질의 발현 증가는 CL-처리 바이페린 KO 마우스에서 CL-처리 바이페린 WT 마우스에 비해 더 두드러졌다(도 4c 및 4f). 이러한 결과를 통해 바이페린 KO 마우스의 저온환경으로 유도된 표현형이 아드레날린 신호 경로에 의해 유도됨을 알 수 있었다.
- [0110] *HFD-유도된 바이페린 발현은 저온-유도 열생성 표현형을 강화한다.*
- [0111] 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 11a). HFD를 먹인 WT 마우스의 BAT에서 저온 노출 후 바이페린 발현은 크게 증가하였다(도 11b 및 12). 저온 노출 시 BAT과 지방세포에서의 UCP1 발현 증가는 HFD를 먹인 WT 마우스에서보다 HFD를 먹인 바이페린 KO 마우스에서 더 두드러졌다(도 11b 및 11c). 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. 바이페린 단백질 발현은 HFD를 먹인 CL-처리 WT 마우스의 iWAT 및 BAT에서 증가하였다(도 11d 및 11e). 지방조직에서 UCP1 발현의 증가는 HFD를 먹인 CL-처리 바이페린 KO 마우스에서 WT 마우스에 비해 더 두드러졌다(도 11d-11f). 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.
- [0113] *바이페린은 지방세포-자율적으로 지방산  $\beta$ -산화 매개된 열생성을 조절한다*
- [0114] 지방조직에서 바이페린의 세포-자율적인 기능을 시험하기 위해, BAT 또는 eWAT로부터 SVF를 분리하고 성숙한 갈색 또는 백색 지방세포로 분화시켰다(도 5, 도 13 및 도 14). 바이페린 결핍은 성숙한 갈색 지방세포(도 5a 및 도 13a)와 백색 지방세포(도 14a)에서 *아디포넥틴*, *Fabp4* 및 *C/ebp a*와 같은 지방생성-관련 유전자의 발현을 증진시킨다. 이를 통해 지방산  $\beta$ -산화의 증가가 지방세포에서의 지방생성과 열생성을 모두 촉진함을 알 수 있다.
- [0115] 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 13b). 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 억제함

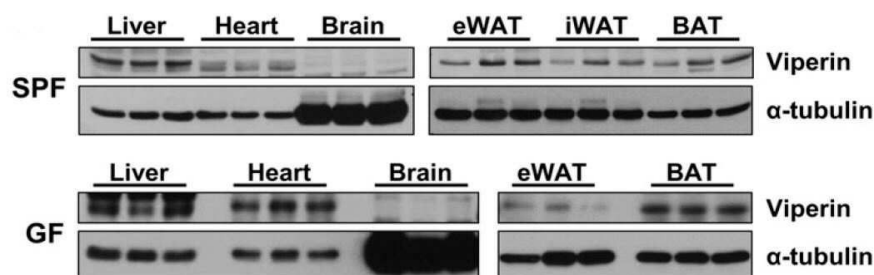


을 보여준다.

- [0116] 마지막으로, 바이페린이 지방조직의 열생성을 조절하는 메카니즘을 밝히기 위해, 지방산  $\beta$ -산화의 억제제인 에토크실 또는 라노라진을 처리한 지방세포의 열생성-관련 유전자의 발현을 측정하였다(도 5c 및 도 14b). 그 결과, 바이페린 KO 지방세포의 열생성-관련 유전자의 발현은 억제제 처리 후에만 유의하게 감소하였다. 이를 통해 바이페린 결핍이 지방세포의 지방산  $\beta$ -산화를 촉진함으로써 열생성을 증가시킨다는 것을 알 수 있었다.
- [0117] 세포의 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  $\beta$ -산화를 억제하여 지방생성 및 지방세포의 열생성을 저해함을 알 수 있다.
- [0119] 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.
- [0121] **참고문헌**
- [0122] 1. L. Q. Qiu, P. Cresswell, K. C. Chin, *Blood* 113, 3520-3529 (2009).
- [0123] 2. B. Cannon, J. Nedergaard, *J. Exp. Biol.* 214, 242-253 (2011).
- [0124] 3. E. Gospodarska, P. Nowialis, L. P. Kozak, *J. Biol. Chem.* 290, 8243- 8255 (2015).
- [0125] 4. Y. H. Tseng et al., *Nature* 454, 1000-1004 (2008)
- [0126] 5. P. Rajbhandari et al., *Cell* 172, 218-233.e17 (2018).
- [0127] 6. Y. Qiu et al., *Cell* 157, 1292-1308 (2014).
- [0128] 7. R. R. Rao et al., *Cell* 157, 1279-1291 (2014).
- [0129] 8. J. Eom et al., *Immune Netw.* 18, e32 (2018).

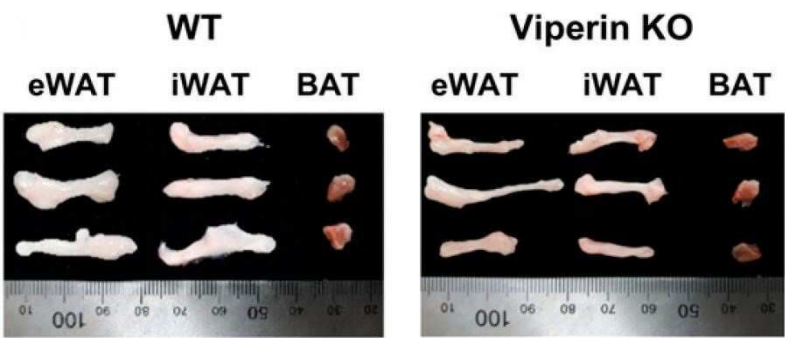
## 도면

### 도면1a

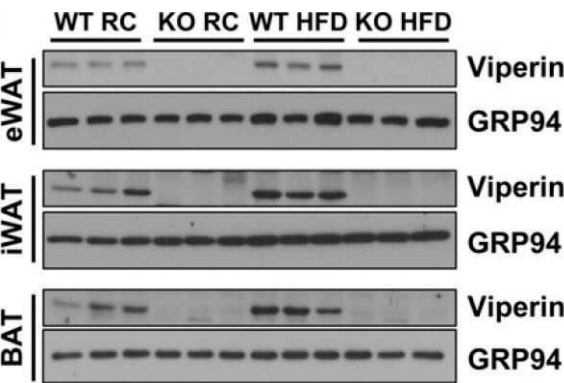




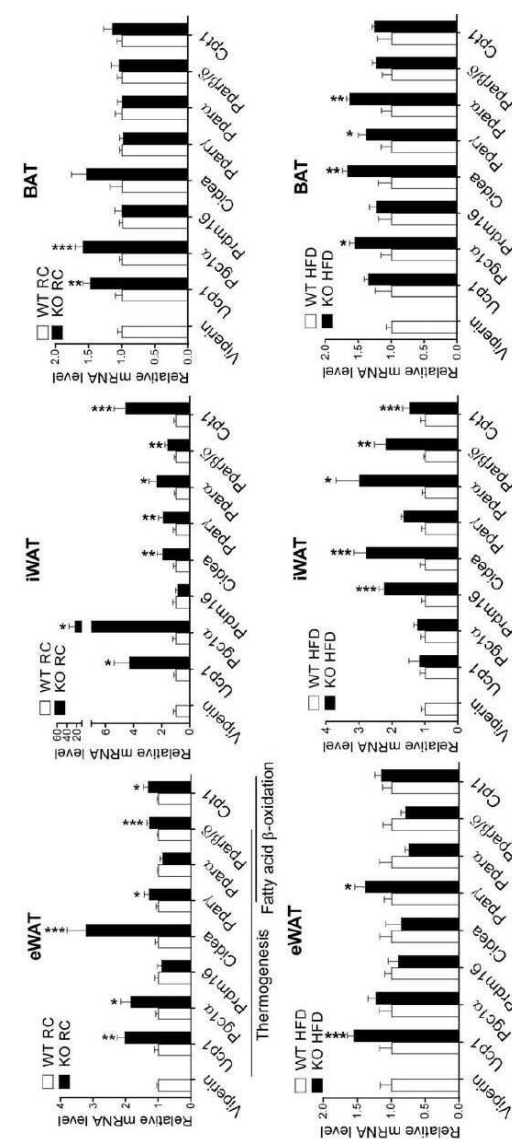
도면1b



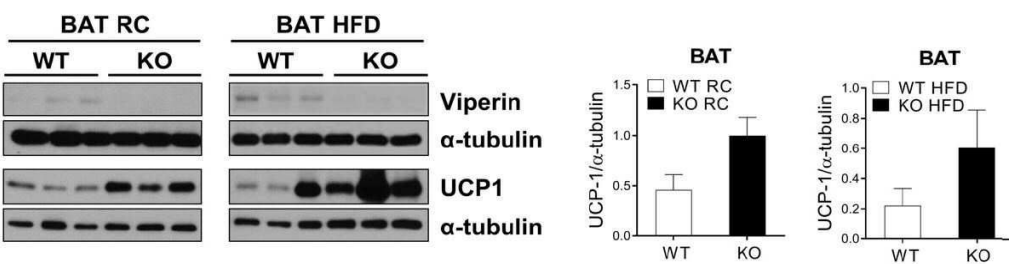
도면1c



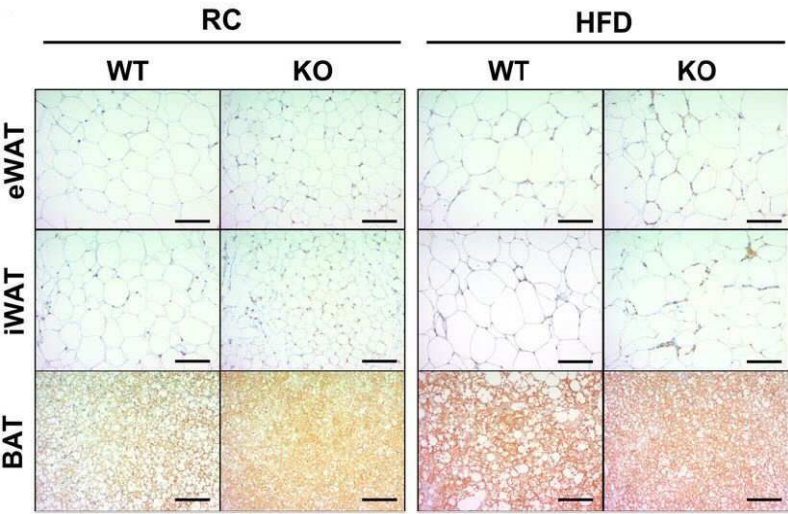
도면2a



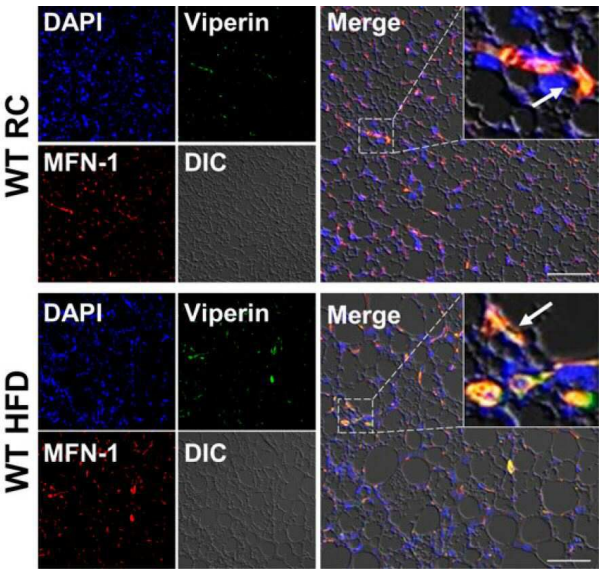
도면2b



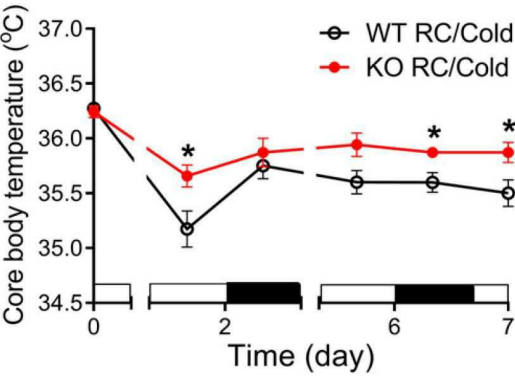
도면2c



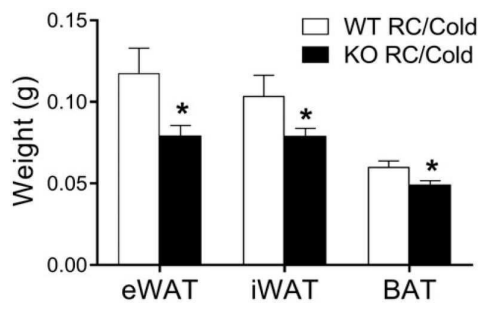
도면2d



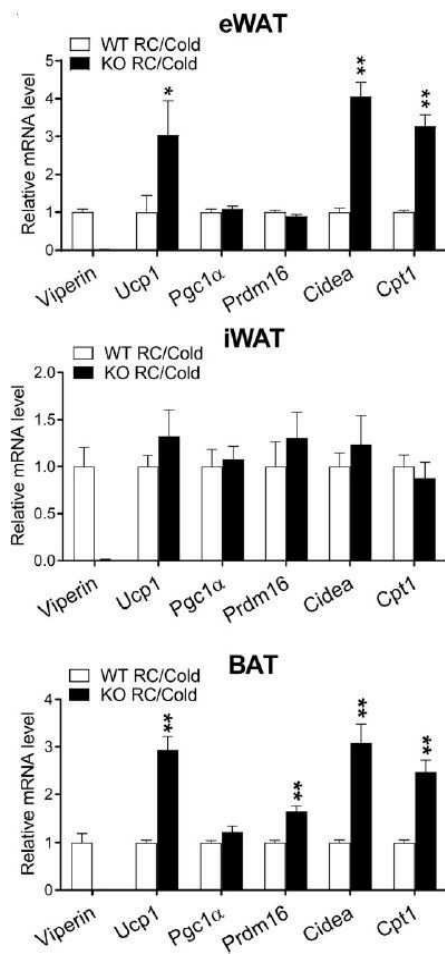
도면3a



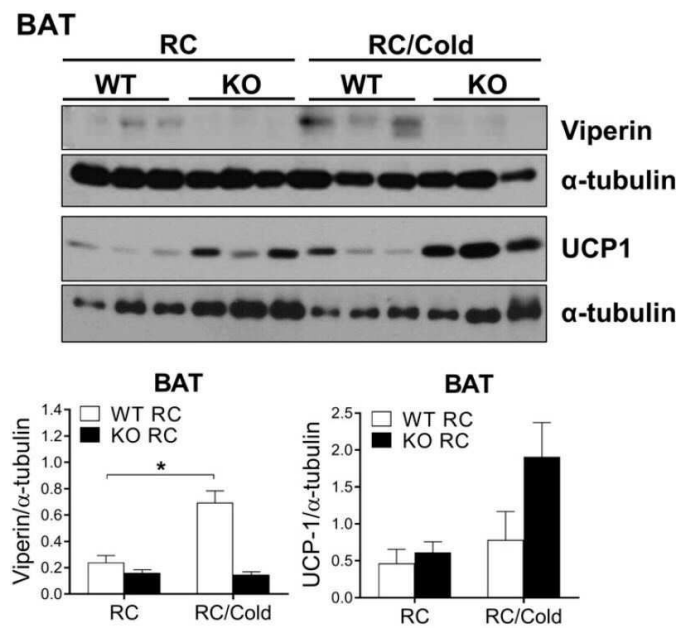
도면3b



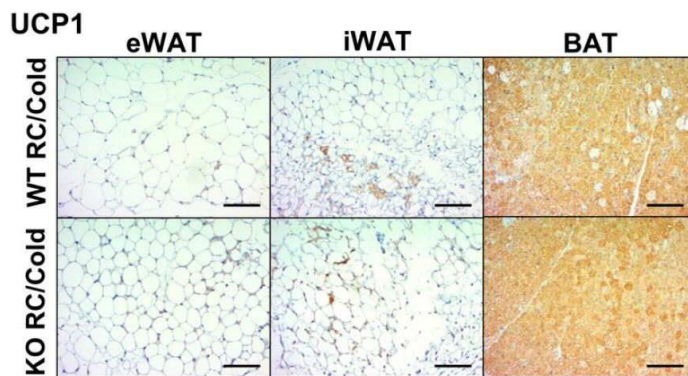
도면3c



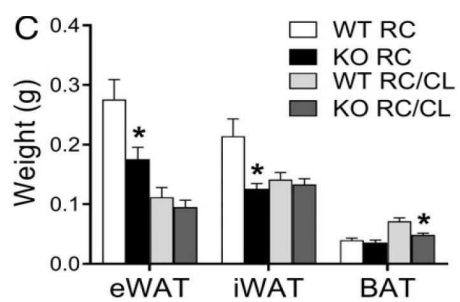
도면3d



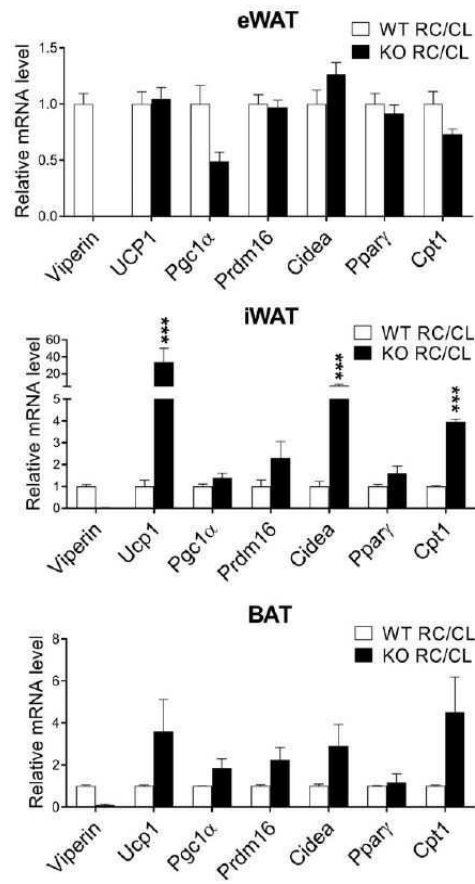
도면3e



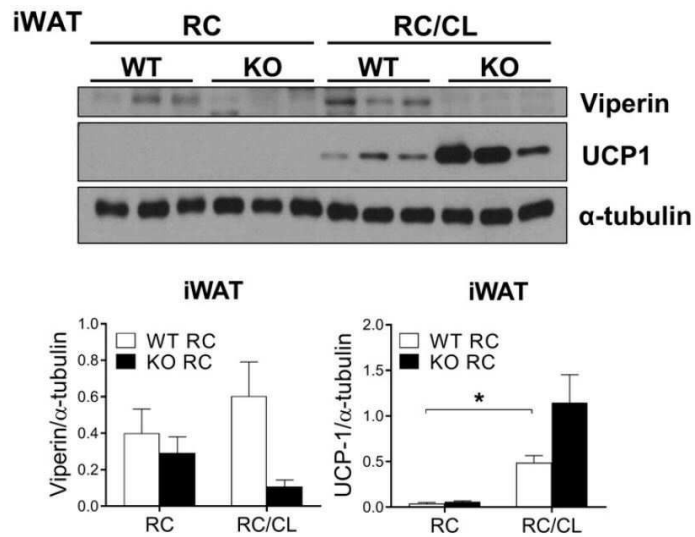
도면4a



도면4b

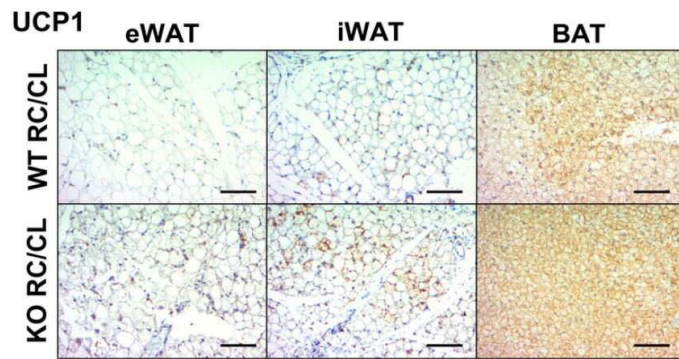


도면4c

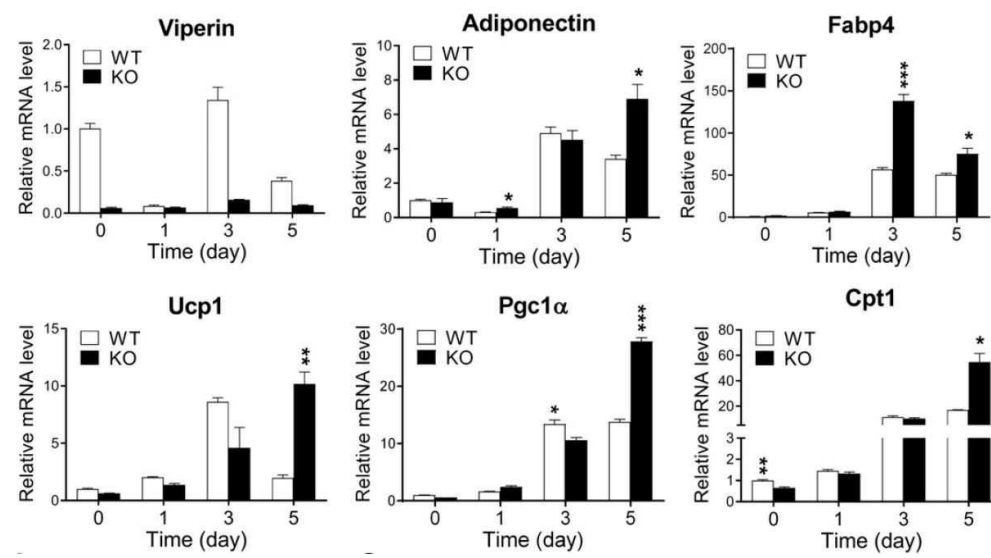




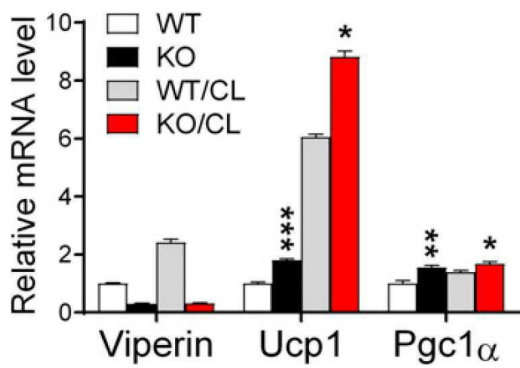
도면4d



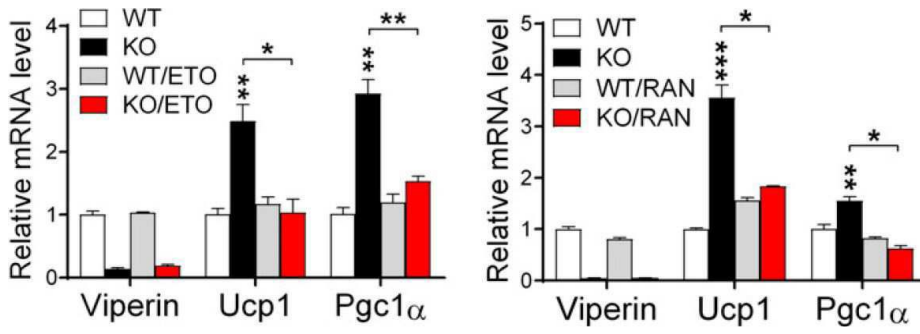
도면5a



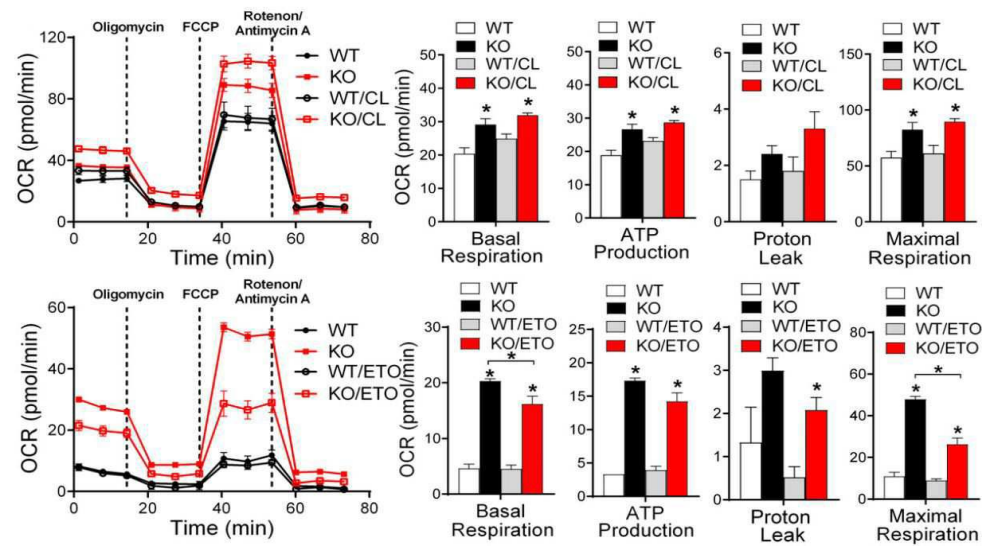
도면5b



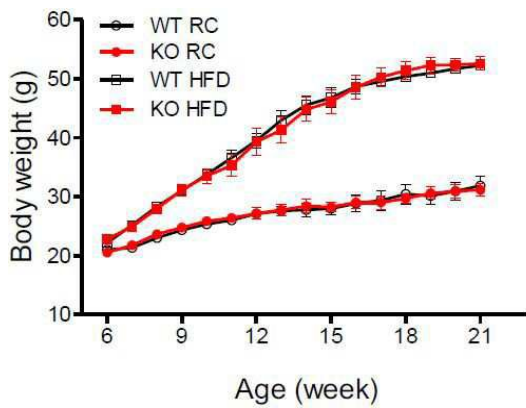
도면5c



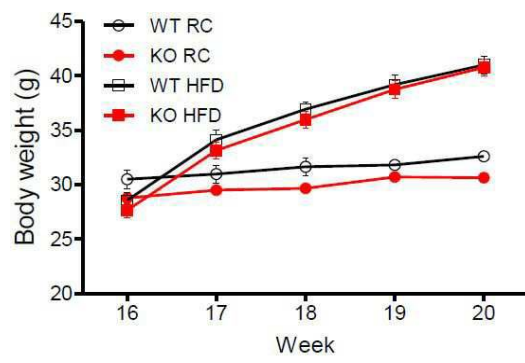
도면5d



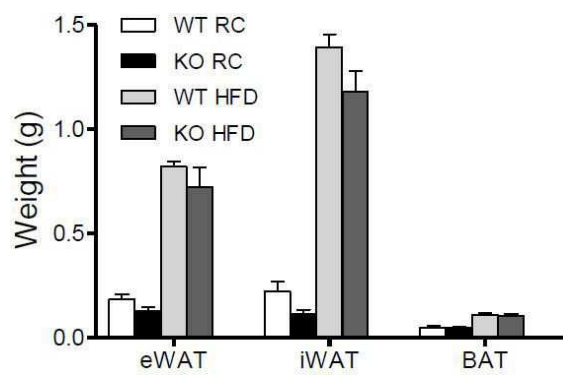
도면6



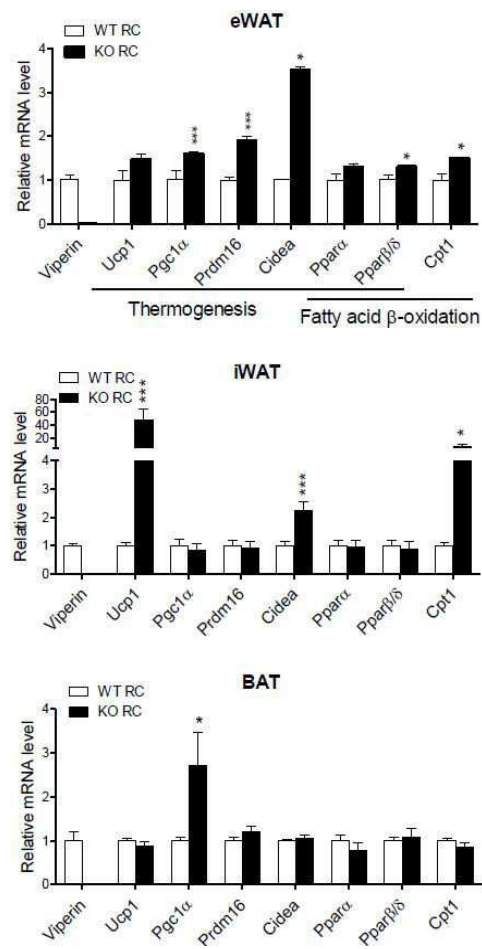
도면7a



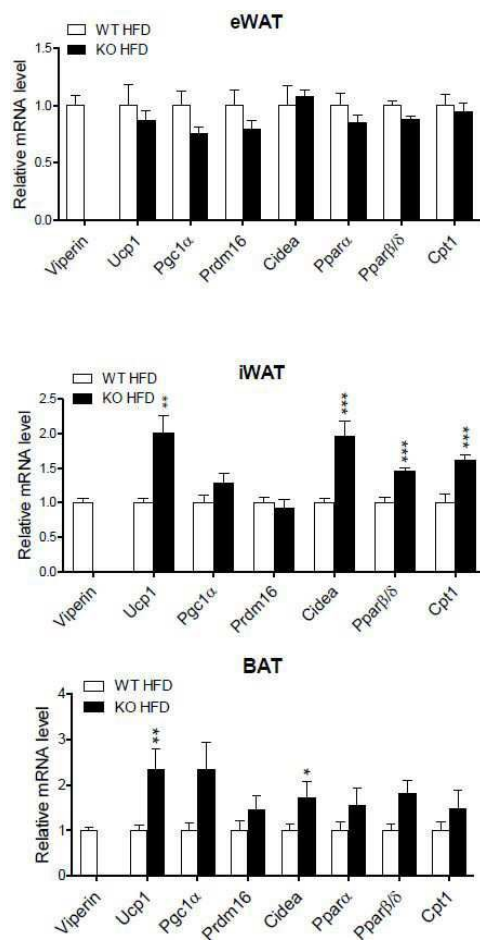
도면7b



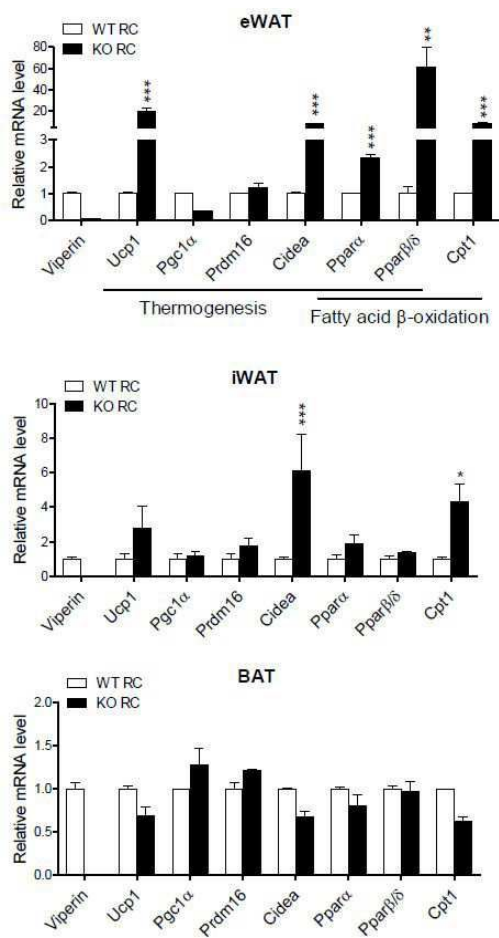
도면8a



도면8b

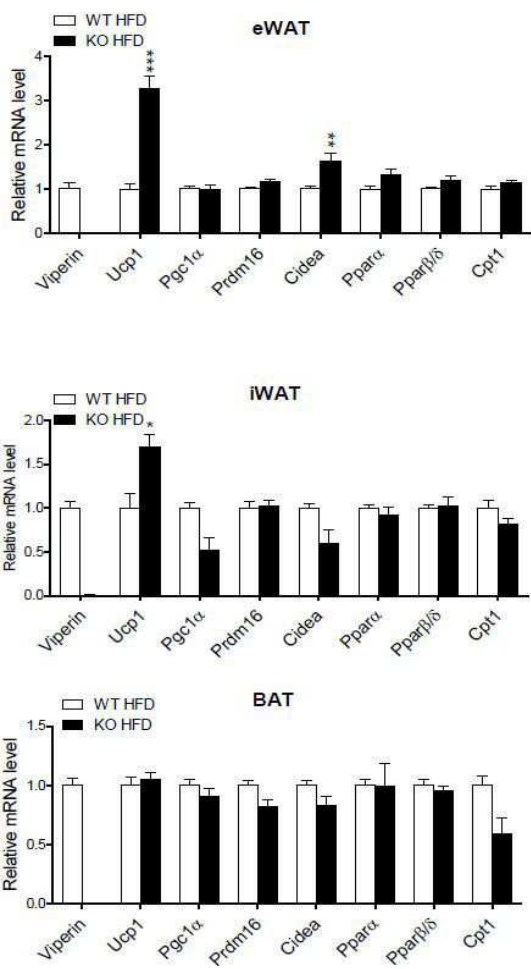


도면9a

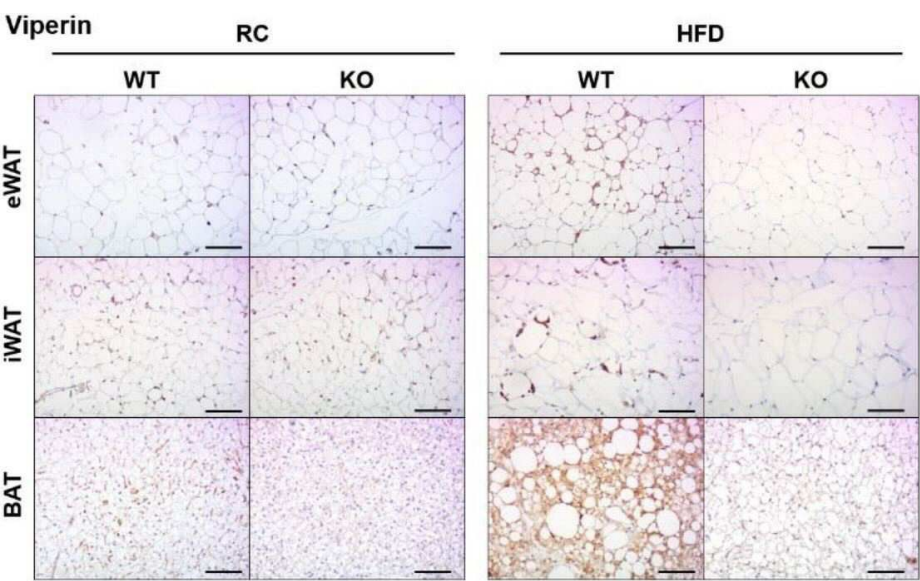




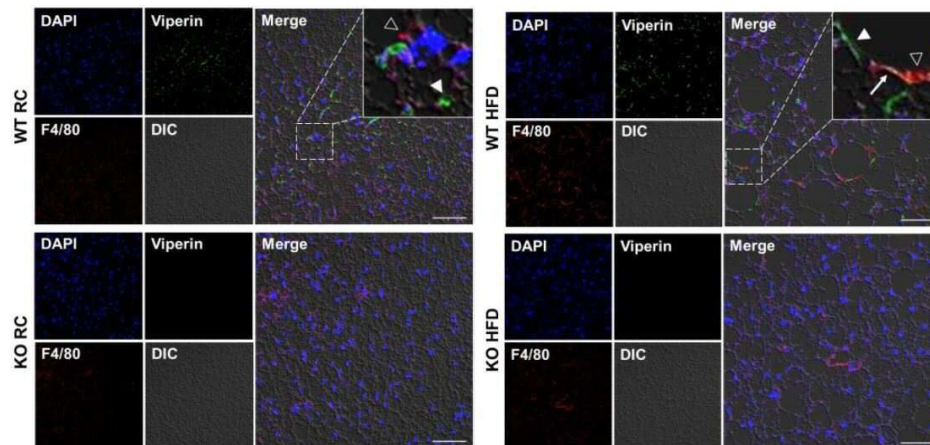
도면9b



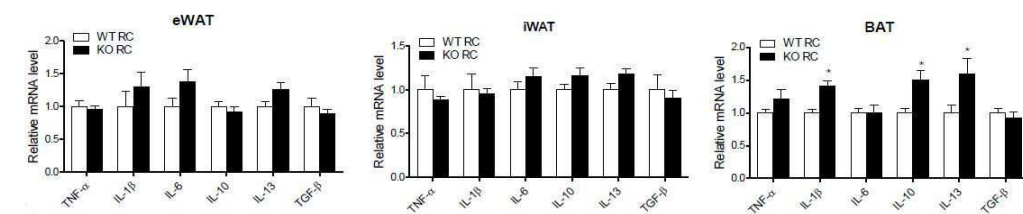
도면10a



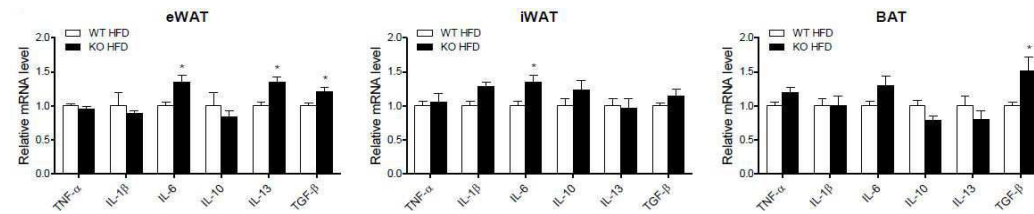
도면10b



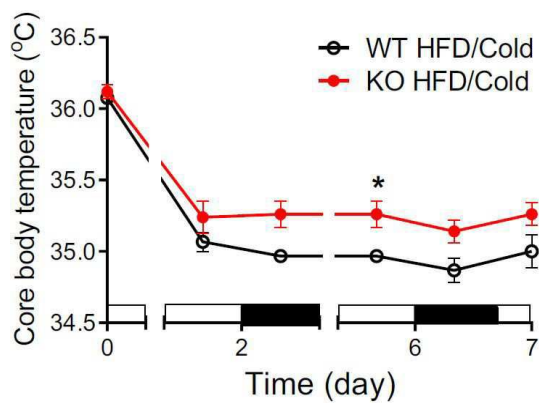
도면10c



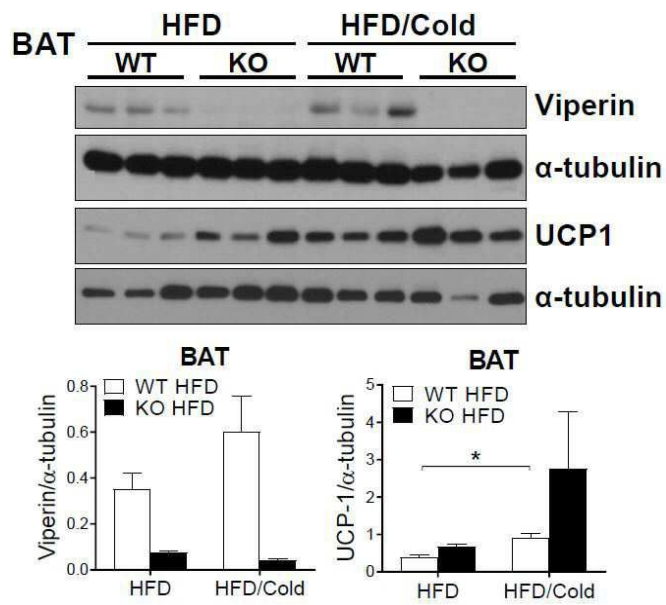
도면10d



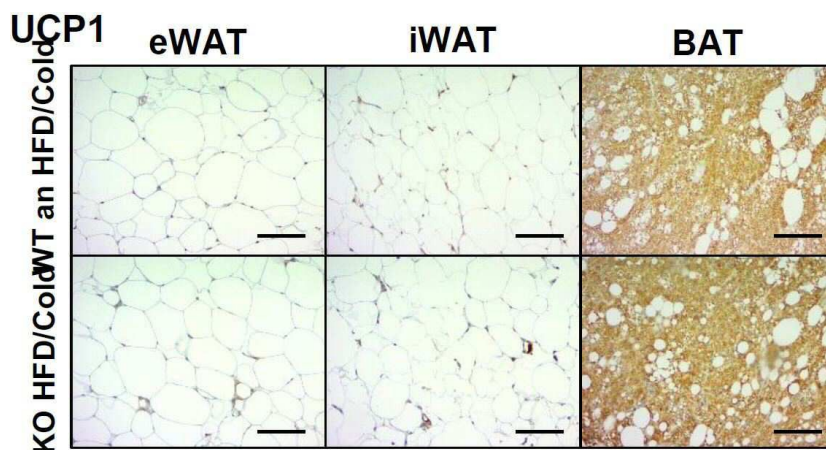
도면11a



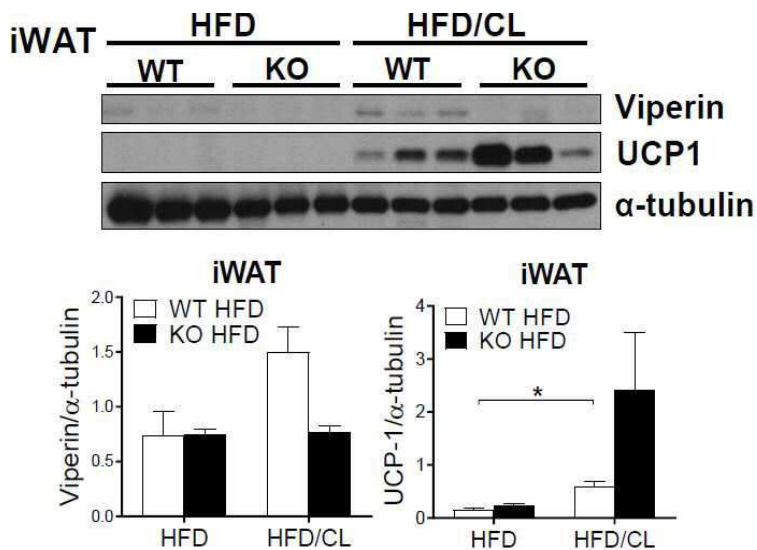
도면11b



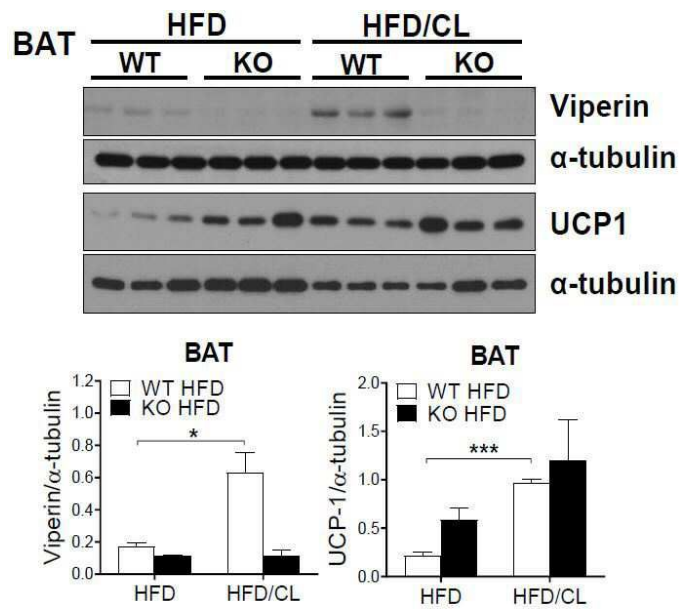
도면11c



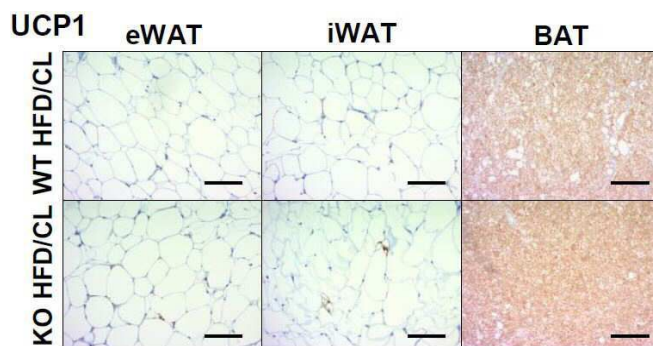
도면11d



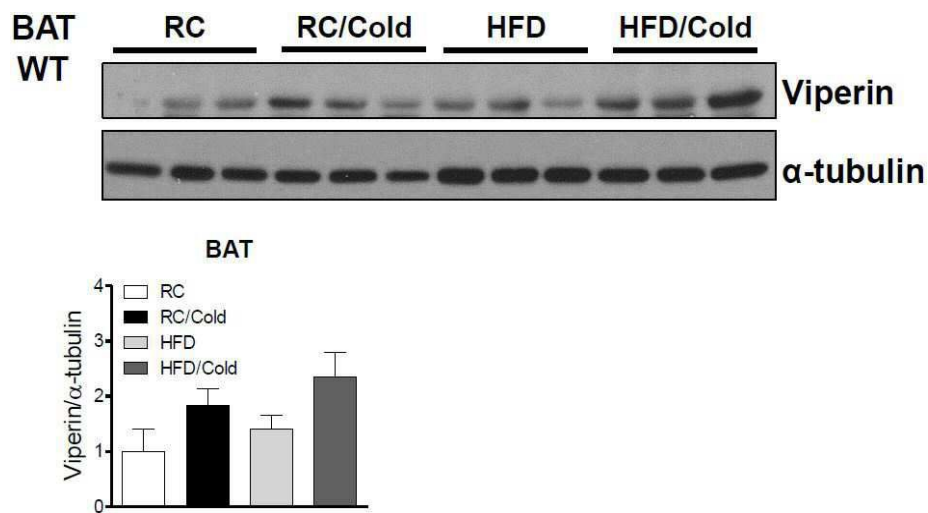
도면11e



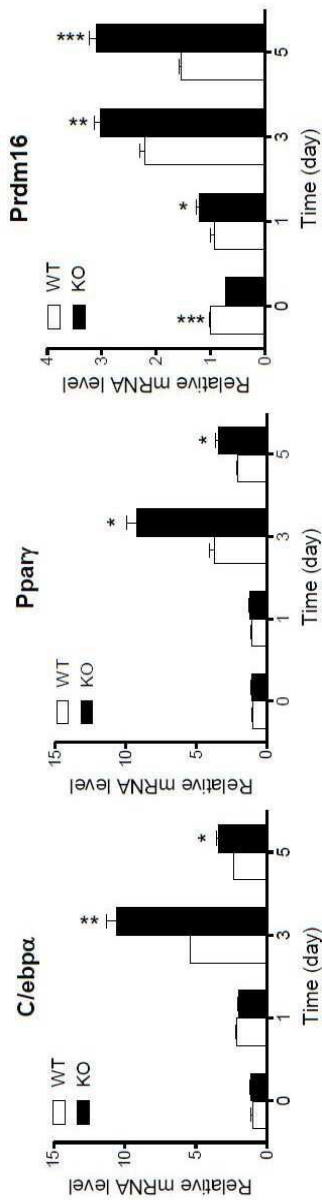
도면11f



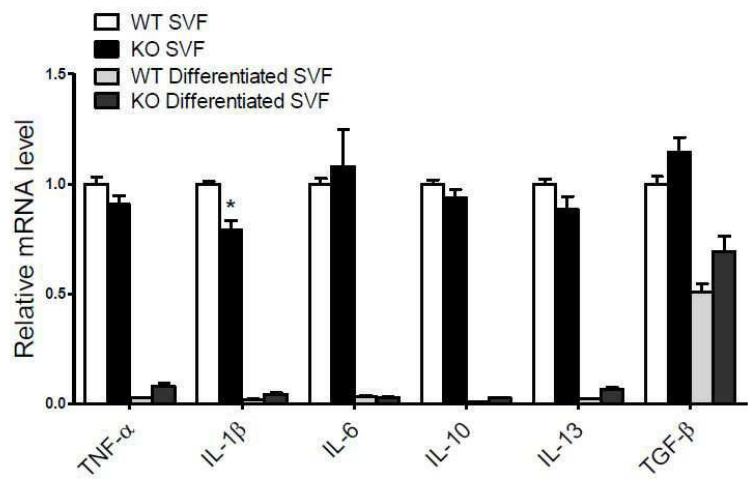
도면12



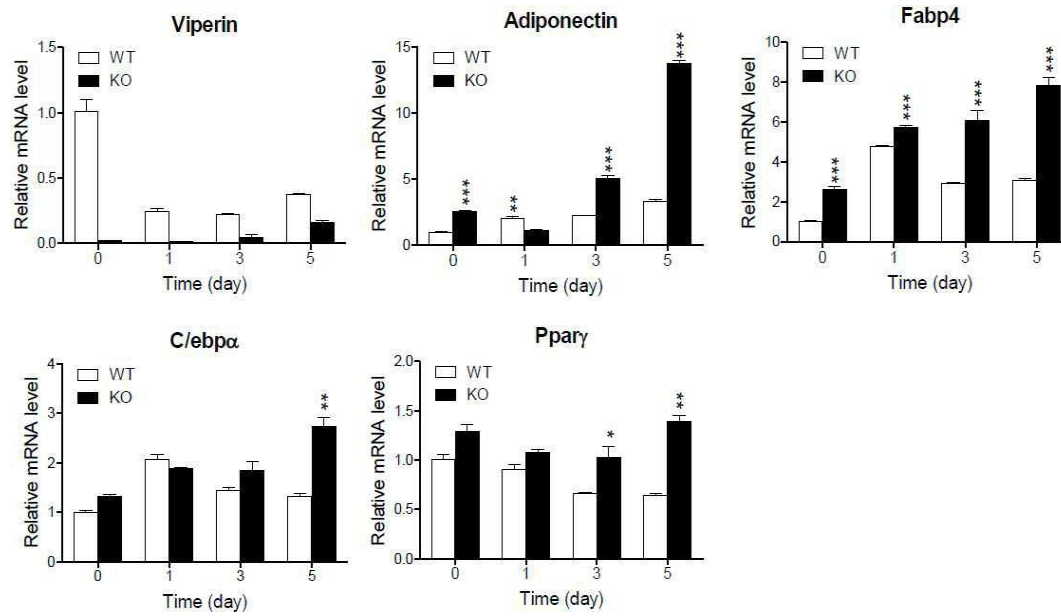
도면13a



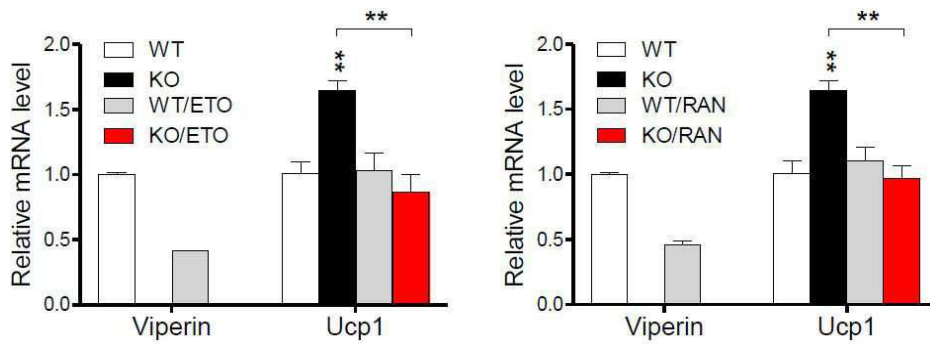
도면13b



도면14a



도면14b



## 서열 목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation Yonsei University
- <120> A Composition for Enhancing Thermogenesis In Vivo Comprising Viperin Inhibitors as Active Ingredients
- <130> HPC-8904
- <160> 38
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 19
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Viperin F primer
- <400> 1

gtgaatactt gggcaagct



<210> 2  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Viperin R primer

<400> 2  
 caaataactcc 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 tatcgcccag 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 gttcgagttt 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  
 cgtcagggtt gtagca 16  
 <210> 19  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> IL-6 F primer  
 <400> 19  
 cctctgggtct 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	
tggcgaaaca 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  
 ttctgatac 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