



Espacenet

KR20020095553A Pharmaceutical composition for prevention or treatment of obesity hyperlipidemia or fatty liver containing inhibitors of isocitrate dehydrogenase activity

Applicants: TG BIOTECH INC [KR]

Inventors: HUH TAE RIN [KR],KO HO JIN [KR],LEE SU MIN [KR],PARK JIN U [KR]

Classifications:

IPC **A61K31/19**; (IPC1-7): A61K31/19;

CPC **A61K31/194 (KR); A61P3/04 (KR); A61P3/06 (KR);**

Priorities: KR20010033599A 2001-06-14

Application: KR20010033599A-2001-06-14

Publication: KR20020095553A-2002-12-27

Published as: **KR100442322B1**; KR20020095553A

Pharmaceutical composition for prevention or treatment of obesity hyperlipidemia or fatty liver containing inhibitors of isocitrate dehydrogenase activity

Abstract

PURPOSE: A preventing or therapeutic agent for obesity, hyperlipidemia or fatty liver containing an isocitrate dehydrogenase activity inhibitor as an effective ingredient is provided which has excellent effects for reducing body weight and suppressing obesity and biosynthesis of neutral lipid and cholesterol. **CONSTITUTION:** This prophylactic or treating agent for obesity, hyperlipidemia or fatty liver contains oxalomalic acid, methylisocitric acid, oxaloacetate and glyoxylate as an isocitrate dehydrogenase activity inhibitor. This agent is administered to a patient at dosages in a preferred range of about 7mg to 70g per day as adult patient(70kg).



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호
(43) 공개일자

특2002-0095553
2002년12월27일

<p>(51) 국제분류코드 A61K 31/19 (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2001-0033599</p> <p>(22) 출원일자 2001년06월14일</p>	<p>(71) 출원인 주식회사 티지 바이오텍 서울 강동구 성내1동 452-2, 대한민국</p> <p>(72) 발명자 허태린 대구광역시수성구신매동시지동서아파트255동107호, 대한민국 고호진 대구광역시북구대현1동17-4번지, 대한민국 이수민 대구광역시수성구범어2동133-3번지, 대한민국 박진우 대구광역시남구봉덕3동미리내맨션6동302호, 대한민국</p> <p>(74) 대리인 이원희</p> <p>(77) 심사관 있음</p>
--	---

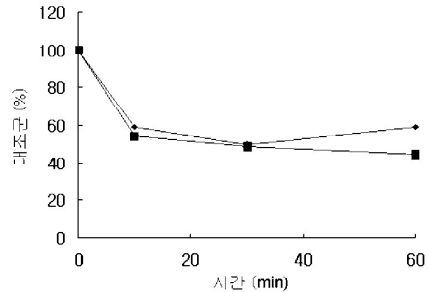
진체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 이소시트릭산 탈수소화효소 활성 저해제를 유효성분으로 포함하는 비만, 고지혈증 또는 지방간 예방 또는 치료제

(57) 요약

대표도 - 도 1

본 발명은 이소시트릭산 탈수소화효소(isocitrate dehydrogenase) 활성 저해제를 유효성분으로 포함하는 비만, 고지혈증 또는 지방간 치료제에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 옥살로 말릭산(oxalomalic acid), 메틸이소시트릭산(methylisocitric acid) 등을 포함한 이소시트릭산 탈수소화효소 활성 저해제를 유효성분으로 포함하는 비만, 고지혈증 또는 지방간 예방 또는 치료제에 관한 것이다. 본 발명의 이소시트릭산 탈수소화효소 활성 저해제를 유효성분으로 포함하는 예방 또는 치료제는 체중감소 효과, 비만 억제 효과, 생체 중성지방 및 콜레스테롤 저하 효과가 우수하며 따라서 비만, 고지혈증 또는 지방간의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.



키워드 : 이소시트릭산 탈수소화효소, 비만

청구의 범위

청구항 1

이소시트릭산 탈수소화효소 활성 저해제를 유효성분으로 함유하는 비만, 고지혈증 또는 지방간의 예방 또는 치료제.

청구항 2

제 1항에 있어서, 이소시트릭산 탈수소화효소 활성 저해제로 옥살로 말릭산을 포함하는 것을 특징으로 하는 예방 또는 치료제.

청구항 3

제 1항에 있어서, 이소시트릭산 탈수소화효소 활성 저해제로 메틸이소시트릭산을 포함하는 것을 특징으로 하는 예방 또는 치료제.

청구항 4

제 1항에 있어서, 이소시트릭산 탈수소화효소 활성 저해제로 옥살로 아세테이트와 글리옥실레이트를 포함하는 것을 특징으로 하는 예방 또는 치료제.

명세서

발명의 명칭

이소시트릭산 탈수소화효소 활성 저해제를 유효성분으로 포함하는 비만, 고지혈증 또는 지방간 예방 또는 치료제 {Pharmaceutical composition for prevention or treatment of obesity, hyperlipidemia or fatty liver containing inhibitors of isocitrate dehydrogenase activity} 도면의 간단한 설명

- [0001] 도 1은 이소시트릭산 탈수소화효소 활성 저해물질인 옥살로 말릭산과 메틸이소시트릭산을 처리한 지방세포에서의 효소활성 저해도를 나타낸 그래프이고,
- [0002] ◆ : 0.5mM 옥살로 말릭산, ■ : 0.5mM 메틸이소시트릭산,
- [0003] 도 2는 이소시트릭산 탈수소화효소 활성 저해물질인 옥살로 말릭산과 메틸이소시트릭산을 처리한 지방세포에서의 지방축적의 억제효과를 나타낸 그래프이고,
- [0004] 도 3의 A는 이소시트릭산 탈수소화효소 활성 저해물질인 옥살로 말릭산을 투여한 마우스(오른쪽)에서의 뒷목 부위의 지방 축적량을 정상 마우스(왼쪽)와 비교한 결과 사진이고,
- [0005] 도 3의 B는 이소시트릭산 탈수소화효소 활성 저해물질인 옥살로 말릭산을 투여한 마우스(오른쪽)에서의 복부의 지방 축적량을 정상 마우스(왼쪽)와 비교한 결과 사진이고,
- [0006] 도 3의 C는 이소시트릭산 탈수소화효소 활성 저해물질인 옥살로 말릭산을 투여한 마우스(오른쪽)에서의 복부의 지방 조직을 떼어 내어 정상 마우스(왼쪽)와 크기를 비교한 결과 사진이고,
- [0007] 도 3의 D는 이소시트릭산 탈수소화효소 활성 저해물질인 옥살로 말릭산을 투여한 마우스(오른쪽)에서의 피하조직의 지방 축적정도를 정상 마우스(왼쪽)와 비교한 결과 사진이고,
- [0008] 도 4는 이소시트릭산 탈수소화효소 활성 저해물질인 옥살로 말릭산을 투여한 마우스에서의 몸무게의 증가를 억제하는 효과를 나타낸 막대 그래프이고,
- [0009] 도 5는 이소시트릭산 탈수소화효소 활성 저해물질인 옥살로 말릭산을 투여한 마우스에서의 혈중 중성지방(트리글리세라이드)을 저하하는 효과를 나타낸 막대 그래프이고,
- [0010] 도 6은 이소시트릭산 탈수소화효소 활성 저해물질을 투여한 마우스에서의 혈중 콜레스테롤을 저하하는 효과를 나타낸 막대 그래프이다.

발명의 상세한 설명

- [0011] 본 발명은 이소시트릭산 탈수소화효소(isocitrate dehydrogenase) 활성 저해제를 유효성분으로 포함하는 비만, 고지혈증 또는 지방간 치료제에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 옥살로 말릭산(oxalomalic acid), 메틸이소시트릭산(methylisocitric acid) 등을 포함한 이소시트릭산 탈수소화효소 활성 저해제를 유효성분으로 포함하는 비만, 고지혈증 및 지방간 예방 또는 치료제에 관한 것이다.

- [0012] 이소시트릭산 탈수소화 효소는 에너지 대사를 위한 TCA(tricarboxylic acid) 회로의 주요 효소로서, 구연산을 산화적으로 탈탄산화시켜 α -케토글루타릭산(α -ketoglutaric acid)과 NADH 또는 NADPH 등을 생산하는 것으로 알려져 있다.
- [0013] 고등동물의 이소시트릭산 탈수소화 효소는 조효소(cofactor)의 종류와 세포 내 존재 위치에 따라, 미토콘드리아 NAD⁺-특이적 이소시트릭산 탈수소화 효소(이하, 'IDH'로 약칭함), 세포질 NADP⁺-특이적 이소시트릭산 탈수소화 효소(이하, 'IDPc'로 약칭함) 및 미토콘드리아 NADP⁺-특이적 이소시트릭산 탈수소화 효소(이하, 'IDPm'으로 약칭함)의 3종류의 동위효소(isozyme)로 나뉜다.
- [0014] 이들 중 IDH는 TCA 회로 내에서 이소시트릭산을 탈탄산화시킴으로써 NADH와 α -키토글루타레이트를 생성하는데, 이들은 전자전달계를 통한 에너지 대사 뿐 아니라, 글루타민산, 글루타민, 아르기닌 및 프롤린 등의 아미노산 생합성 또는 다른 생체 대사물질들을 합성하는 중간대사 산물이므로, 에너지 대사, 단백질 생합성 및 질소 대사를 위한 TCA 회로의 중요한 조절효소로 작용하게 된다.
- [0015] IDPm 및 IDPc들은 효소활성 면에서 강한 조직특이성을 보여주어 심장조직에서는 NADP⁺-특이적 이소시트릭산 탈수소화효소의 전체 효소 활성 중 90% 이상이 미토콘드리아에 존재하고 10% 정도가 세포질에 존재하며, 이와 반대로 간조직에서는 3% 만이 미토콘드리아에 존재하고 나머지 97% 정도가 세포질에 존재한다고 알려져 있다(Plaut, G.W.E, Current Topics in Cell Regulation, 2, 1-27, 1983).
- [0016] 이소시트릭산 탈수소화효소의 동위효소들은 그 구조적인 특징만이 일부 밝혀졌을 뿐 기능은 거의 규명되어 있지 않은데, 특히 IDPc와 IDPm의 정확한 작용기작에 대한 연구는 전혀 이루어져 있지 않다.
- [0017] 한편, 고등동물에 있어서 지방의 축적은 하기의 과정에 따라 이루어진다. 즉, 체내에 에너지가 과다하면 백색 지방 조직(white adipose tissue)의 수와 크기가 늘어나는 지방세포의 분화가 촉진되어 지방질의 축적이 증가되게 되고, 이에 따른 백색지방조직에서 ob 유전자의 발현이 증가되어 체내에 렙틴(leptin) 농도의 증가가 나타나게 되며 이에 의해 뇌의 호르몬 작용을 변화시켜 식욕을 저하시키게 되고, 한편으로는 과다하게 섭취된 칼로리를 UCP(uncoupler protein)들에 의해서 체온으로 발산하는 기작을 거치게 된다. 백색 지방 조직에서는 지방세포 분화의 주요 전사인자(master transcription factor)들로 알려져 있는 PPAR γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ), C/EBP α 및 ADD1/SREBP1 등의 유전자 발현이 촉진되어 지방세포 분화 및 지방 축적이 증가되며, 체내의 과다한 에너지가 지방의 형태로 저장하게 되므로 체내의 에너지 균형을 조절하게 된다(Hu, E. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995, 92, 9856-9860; Keller, H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 20, 9856-9860; Freytag, S.O. et al., Genes Dev., 1994, 8, 1654-1663; Tontonoz, P. et al., Mol. Cell. Biol., 1993, 13, 4753-4759; Spiegelman, B.M., Cell, 1996, 87, 377-389). 지방세포 분화의 주 전사인자인 PPAR γ 의 활성화에 필요한 생체 내 리간드(ligand)로 작용하는 물질로서는 지방산의 일종인 리놀린산(linoleic acid), 도코사헥사논산(docosahexaenoic acid, DHA)와 아라키돈산(arachidonic acid)등의 다중 불포화 지방산들(Krey, G. et al., Mol. Endocrinol., 1997, 11, 779-791; Yu et al., J. Biol. Chem., 1995, 270, 23975-23983)과 함께 프로스타글란딘 J2(prostaglandin J2)(Forman B. M. et al., Cell, 1995, 83, 803-812; Kliewer. S. A. et al., Cell, 1995, 83, 813-819)가 알려져 있다.

- [0018] 본 발명자들은 이소시트릭산 탈수소화효소의 유전자 발현 및 효소의 증가, 그리고 이로 인한 효소반응 생성물인 NADPH들의 증가가 지방의 축적을 증가시켜 비만과 지방간을 유발하며, 이와 동시에 혈액중의 중성지질(triglyceride) 및 콜레스테롤(cholesterol)의 양도 증가시킴을 확인하였다(대한민국 특허출원 2000-0061962). 이에, 본 발명자들은 이소시트릭산 탈수소화효소 활성 저해제인 옥살로 말릭산과 메틸이소시트릭산을 지방세포 및 생쥐에 투여하여 체중감소효과 및 비만 억제효과, 생체 중성지질 및 콜레스테롤 저하 효과가 우수함을 확인하고 이소시트릭산 탈수소효소 활성 저해제를 비만, 고지혈증 또는 지방간의 예방 또는 치료제로 사용할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [0019] 본 발명의 목적은 이소시트릭산 탈수소화효소 활성 저해제를 유효성분으로 포함하는 체중 감소 효과, 비만억제 효과, 생체 중성지질 및 콜레스테롤 저하 효과가 우수한 비만, 고지혈증 또는 지방간 예방 또는 치료제를 제공하는 것이다.
- [0020] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 이소시트릭산 탈수소화효소 활성 저해제를 유효성분으로 하는 비만, 고지혈증, 또는 지방간의 예방 또는 치료제를 제공한다.
- [0021] 또한, 본 발명은 옥살로 말릭산 또는 메틸이소시트릭산을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 비만, 고지혈증 또는 지방간의 예방 또는 치료제를 제공한다.
- [0022] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0023] 본 발명은 이소시트릭산 탈수소화효소 활성 저해제를 유효성분으로 하는 비만, 고지혈증, 또는 지방간의 예방 또는 치료제를 제공한다.
- [0024] 본 발명자들은 이소시트릭산 탈수소화효소의 이소자임인 IDPc 유전자를 포함한 세포질내 NADPH 생성 이소시트릭산 탈수소화효소 유전자 발현의 증가 및 효소활성의 증가 그리고 NADPH의 증가는 지질 및 콜레스테롤의 생합성에 관여하는 여러 효소 반응들을 촉진하여 주며, 이와 함께 지질성분의 증가를 통한 지질단백질의 합성도 증가시켜 지질단백질과 결합된 형태로 존재하는 생체 콜레스테롤 복합체의 생성량도 증가시킨다는 것을 확인하였다(대한민국 특허출원 2000-0061962).
- [0025] 또한, 본 발명은 옥살로 말릭산 또는 메틸이소시트릭산을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 비만, 고지혈증 또는 지방간의 예방 또는 치료제를 제공한다.
- [0026] 옥살로 말릭산은 생체 내에서 TCA 회로의 중간체인 옥살로 아세테이트와 글리옥실레이트 회로의 중간체인 글리옥실레이트의 알돌축합반응에 의해 생성되어 이소시트릭산 탈수소화효소의 활성을 특이적으로 저해하며 메틸이소시트릭산은 기질인 이소시트릭산과 경쟁적으로 이소시트릭산 탈수소화효소를 강력하게 저해한다.
- [0027] 상기의 옥살로 말릭산과 메틸이소시트릭산을 지방세포에 첨가하면 이소시트릭산 탈수소화효소 활성이 각각 30분과 1시간만에 50% 정도 저하된다(도 1). 또한 지방전구세포(preadipocyte)에 처리시 지방세포로의 분화가 억제되며 또한 생성된 지방세포에 지방의 축적량도 억제된다(도 2). 상기의 경우에 옥살로 말릭산과 메틸이소시트릭산의 농도는 0.1 μM~100 mM의 범위가 적합하고 바람직하게는 10 μM~5 mM의 범위가 최적이다.
- [0028] 이소시트릭산 탈수소화효소 활성 저해제가 비만 억제 및 중성지방과 콜레스테롤 저하에 높은 효과를 보임을 생쥐 실험을 통해 확인하였다. 이는 복부지방의 증가와 체내 지질 축적량을 측정하는 등 하기의 몇 가지 지표의 측정을 통해 확인한다.

- [0029] 본 발명자들은 생쥐에 14주 동안 옥살로 말릭산과 메틸이소시트릭산을 체중 1 kg 당 25 mg 씩 일주일에 3회 복강 주사로 투여하였다. 그 결과 생리식염수를 복강 투여한 대조군 생쥐에 비해 체중이 10% 이상 감소하였다(도 4). 상기의 생쥐를 해부하였을 때 복부 지방조직(epididymal fat pad)의 크기가 매우 작아졌음을 확인할 수 있었으며 지방조직의 중량으로는 약 5배 감소되었다. 또한, 결피부를 제거한 후 등쪽 모습도 이소시트릭산 탈수소화효소 활성 저해제를 처리한 생쥐의 비만조직의 양이 많이 감소하였음을 볼 수 있었다(도 3). 또한 피하조직의 지방축적정도를 탐색하기 위하여 복부피하조직을 횡단면으로 절취한 다음 통상적인 고정절차 및 탈수과정을 거친 후 파라핀으로 조직을 포매하여 관찰하여 보면 복부피하 침윤정도를 대조군과 비교해 보면 이소시트릭산 탈수소화효소 저해제가 체중감소와 세포내 지방의 축적량을 감소시키는데 중요한 작용을 하고 있음을 확인할 수 있다(도 3).
- [0030] 본 발명자들은 상기의 옥살로 말릭산과 메틸이소시트릭산 등의 이소시트릭산 탈수소화효소 활성 저해제가 체내 지질과 콜레스테롤에 어떠한 영향을 미치는지 확인해 보았다. 상기의 이소시트릭산 탈수소화효소 활성 저해제인 옥살로 말릭산과 메틸이소시트릭산을 투여한 생쥐의 혈청(serum)을 분리하여 중성지질 및 총 콜레스테롤의 양을 측정된 결과 대조군 생쥐에 비하여 각각 50% 와 30% 정도 감소하였다(도 5, 6).
- [0031] 상기한 바와 같이 이소시트릭산 탈수소화효소 활성 저해제는 체중 감소의 효과와 아울러 체내 지방 축적을 효과적으로 억제하며 콜레스테롤의 생합성을 억제하여 생체 콜레스테롤 복합체의 생성량도 저하시킴을 확인할 수 있다.
- [0032] 본 발명의 이소시트릭산 탈수소화효소 활성 저해제를 유효성분으로 하는 비만, 고지혈증 또는 지방간의 예방 또는 치료제의 유효 투여량은 통상적으로 평균 성인 환자(70kg)에 대해 1일 당 약 7 mg 내지 70 g의 범위이다.
- [0033] 본 발명의 이소시트릭산 탈수소화효소 활성 저해제를 유효성분으로 하는 비만, 고지혈증 또는 지방간의 예방 또는 치료제의 구체적인 투여량은 연령, 체중, 증상, 치료대상이 되는 질병, 투여경로, 치료기간 등에 따라 결정된다. 즉 의사가 각 환자에 대하여 가장 적합한 실질 투여량을 결정할 것이며, 그 환자의 연령, 체중, 증상 및 치료대상이 되는 질병등에 따라 실질 투여량은 달라질 수 있다. 따라서 투여량이 상기 언급된 범위보다 작거나 클 수도 있으며, 이러한 모든 투여량은 본 발명의 범위내에 속한다.
- [0034] 본 발명의 이소시트릭산 탈수소화효소 활성 저해제를 유효성분으로 하는 비만, 고지혈증 또는 지방간의 예방 또는 치료제는 단독으로 투여될 수도 있지만, 일반적으로 목적된 투여경로 및 표준 약학적 관행에 있어서 선택된 약학적 허용가능한 담체, 또는 희석제와 혼합되어 투여된다. 이러한 본 발명의 비만, 고지혈증 또는 지방간의 예방 또는 치료제의 투여는 고형 제형, 액체 제형 또는 다른 제형과 같은 경구 투여용 형태, 주사액, 도포제 또는 좌약 등과 같은 비경구 투여용 형태로 이루어질 수 있다. 또한 본 발명의 비만, 고지혈증 또는 지방간의 예방 또는 치료제는 1일 1회 내지 수회 투여될 수 있다.
- [0035] 본 발명의 이소시트릭산 탈수소화효소 활성 저해제를 유효성분으로 하는 비만, 고지혈증 또는 지방간의 예방 또는 치료제는 경구 또는 비경구 투여를 통해 전신적으로 또는 국소적으로 투여될 수 있다. 예를 들면, 정제, 환제, 과립제, 캡슐제, 액제, 에멀전, 현탁액, 시럽제 등의 형태로 경구투여된다. 비경구적 방법으로 투여되는 경우에는, 예를 들면 주사제의 경우에는 정맥내, 근육내 또는 피하내로 주사될 수 있다. 예를 들면 팻치, 연고 또는 외용제의 형태로 피부에 적용되어 경피투여될 수 있고, 좌약 형태로 직장 내에 투여될 수 있다. 전형적인 경구투여용 고체 제형으로서는 산제, 정제, 환제, 과립제, 캡슐제 등이 있으며, 여기서 활성성분들은 당해 기술분야에서 통상적으로 사용되는 하나 이상의 불활성 희석제(예, 전분, 셀룰로오스, 락토오스, 카올린 등)와 혼합되며, 임의의 윤활제, 결합제, 붕해제, 안정화제 등과 혼합될 수 있다.

전형적인 경구투여용 액체 제형으로서는 약학적 허용액, 에멀전, 현탁액, 시럽제, 엘릭서 등이 있으며, 여기서 활성성분들은 당해 기술분야에서 통상적으로 사용되는 하나 이상의 불활성 희석액(예, 정제수, 에탄올 등)중에 포함되며, 임의의 감미제, 방향제, 보존제 등과 혼합될 수 있다. 전형적인 비경구투여용 주사제로는 무균 용액, 에멀전, 현탁액 등이 있으며, 여기서 활성성분들은 당해 기술분야에서 통상적으로 사용되는 하나 이상의 불활성 수성 희석액(예, 주사용 증류수, 생리적 식염수 등) 또는 불활성 비수성 희석액(예, 폴리에틸렌글리콜, 프로펠렌글리콜, 에탄올 등)과 혼합되며, 임의의 등장제, 완충제, 방부제, 안정화제 등과 혼합될 수 있다. 상기 예시된 제형의 형태들은 공지의 방법으로 제조될 수 있다.

[0036] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

[0037] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0038] <실시예 1> 이소시트릭산 탈수소화효소 활성 저해제를 처리한 지방세포에서의 이소시트릭산 탈수소화 효소활성 측정

[0039] NIH3T3-L1 preadipocyte 세포주에 옥살로 말릭산과 메틸이소시트릭산을 각각 0.5 mM 로 처리하여 10분, 30분, 1시간 배양한 후 세포를 회수하여 이소시트릭산 탈수소화효소활성을 측정하였다. 3×10^7 개의 세포를 1X 인산염 완충용액으로 2번 세척한 후, 수크로오즈 완충용액(0.32 M sucrose, 0.01 M Tris-Cl, pH 7.4)을 이용하여 파쇄하였다. 이를 1,000 g로 원심분리하여 세포 찌꺼기를 제거하고, 다시 15,000 g로 원심분리하여 상등액의 세포질 부분과 침전물인 미토콘드리아 부분을 분리하였다. 세포질 분획인 상등액에 전체 용액의 1/10 부피로 0.1% 트리톤 (Triton) X-100이 포함된 인산염 완충용액을 첨가하고 브래드포드 방법(Bradford assay)를 통하여 정량하였으며, 효소 활성 측정은 25°C의 완충용액(50 mM MOPS, pH 7.2, 35.5 mM triethanolamine, pH 7.2, 2 mM NADP⁺, 2 mM MgCl₂, 5 mM isocitrate, 1 µg/ml rotenone)에서 반응시켜 수행하였다. 반응이 끝난 후 340 nm에서 2분간 비색계에서 흡광도의 변화를 측정하여 1분간 1 µM의 NADPH를 생성하는 효소의 양을 1 unit로 하여 효소의 활성을 나타내었다.

[0040] 그 결과, 대조군 세포는 1시간 동안 이소시트릭산 탈수소화효소 활성의 변화가 없는데 반하여 옥살로 말릭산과 메틸이소시트릭산을 처리한 세포는 약 50%의 이소시트릭산 탈수소화효소 활성의 감소가 확인되었다(표 1, 도 1).

[0041]

처리 시간	효소활성 저해도(%)	
	옥살로 말릭산	메틸이소시트릭산
0분	100%	100%
10분	59.1%	54.1%
30분	50%	48.6%
60분	59.1%	44.5%

[0042] <실시예 2> 이소시트릭산 탈수소화 효소 활성 저해제를 처리한 지방세포에서의 지방 합성량 확인

[0043] 이소시트릭산 탈수소화효소 활성 저해제가 지방 합성에 미치는 영향을 확인하기 위하여, NIH3T3-L1 세포주를 10%의 소 태아 혈청(fetal bovine serume, FBS)가 포함된 DMEM에 5 µg/ml 농도의 인슐린, 0.5 mM 3-이소부틸-1-메틸크산틴(3-isobutyl-1-

methylxanthine, IBMX, Sigma), 1 μM 덤사메타손(dexamethasone, DEX), 페니실린-스트렙토마이신(Gibco BRL)을 각각 1 리터 당 50,000 U씩 첨가하며 배양하며 세포의 밀도가 약 3×10^4 세포/cm²에 도달할 때까지 이틀간 지방세포의 분화를 촉진시켰다. 그 이후 다시 상기의 배지에서 IBMX와 DEX를 제거시킨 배지를 이용하여 이틀마다 배지를 갈아주며 10일간 계속 배양하였다. 세포배양은 CO₂ 배양기 내에서 5% CO₂, 37°C의 습윤상태로 실시하였다. 배양이 끝난 후 지방세포 내 형성된 지방을 특이적으로 염색하는 오일 레드 오(Oil Red O)를 처리하여 지방세포 내에 형성된 지방 알갱이의 수와 지방축적정도를 관찰하였다.

- [0044] 오일 레드 오 염색은 세포가 배양되고 있는 플레이트에서 배지를 버리고, 고정용액(cacodylate buffer, 90 mM cacodylate, pH 7.2, 2% formaldehtde, 2.5% glutarardehyde, 0.025% CaCl₂, 5% sucrose)을 10 ml 첨가한 다음, 4°C에서 1시간 동안 방치한 뒤 제거하고 다시 40% 이소프로판올(isopropanol)에 용해되어 있는 오일 레드 오 용액을 5 ml 첨가하여 1시간 동안 천천히 혼합한 다음 40% 이소프로판올로 세척함으로써 수행하였다.
- [0045] 그 결과 도 2에서 보듯이, 이소시트릭산 탈수소화효소 활성 저해제가 처리된 세포에서는 대조군에 비해 지방의 생성이 감소됨을 확인할 수 있다(도 2). 상기 결과는 이소시트릭산 탈수소화효소 활성 저해제가 세포 내 지방의 축적량을 감소시키는데 중요한 작용을 하고 있음을 의미한다.
- [0046] <실시에 3> 이소시트릭산 탈수소화효소 활성 저해제에 의한 생쥐의 체중, 체내 지질, 콜레스테롤 증가 조사
- [0047] <3-1> 이소시트릭산 탈수소화효소 활성 저해제에 의한 체중의 변화 조사
- [0048] 생쥐에 14주 동안 옥살로 말릭산과 메틸이소시트릭산을 체중 1 kg 당 25 mg 씩 일주일에 3회 복강 주사로 투여하였다. 그 결과, 생리식염수를 복강 투여한 대조군 생쥐대조군 생쥐에 비해 체중이 10% 이상 감소하였으며 이를 해부하였을 때 복부 지방 조직(epididymal fat pad)의 크기가 매우 작아졌음을 확인할 수 있었으며 지방조직의 중량으로는 약 5배 감소되었다. 또한, 갈피부를 제거한 후 등쪽 모습도 이소시트릭산 탈수소화효소 저해제를 처리한 생쥐의 비만조직의 양이 많이 감소하였음을 볼 수 있었다. 피하조직의 지방축적정도를 탐색하기 위하여 복부피하조직을 횡단면으로 절취한 다음 10% 중성포르말린 용액으로 고정을 하고 통상적인 고정절차 및 탈수과정을 거친 후 파라핀으로 조직을 포매하였다. 포매한 조직을 4 μm의 두께로 조직 절편을 하여 헤마톡실린 및 에오신으로 염색을 실시한 다음 광학현미경으로 관찰하여 복부피하 침윤정도를 대조군과 비교하였다(도 3).
- [0049] 또한, 이소시트릭산 탈수소화효소 활성 저해제를 투여한 생쥐와 정상 생쥐의 체중을 측정하기 위하여, 동물체중 측정용 저울의 영점을 조절한 후 생쥐를 가만히 올려놓은 후 표시되는 무게를 생쥐 체중으로 측정하였다(표 2, 도 4).

		몸무게 증가량(g)
	대조군	22.19 ± 1.11 g
	옥살로 말릭산 처리군	17.17 ± 1.9 g

- [0051] <3-2> 이소시트릭산 탈수소화효소 활성 저해제에 의한 혈중 중성지질 및 총 콜레스테롤 농도 측정
- [0052] 중성지질 및 총 콜레스테롤 농도의 측정은 아산제약 주식회사에서 나온 측정

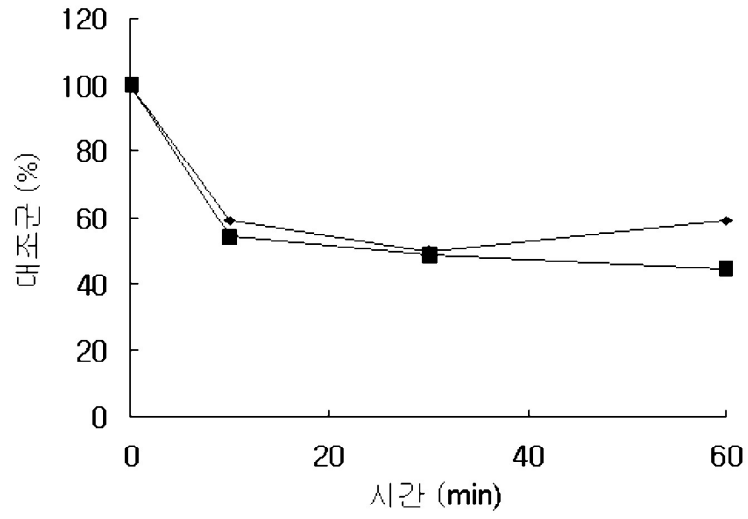
용 키트들을 각각 사용하였다. 이소시트릭산 탈수소화효소 활성 저해제를 투여한 생쥐와 정상 생쥐에서 혈액을 채취하여 원심분리하여 혈청(serum)을 확보하였다. 확보한 혈청 10 μ l에 1.5 ml의 중성지질 측정 키트액(리포푸로테인리파제 10800 U, 글리세롤키나제 5.4 U, 피옥시다제 13,5000 U, L- α -글리세로 인산옥시다제 160 U를 72 ml의 N,N-비스(2-하이드록시에틸)-2-아미노메탄설폰산 완충액에 녹인 용액) 또는 1.5 ml의 콜레스테롤 효소측정 키트액(효소액 (콜레스테롤에스테라제 20.5 KU/l, 콜레스테롤옥시다제 10.7 KU/l, 수산화나트륨 1.81 g/l)과 완충액 (인산일칼륨 13.6 g/l, 페놀 1.88 g/l)을 1:1로 섞은 용액)을 섞은 후 37°C에서 5분간 반응시키고 마이크로 플레이트 분석기(microplate reader)에서 콜레스테롤은 500 nm, 중성지질은 540 nm에서 각각 흡광도를 측정하여 중성지질 및 총 콜레스테롤의 혈중 농도를 측정하였다. 중성지질 및 콜레스테롤의 정량 환산은 이들의 표준물질 용액에 대하여 상기의 동일한 방법을 적용한 후 얻어진 표준 농도곡선을 이용하여 실시하였다.

[0053] 그 결과 복부 지방조직의 무게는 대조군에 비해 약 5배가 감소하였다(도 3). 한편, 혈액의 혈청 중에 중성지질 및 총 콜레스테롤의 양은 이소시트릭산 탈수소화효소 저해제를 투여한 생쥐에서 정상 생쥐에 비하여 각기 50% 및 30% 감소하였다(표 3, 도 5, 6).

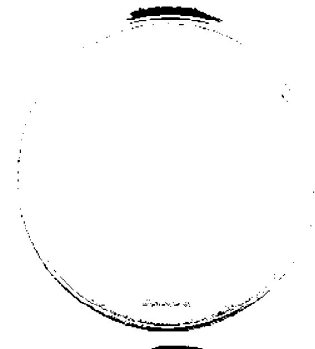
[0054]

	트리글리세라이드 (mg/dl)	총 콜레스테롤 양 (mg/dl)
대조군	147.6 \pm 8	214.23 \pm 13.5
옥살로 말릭산 처리군	70.07 \pm 4.9	148.74 \pm 6.6

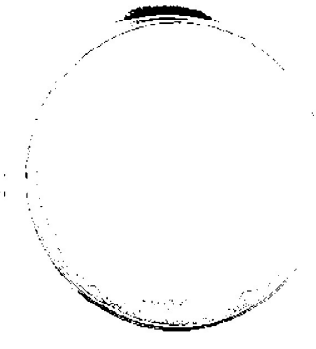
[0055] 상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 이소시트릭산 탈수소화효소 활성 저해제를 유효성분으로 하는 비만, 고지혈증 또는 지방간의 예방 또는 치료제는 체중감소 효과, 비만억제 효과, 생체 중성지질 및 콜레스테롤 생합성 억제효과가 우수하며 따라서 비만, 고지혈증 또는 지방간의 예방 또는 치료제에 유용하게 사용될 수 있다.



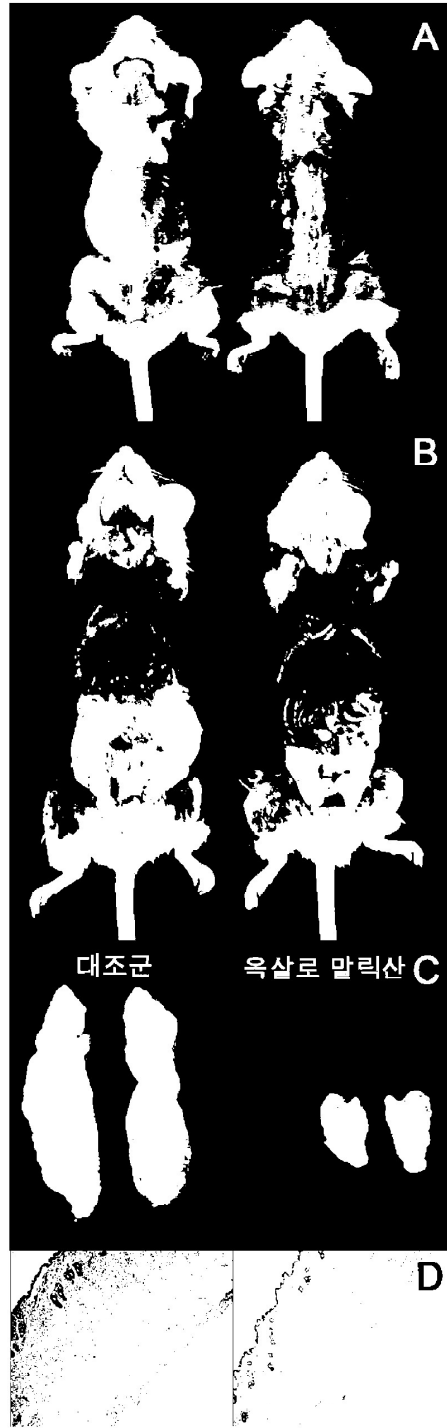
대조군

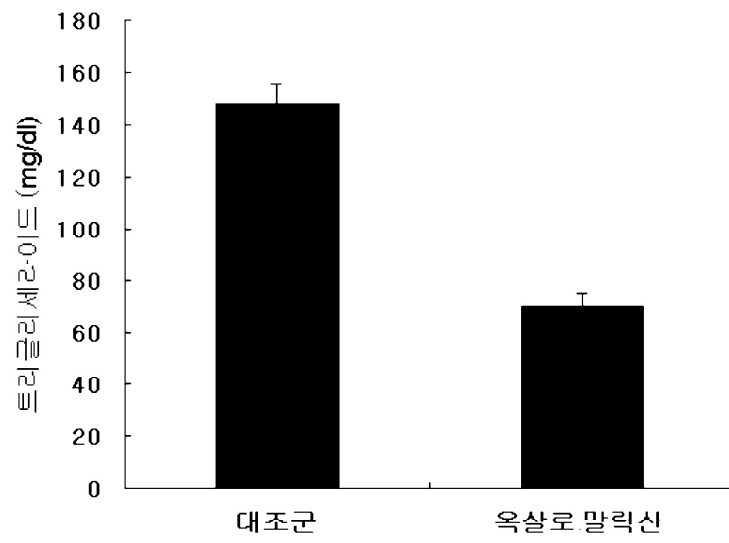
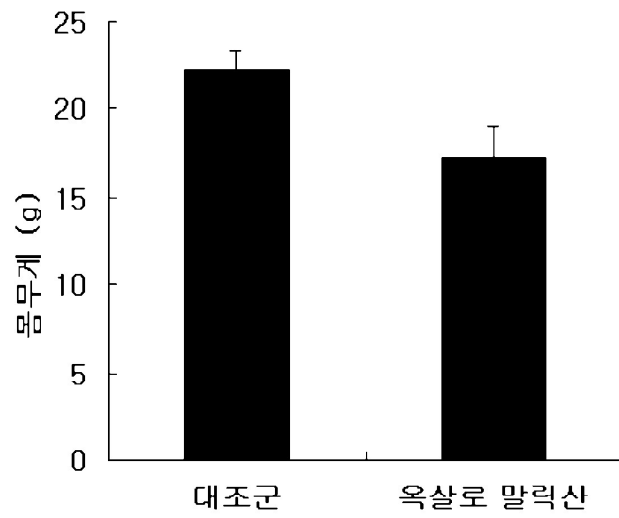


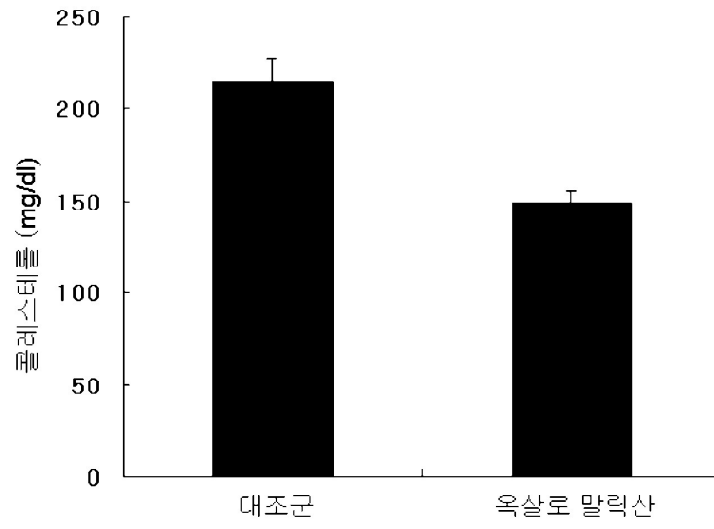
0.5 mM 옥살로 말릭산



0.5 mM 메탈이소시트릭산







Notice

This translation is machine - generated. It cannot be guaranteed that it is intelligible, accurate, complete, reliable or fit for specific purposes. Critical decisions, such as commercially relevant or financial decisions, should not be based on machine - translation output.

DESCRIPTION KR100442322B1

11 Obesity, hyperlipidemia or fatty liver prevention or treatment comprising an isocitrate dehydrogenase activity inhibitor as an active ingredient {Pharmaceutical composition for prevention or treatment of obesity, hyperlipidemia or fatty liver containing inhibitors of isocitrate dehydrogenase activity}

[1]

18 1 is a graph showing the degree of inhibition of enzyme activity in adipocytes treated with oxalo malic acid and methyl isocitric acid, which are isocitric acid dehydrogenase activity inhibitors;

[2]

24 ◆ : 0.5mM oxalomalic acid, ■ : 0.5mM methylisocitric acid,

[3]

28 2 is a graph showing the inhibitory effect of fat accumulation in adipocytes treated with oxalo malic acid and methyl isocitric acid, which are isocitric acid dehydrogenase activity inhibitors;

[4]

34 3A is a photograph of the result of comparing the amount of fat accumulation in the back neck region in mice (right) administered with oxalomalic acid, an isocitric acid dehydrogenase activity inhibitor, with that of normal mice (left),

[5]

40 3B is a photograph of the result of comparing the amount of abdominal fat accumulation in mice (right) administered with oxalomalic acid, an isocitric acid dehydrogenase activity inhibitor, with that of normal mice (left),

[6]

46 3C is a photograph of the result of comparing the size of the abdominal adipose tissue from a mouse (right) administered with oxalomalic acid, an isocitric acid dehydrogenase activity inhibitor, with a normal mouse (left),

[7]

52 3D is a photograph of the result of comparing the degree of fat accumulation in the subcutaneous tissue in a mouse (right) administered with oxalomalic acid, an isocitric acid dehydrogenase activity inhibitor, with that of a normal mouse (left),

[8]

58 4 is a bar graph showing the effect of inhibiting the increase in body weight in mice administered with oxalo malic acid, an isocitric acid dehydrogenase activity inhibitor;

[9]

63 5 is a bar graph showing the effect of lowering blood triglycerides (triglycerides) in mice administered with oxalo malic acid, an isocitric acid dehydrogenase activity inhibitor;

[10]

69 6 is a bar graph showing the effect of lowering blood cholesterol in mice administered with an isocitrate dehydrogenase activity inhibitor.

[11]

74 The present invention relates to a therapeutic agent for obesity, hyperlipidemia or fatty liver comprising an isocitrate dehydrogenase activity inhibitor as an active ingredient, and more particularly, oxalomalic acid, methyl isocitric acid It relates to a preventive or therapeutic agent for obesity, hyperlipidemia and fatty liver comprising an isocitric acid dehydrogenase activity inhibitor, including (methylisocitric acid), as an active ingredient.

[12]

⁸³ Isocitric acid dehydrogenase is a major enzyme in the tricarboxylic acid (TCA) cycle for energy metabolism. It oxidatively decarboxylates citric acid to produce α - ketoglutaric acid and NADH or NADPH. is known to do

[13]

⁸⁹ The isocitrate dehydrogenase of higher animals is a mitochondrial NAD⁺ - specific isocitrate dehydrogenase (hereinafter abbreviated as 'IDH'), cytoplasmic NADP⁺, depending on the type of cofactor and its location in the cell. - specific isocitrate dehydrogenase (hereinafter abbreviated as 'IDPc') and mitochondrial NADP⁺ - specific isocitrate dehydrogenase (hereinafter abbreviated as 'IDPm') of three isoenzymes (isozymes).

[14]

⁹⁸ Among them, IDH produces NADH and α - chitoglutarate by decarboxylating isocitric acid within the TCA cycle, which not only metabolizes energy through the electron transport system, but also biosynthesis of amino acids such as glutamic acid, glutamine, arginine and proline, or As it is an intermediate metabolite for synthesizing other biological metabolites, it acts as an important regulator of the TCA cycle for energy metabolism, protein biosynthesis, and nitrogen metabolism.

[15]

¹⁰⁷ IDPm and IDPc show strong tissue specificity in terms of enzymatic activity. In cardiac tissue, more than 90% of the total enzymatic activity of NADP⁺ - specific isocitrate dehydrogenase is present in mitochondria, and about 10% is present in the cytoplasm. Conversely, in liver tissue, only 3% exists in mitochondria and the remaining 97% is known to exist in the cytoplasm (Plaut, G.W.E, Current Topics in Cell Regulation, 2, 1 - 27, 1983).

[16]

¹¹⁶ For isoenzymes of isocitrate dehydrogenase, only the structural characteristics of the isoenzyme have been partially elucidated, but the functions have not been elucidated.

[17]

122 On the other hand, fat accumulation in higher animals is made according to the following process.

124 That is, when there is excessive energy in the body, differentiation of adipocytes, which increases the number and size of white adipose tissue, is promoted, and the accumulation of lipids is increased. Accordingly, expression of the ob gene in white adipose tissue is increased. An increase in the concentration of leptin in the body appears, thereby changing the action of hormones in the brain to decrease appetite. will go through

130 In white adipose tissue, the expression of genes such as Peroxisome Proliferator - Activated Receptor γ (PPAR γ), C/EBPa, and ADD1/SREBP1, known as master transcription factors for adipocyte differentiation, is promoted to promote adipocyte differentiation and fat accumulation. is increased, and excess energy in the body is stored in the form of fat, thereby regulating the energy balance in the body (Hu, E. et al., Proc.

136 Natl.

137 Acad.

138 Sci.

139 USA, 1995, 92, 9856 - 9860; Keller, H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 20, 9856 - 9860; Freytag. S.O. et al., Genes Dev., 1994, 8, 1654 - 1663; Tontonoz, P. et al., Mol. Cell. Biol., 1993, 13, 4753 - 4759; Spiegelman, B. M., Cell, 1996, 87, 377 - 389). Substances that act as ligands in vivo for the activation of PPAR γ , the main transcription factor for adipocyte differentiation, are fatty acids such as linoleic acid, docosahexaenoic acid (DHA), and arachidonic acid (polyunsaturated fatty acids such as arachidonic acid (Krey, G. et al., Mol. Endocrinol., 1997, 11, 779 - 791; Yu et al., J. Biol. Chem., 1995, 270, 23975 - 23983) together with prostaglandin J2 (Forman B. M. et al., Cell, 1995, 83, 803 - 812; Kliewer. S. A. et al., Cell, 1995, 83, 813 - 819) are known.

[18]

152 The present inventors found that the increase in the gene expression and enzyme of isocitrate dehydrogenase, and the resulting increase in NADPH, which is an enzyme reaction product, increases the accumulation of fat, causing obesity and fatty liver, and at the same time, the triglyceride (triglyceride) and cholesterol (cholesterol) were also confirmed to increase (Korea Patent Application 2000 - 0061962).

157 Accordingly, the present inventors have found that oxalomalic acid and methylisocitric acid, which are isocitric acid dehydrogenase activity inhibitors, are administered to adipocytes and mice, and have excellent weight loss and obesity inhibitory effects, as well as biological neutral lipid and cholesterol lowering effects. The present invention was completed by confirming that the isocitrate dehydrogenase activity inhibitor can be used as a preventive or therapeutic agent for obesity, hyperlipidemia or fatty liver.

[19]

¹⁶⁷ It is an object of the present invention to provide a preventive or therapeutic agent for obesity, hyperlipidemia, or fatty liver, which contains an isocitric acid dehydrogenase activity inhibitor as an active ingredient, which is excellent in a weight loss effect, an obesity suppression effect, and a bionutral lipid and cholesterol lowering effect.

[20]

¹⁷⁵ In order to achieve the above object, the present invention provides a preventive or therapeutic agent for obesity, hyperlipidemia, or fatty liver comprising an isocitric acid dehydrogenase activity inhibitor as an active ingredient.

[21]

¹⁸¹ In addition, the present invention provides a preventive or therapeutic agent for obesity, hyperlipidemia, or fatty liver, characterized in that it contains oxalo malic acid or methyl isocitric acid as an active ingredient.

[22]

¹⁸⁷ Hereinafter, the present invention will be described in detail.

[23]

¹⁹¹ The present invention provides a preventive or therapeutic agent for obesity, hyperlipidemia, or fatty liver, comprising an isocitric acid dehydrogenase activity inhibitor as an active ingredient.

[24]

¹⁹⁷ The present inventors found that NADPH production in the cytoplasm including IDPc gene, which is an isozyme of isocitrate dehydrogenase, increase in expression of isocitrate dehydrogenase gene and increase in enzymatic activity, and increase in NADPH is involved in lipid and cholesterol biosynthesis It was confirmed that it promotes various enzymatic reactions such as 0061962).

[25]

²⁰⁵ In addition, the present invention provides a preventive or therapeutic agent for

obesity, hyperlipidemia, or fatty liver, characterized in that it contains oxalo malic acid or methyl isocitric acid as an active ingredient.

[26]

211 Oxalomalic acid is produced by the aldol condensation reaction of oxaloacetate, an intermediate of the TCA cycle, and glyoxylate, an intermediate of the glyoxylate cycle, in vivo, and specifically inhibits the activity of isocitric acid dehydrogenase, and Isocitric acid strongly inhibits isocitric acid dehydrogenase in competition with isocitric acid as a substrate.

[27]

219 When oxalomalic acid and methylisocitric acid are added to adipocytes, the activity of isocitric acid dehydrogenase is reduced by about 50% in 30 minutes and 1 hour, respectively (FIG. 1). In addition, when treated with preadipocytes, differentiation into adipocytes is inhibited, and the accumulation of fat in the adipocytes is also suppressed (FIG. 2). In this case, the concentration of oxalomalic acid and methyl isocitric acid is preferably in the range of 0.1 μ M to 100 mM, and preferably in the range of 10 μ M to 5 mM.

[28]

229 It was confirmed through a mouse experiment that the isocitric acid dehydrogenase activity inhibitor showed a high effect on obesity suppression and triglyceride and cholesterol lowering.

232 This is confirmed by measuring the following several indicators, such as measuring the increase in abdominal fat and the amount of lipid accumulation in the body.

[29]

237 The present inventors administered oxalomalic acid and methylisocitric acid to mice by intraperitoneal injection 3 times a week at 25 mg/kg of body weight for 14 weeks.

240 As a result, the body weight was reduced by more than 10% compared to the control mice administered intraperitoneally with physiological saline (FIG. 4). When the above mice were dissected, it was confirmed that the size of the epididymal fat pad was very small, and the weight of the adipose tissue was reduced by about 5 times. In addition, the dorsal view after removing the outer skin also showed that the amount of obese tissue in the mice treated with the isocitric acid dehydrogenase activity inhibitor was significantly reduced (FIG. 3). In addition, in order to explore the degree of fat accumulation in the subcutaneous tissue, the abdominal

subcutaneous tissue is cut in cross - section, and the tissue is embedded in paraffin after the usual fixation procedure and dehydration process. It can be confirmed that the trixane dehydrogenase inhibitor has an important effect on weight loss and reducing the amount of intracellular fat accumulation (Fig. 3).

[30]

²⁵⁵ The present inventors confirmed how the above inhibitors of isocitric acid dehydrogenase activity, such as oxalomalic acid and methylisocitric acid, affect lipids and cholesterol in the body.

²⁵⁸ The amount of triglyceride and total cholesterol was measured by separating the serum of mice administered with oxalomalic acid and methylisocitric acid, which are the isocitric acid dehydrogenase activity inhibitors. As a result, compared to the control mice, 50 % and decreased by about 30% (FIGS. 5 and 6).

[31]

²⁶⁵ As described above, it can be confirmed that the isocitric acid dehydrogenase activity inhibitor has the effect of reducing body weight, effectively inhibits fat accumulation in the body, and inhibits the biosynthesis of cholesterol, thereby lowering the production amount of the living body cholesterol complex.

[32]

²⁷² The effective dose of the prophylactic or therapeutic agent for obesity, hyperlipidemia, or fatty liver containing the isocitric acid dehydrogenase activity inhibitor of the present invention as an active ingredient is usually about 7 mg to 70 g per day for an average adult patient (70 kg). is the range of

[33]

²⁷⁹ The specific dosage of the preventive or therapeutic agent for obesity, hyperlipidemia or fatty liver containing the isocitric acid dehydrogenase activity inhibitor of the present invention as an active ingredient depends on age, weight, symptoms, disease to be treated, administration route, treatment period, etc. it is decided

²⁸⁴ That is, the doctor will determine the most appropriate actual dosage for each patient, and the actual dosage may vary depending on the patient's age, weight, symptoms, and disease to be treated.

²⁸⁷ Accordingly, the dosage may be lower or greater than the above - mentioned ranges, and all such dosages are within the scope of the present invention.

[34]

292 The prophylactic or therapeutic agent for obesity, hyperlipidemia or fatty liver containing the isocitric acid dehydrogenase activity inhibitor of the present invention as an active ingredient may be administered alone, but in general, a pharmaceutical selected from the intended route of administration and standard pharmaceutical practice. It is administered in admixture with an acceptable carrier, or diluent.

297 The administration of the preventive or therapeutic agent for obesity, hyperlipidemia, or fatty liver of the present invention may be made in a form for oral administration such as a solid dosage form, a liquid dosage form or other dosage form, or a form for parenteral administration such as an injection solution, a coating agent or a suppository.

302 In addition, the preventive or therapeutic agent for obesity, hyperlipidemia, or fatty liver of the present invention may be administered once to several times a day.

[35]

307 The prophylactic or therapeutic agent for obesity, hyperlipidemia, or fatty liver using the isocitric acid dehydrogenase activity inhibitor of the present invention as an active ingredient may be administered systemically or locally through oral or parenteral administration.

311 For example, it is administered orally in the form of tablets, pills, granules, capsules, solutions, emulsions, suspensions, syrups, and the like. When administered by a parenteral method, for example, in the case of an injection, it may be injected intravenously, intramuscularly or subcutaneously. For example, it may be applied to the skin in the form of a patch, ointment, or topical preparation for transdermal administration, and may be administered intrarectally in the form of a suppository. Typical solid dosage forms for oral administration include powders, tablets, pills, granules, capsules, etc., wherein the active ingredients are mixed with one or more inert diluents (eg, starch, cellulose, lactose, kaolin, etc.) commonly used in the art. It is mixed, and may be mixed with any lubricant, binder, disintegrant, stabilizer, and the like. Typical liquid formulations for oral administration include pharmaceutically acceptable solutions, emulsions, suspensions, syrups, elixirs, and the like, wherein the active ingredients are contained in one or more inert diluents (eg, purified water, ethanol, etc.) commonly used in the art. and may be mixed with any sweetening agent, flavoring agent, preservative, and the like. Typical injections for parenteral administration include sterile solutions, emulsions, suspensions, and the like, wherein the active ingredients are one or more inert aqueous diluents commonly used in the art (eg, distilled water for injection, physiological saline, etc.) or an inert ratio It is mixed with an aqueous diluent (eg, polyethylene glycol, propylene glycol, ethynol, etc.), and may be mixed with any isotonic agent, buffer, preservative, stabilizer, and the like. Forms of the formulations exemplified above can be prepared

by known methods.

[36]

336 Hereinafter, the present invention will be described in detail by way of Examples.

[37]

340 However, the following examples are only illustrative of the present invention, and the content of the present invention is not limited to the following examples.

[38]

345 <Example 1> Measurement of isocitric acid dehydrogenase activity in adipocytes treated with isocitric acid dehydrogenase activity inhibitor

[39]

350 The NIH3T3 - L1 preadipocyte cell line was treated with oxalomalic acid and methylisocitric acid at 0.5 mM, respectively, and incubated for 10 minutes, 30 minutes, and 1 hour, then the cells were recovered and the isocitric acid dehydrogenase activity was measured.

354 3×10^7 cells were washed twice with 1X phosphate buffer and then disrupted using sucrose buffer (0.32 M sucrose, 0.01 M Tris - Cl, pH 7.4).

356 This was centrifuged at 1,000 g to remove cell debris, and centrifuged again at 15,000 g to separate the cytoplasmic portion and the precipitate mitochondrial portion of the supernatant.

359 Phosphate buffer solution containing 0.1% Triton X - 100 was added to the supernatant, which is the cytoplasmic fraction, in 1/10 volume of the total solution and quantified by Bradford assay, and enzyme activity was measured at 25 ° C. The reaction was carried out in a buffer solution (50 mM MOPS, pH 7.2, 35.5 mM triethanolamine, pH 7.2, 2 mM NADP⁺, 2 mM MgCl₂, 5 mM isocitrate, 1 μg/ml rotenone).

365 After the reaction was completed, the change in absorbance was measured in a colorimeter at 340 nm for 2 minutes, and the amount of the enzyme generating 1 μM NADPH for 1 minute was 1 unit, indicating the activity of the enzyme.

[40]

371 As a result, the control cells showed no change in isocitric acid dehydrogenase activity for 1 hour, whereas the cells treated with oxalomalic acid and methylisocitric acid showed a decrease in isocitric acid dehydrogenase activity by

about 50%. was confirmed (Table 1, Figure 1).

[41]

378 Enzyme activity inhibition (%) treatment time oxalomalate methyl isocitric acid 0 min
100% 100% 10 min 59.1% 54.1% 30 min 50% 48.6% 60 min 59.1% 44.5%

[42]

383 <Example 2> Confirmation of fat synthesis amount in adipocytes treated with
isocitric acid dehydrogenase activity inhibitor

[43]

388 To determine the effect of isocitrate dehydrogenase activity inhibitors on fat
synthesis, the NIH3T3 - L1 cell line was added to DMEM containing 10% fetal bovine
serum (FBS) with insulin at a concentration of 5 μ g/ml. , 0.5 mM 3 - isobutyl - 1 -
methylxanthine (IBMX, Sigma), 1 μ M dexamethasone (DEX), and penicillin -
streptomycin (Gibco BRL) 50,000 per liter each The differentiation of adipocytes
was promoted for two days until the cell density reached about 3×10^4 cells/cm²
while culturing by adding U at a time.

395 After that, using a medium from which IBMX and DEX were removed from the above
medium, the medium was changed every two days, and the culture was continued for
10 days.

398 Cell culture was carried out in a CO₂ incubator in a wet state of 5% CO₂ and 37° C.

399 After culturing, Oil Red O, which specifically stains fat formed in adipocytes, was
treated to observe the number of fat grains formed in adipocytes and the degree of
fat accumulation.

[44]

405 Oil Red O staining is performed by discarding the medium from the plate in which the
cells are being cultured, and adding 10 ml of a fixative solution (cacodylate buffer,
90 mM cacodylate, pH 7.2, 2% formaldehtde, 2.5% glutarardehyde, 0.025% CaCl₂,
5% sucrose). Then, it was left at 4° C. for 1 hour, then removed, and again 5 ml of
Oil Red O solution dissolved in 40% isopropanol was added, mixed slowly for 1 hour,
and washed with 40% isopropanol.

[45]

414 As a result, as shown in FIG. 2, it can be seen that the production of fat is reduced in
the cells treated with the isocitric acid dehydrogenase activity inhibitor compared to

the control group (FIG. 2).

417 The above result means that the isocitric acid dehydrogenase activity inhibitor plays an important role in reducing the amount of intracellular fat accumulation.

[46]

422 <Example 3> Investigation of increase in body weight, body lipid, and cholesterol in mice by isocitric acid dehydrogenase activity inhibitor

[47]

427 <3 - 1> Investigation of changes in body weight by isocitrate dehydrogenase activity inhibitors

[48]

432 Oxalomalic acid and methylisocitric acid were administered to mice by intraperitoneal injection 3 times a week at 25 mg/kg of body weight for 14 weeks.

434 As a result, the body weight of the control mice administered intraperitoneally with physiological saline was reduced by more than 10% compared to the control mice, and it was confirmed that the size of the epididymal fat pad was very small when dissected. decreased about 5 times.

438 In addition, the dorsal view after removing the outer skin also showed that the amount of obese tissue in the mice treated with the isocitric acid dehydrogenase inhibitor was significantly reduced.

441 In order to explore the degree of fat accumulation in the subcutaneous tissue, the abdominal subcutaneous tissue was cut in a cross section and fixed with a 10% neutral formalin solution.

444 The embedded tissue was sectioned to a thickness of 4 μ m, stained with hematoxylin and eosin, and then observed under an optical microscope to compare the degree of abdominal subcutaneous infiltration with the control group (Fig. 3).

[49]

450 In addition, in order to measure the body weight of the mice administered with the isocitric acid dehydrogenase activity inhibitor and the normal mice, the weight displayed after adjusting the zero point of the scale for measuring the animal weight, placing the mouse still, was measured as the weight of the mouse. (Table 2, Figure 4).

[50]

458 Weight gain (g) Control group 22.19 ± 1.11 g Oxalomalic acid treatment group 17.17 ± 1.9 g

[51]

463 <3 - 2> Measurement of blood triglyceride and total cholesterol concentration by isocitrate dehydrogenase activity inhibitor

[52]

468 For the measurement of triglyceride and total cholesterol concentrations, measurement kits from Asan Pharmaceutical Co., Ltd. were used, respectively.
470 Blood was collected from mice treated with isocitric acid dehydrogenase activity inhibitors and from normal mice and centrifuged to obtain serum.
472 To 10 μ l of the obtained serum, add 1.5 ml of a triglyceride measurement kit solution (10800 U of lipofuroteinlipase, 5.4 U of glycerol kinase, 13,5000 U of peroxidase, and 160 U of L - α - glycerophosphate oxidase to 72 ml of N,N - bis(2 - hydroxyethyl) - 2 - aminomethanesulfonic acid buffer solution) or 1.5 ml of cholesterol enzyme measurement kit (enzyme solution (cholesterol esterase 20.5 KU/L, cholesterol oxidase 10.7 KU) / ℓ , sodium hydroxide 1.81 g/ ℓ) and buffer (a solution of 1:1 potassium phosphate 13.6 g/ ℓ , phenol 1.88 g/ ℓ) were mixed and reacted at 37° C for 5 minutes, followed by a microplate analyzer (microplate reader) at 500 nm for cholesterol and at 540 nm for triglycerides, respectively, to measure the blood concentrations of triglycerides and total cholesterol.
482 Quantitative conversion of triglycerides and cholesterol was carried out using a standard concentration curve obtained after applying the same method as above to their standard material solutions.

[53]

488 As a result, the weight of abdominal adipose tissue was reduced by about 5 times compared to the control group (FIG. 3).
490 On the other hand, the amount of triglyceride and total cholesterol in the blood serum was reduced by 50% and 30%, respectively, in mice administered with isocitric acid dehydrogenase inhibitor compared to normal mice (Table 3, FIGS. 5 and 6).

[54]

496 Triglyceride (mg/dl) total cholesterol (mg/dl) Control group $147.6 \pm 8214.23 \pm 13.5$ oxalomalic acid treatment group $70.07 \pm 4.9148.74 \pm 6.6$

[55]

501 As described above, the preventive or therapeutic agent for obesity, hyperlipidemia, or fatty liver using the isocitric acid dehydrogenase activity inhibitor of the present invention as an active ingredient has a weight loss effect, an obesity inhibitory effect, and a biosynthesis inhibitory effect of triglycerides and cholesterol. It is excellent and therefore can be usefully used for the prevention or treatment of obesity, hyperlipidemia or fatty liver.

Notice

This translation is machine - generated. It cannot be guaranteed that it is intelligible, accurate, complete, reliable or fit for specific purposes. Critical decisions, such as commercially relevant or financial decisions, should not be based on machine - translation output.

CLAIMS KR100442322B1

1.

14 Obesity, hyperlipidemia or Prevention or treatment of fatty liver.

2.

18 The prophylactic or therapeutic agent according to claim 1, comprising oxalomalic acid as an inhibitor of NADP⁺ - specific isocitric acid dehydrogenase activity.

3.

23 The prophylactic or therapeutic agent according to claim 1, wherein the NADP⁺ - specific isocitric acid dehydrogenase activity inhibitor comprises methylisocitric acid.

4.

28 The prophylactic or therapeutic agent according to claim 1, comprising oxaloacetate and glyoxylate as NADP⁺ - specific isocitric acid dehydrogenase activity inhibitors.