



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0069365  
(43) 공개일자 2020년06월16일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07C 25/18 (2006.01) A61K 31/03 (2006.01)  
A61K 31/14 (2006.01) A61K 31/155 (2006.01)  
A61K 31/20 (2006.01) A61K 31/201 (2006.01)  
A61K 31/66 (2006.01) A61K 33/18 (2006.01)  
A61K 45/06 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01)  
C07D 347/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
C07C 25/18 (2013.01)  
A61K 31/03 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7014732
- (22) 출원일자(국제) 2018년10월23일  
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2020년05월22일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2018/057093
- (87) 국제공개번호 WO 2019/083997  
국제공개일자 2019년05월02일
- (30) 우선권주장  
62/576,287 2017년10월24일 미국(US)

- (71) 출원인  
루넬라 바이오테크 인코포레이티드  
캐나다 온타리오 케이1제트 1에이1 오타와 리치몬드 로드 145
- (72) 발명자  
리산티 마이클 피.  
미국 메릴랜드주 20759 풀턴 오피스 324 스위트 350 메이플 론 블러바드 8115  
소트지아 페데리카  
미국 메릴랜드주 20759 풀턴 오피스 324 스위트 350 메이플 론 블러바드 8115
- (74) 대리인  
특허법인태평양

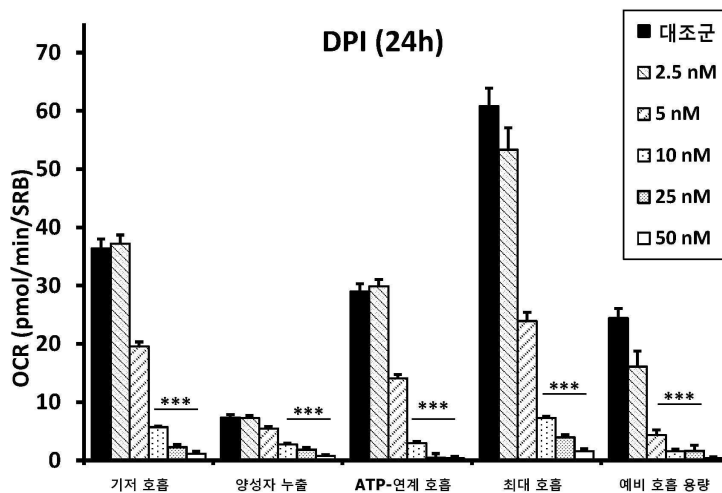
전체 청구항 수 : 총 32 항

(54) 발명의 명칭 미토플라보신: 플라빈-함유 효소를 표적화하여 미토콘드리아 호흡 억제에 의해 암 줄기 세포(CSCS)를 제거함

(57) 요약

본 발명은, 본 명세서에서 미토플라보신으로 지칭되는, 플라빈-함유 효소에 결합하고 미토콘드리아 기능을 억제하는 화합물에 관한 것이다. 미토콘드리아 억제 및 항암 특성을 위한 화합물의 스크리닝 방법이 개시되어 있다. 또한, 암, 박테리아 감염, 및 병원성 효모의 예방 또는 치료를 위해 미토플라보신을 사용하는 방법, 뿐만 아니라 항-노화 효과를 제공하기 위해 미토플라보신을 사용하는 방법이 서술된다. 또한, 구체적인 미토플라보신 화합물이 개시되어 있다.

대표도 - 도4b



(52) CPC특허분류

*A61K 31/14* (2013.01)  
*A61K 31/155* (2013.01)  
*A61K 31/20* (2013.01)  
*A61K 31/201* (2013.01)  
*A61K 31/66* (2013.01)  
*A61K 33/18* (2013.01)  
*A61K 45/06* (2013.01)  
*A61P 31/04* (2018.01)  
*C07D 347/00* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

미토플라보신.

#### 청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 미토플라보신은 디페닐렌요오도늄, 디페닐렌요오도늄의 약학적으로 허용가능한 염, 및 디페닐요오도늄 또는 디페닐요오도늄의 약학적으로 허용가능한 염 중 적어도 하나를 포함하는 미토플라보신.

#### 청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 미토플라보신은 항암 활성, 항노화 활성, 방사선증감 활성, 광증감 활성 중 적어도 하나를 보유하는 미토플라보신.

#### 청구항 4

청구항 2에 있어서,

상기 미토플라보신은 항암 활성, 항노화 활성, 방사선증감 활성, 광증감 활성 중 적어도 하나를 보유하는 미토플라보신.

#### 청구항 5

청구항 1에 있어서,

상기 미토플라보신은 암 세포를 화학치료제, 천연물질, 및 칼로리 제한 중 적어도 하나에 민감하게 하는 미토플라보신.

#### 청구항 6

청구항 2에 있어서,

상기 미토플라보신은 암 세포를 화학치료제, 천연물질, 및 칼로리 제한 중 적어도 하나에 민감하게 하는 미토플라보신.

#### 청구항 7

청구항 1에 있어서,

상기 미토플라보신은 플라빈-함유 효소에 결합하는 미토플라보신.

#### 청구항 8

청구항 2에 있어서,

상기 미토플라보신은 플라빈-함유 효소에 결합하는 미토플라보신.

#### 청구항 9

청구항 7에 있어서,

상기 플라빈-함유 효소는 플라빈 아데닌 디뉴클레오타이드 및 플라빈 모노뉴클레오타이드 중 적어도 하나로부터 선택되는 미토플라보신.

**청구항 10**

청구항 8에 있어서,

상기 플라빈-함유 효소는 플라빈 아데닌 디뉴클레오타이드 및 플라빈 모노뉴클레오타이드 중 적어도 하나로부터 선택되는 미토플라보신.

**청구항 11**

청구항 1에 있어서,

상기 미토플라보신은 미토콘드리아-표적화 화합물을 포함하는 미토플라보신.

**청구항 12**

청구항 11에 있어서,

상기 미토콘드리아-표적화 화합물은 막 표적화 신호 및 미토콘드리아 리보솜-표적화 신호를 포함하는 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 화합물인 미토플라보신.

**청구항 13**

청구항 12에 있어서,

상기 막 표적화 신호는 팔미트산, 스테아르산, 미리스트산, 및 올레산을 포함하는 군으로부터 선택되는 화합물인 미토플라보신.

**청구항 14**

청구항 12에 있어서,

상기 미토콘드리아 표적화 신호는 트리-페닐-포스포늄 및 구아니디늄을 포함하는 군으로부터 선택되는 화합물인 미토플라보신.

**청구항 15**

약학적으로 유효량의 미토플라보신 및 약학적으로 허용가능한 담체를 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 암의 치료 방법.

**청구항 16**

청구항 15에 있어서,

상기 미토플라보신은 디페닐렌요오도늄, 디페닐렌요오도늄의 약학적으로 허용가능한 염, 및 디페닐요오도늄 또는 디페닐요오도늄의 약학적으로 허용가능한 염 중 적어도 하나를 포함하는 방법.

**청구항 17**

약학적으로 유효량의 미토플라보신 및 약학적으로 허용가능한 담체를 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 미생물 감염의 치료 방법.

**청구항 18**

청구항 17에 있어서,

상기 미토플라보신은 디페닐렌요오도늄, 디페닐렌요오도늄의 약학적으로 허용가능한 염, 및 디페닐요오도늄 또는 디페닐요오도늄의 약학적으로 허용가능한 염 중 적어도 하나를 포함하는 방법.

**청구항 19**

약학적으로 유효량의 미토플라보신 및 약학적으로 허용가능한 담체를 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 연령-관련 증상 감염의 치료 방법.

**청구항 20**

청구항 19에 있어서,

상기 미토플라보신은 디페닐렌요오도늄, 디페닐렌요오도늄의 약학적으로 허용가능한 염, 및 디페닐요오도늄 또는 디페닐요오도늄의 약학적으로 허용가능한 염 중 적어도 하나를 포함하는 방법.

**청구항 21**

활성 성분으로서 적어도 하나의 미토플라보신을 포함하는 약학적 조성물.

**청구항 22**

청구항 21에 있어서,

상기 적어도 하나의 미토플라보신은 디페닐렌요오도늄, 디페닐렌요오도늄의 약학적으로 허용가능한 염, 및 디페닐요오도늄 또는 디페닐요오도늄의 약학적으로 허용가능한 염 중 적어도 하나를 포함하는 약학적 조성물.

**청구항 23**

청구항 21에 있어서,

상기 조성물은 암의 치료, 박테리아 감염의 치료, 병원성 효모 감염의 치료, 연령-관련 증상의 치료, 및 노화 효과의 감소 중 적어도 하나에 대해 표지되는 약학적 조성물.

**청구항 24**

미토플라보신의 확인 방법으로서, 상기 방법은 표현형적 약물 스크리닝 및 미토콘드리아 억제 스크리닝 중 적어도 하나를 수행하는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 25**

청구항 24에 있어서,

상기 표현형적 약물 스크리닝은 ATP-고갈 분석법을 포함하는 방법.

**청구항 26**

청구항 24에 있어서,

상기 표현형적 약물 스크리닝은 세포의 산성화 속도 분석법 및 산소 소비 속도 분석법 중 적어도 하나를 포함하는 방법.

**청구항 27**

청구항 24에 있어서,

항암 활성 및 항균 활성 중 적어도 하나에 대하여 상기 미토플라보신을 시험하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

**청구항 28**

청구항 27에 있어서,

상기 시험되는 항암 활성은 맘모스피어 형성인 방법.

**청구항 29**

미토플라빈.

**청구항 30**

청구항 32에 있어서,

막-표적화 신호 및 미토콘드리아-표적화 신호 중 적어도 하나를 추가로 포함하는 미토플라빈.

**청구항 31**

적어도 하나의 미토플라빈의 투여를 운반하는 단계를 포함하는 암 줄기 세포에서 리보플라빈-결핍을 유도하는 방법.

**청구항 32**

청구항 31에 있어서,

상기 미토플라빈은 막-표적화 신호 및 미토콘드리아-표적화 신호 중 적어도 하나를 포함하는 방법.

**발명의 설명**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 플라빈-함유 효소에 결합하고 미토콘드리아 기능을 억제하는 화합물인 "미토플라보신"에 관한 것이며, 미토플라보신 합성 방법, 미토플라보신을 이용하여 암 줄기 세포를 표적화하는 방법, 및 암 치료와 암 세포의 약물 저항성 감소 둘 다를 위한 약학적 화합물, 활성 성분으로서 하나 이상의 미토플라보신을 함유하는 약학적 조성물을 포함한다. 또한, 미토콘드리아 기능을 억제하는 리보플라빈의 유도체 화합물인 "미토플라빈"이 개시되어 있다.

**배경기술**

[0002] 연구자들은 새로운 항암 치료법을 개발하기 위해 노력해 왔다. 종래의 암 치료법(예컨대, 방사선, 시클로포스파미드와 같은 알킬화제, 및 5-플루오로우라실과 같은 항-대사물질)은 세포 성장 및 DNA 복제에 관여하는 세포 메커니즘을 간섭함으로써 빨리 성장하는 암 세포를 선택적으로 검출 및 근절하기 위한 시도를 해왔다. 다른 암 치료법은 빨리 성장하는 암 세포 상의 돌연변이체 종양 항원에 선택적으로 결합하는 면역치료법을 사용하였다(예컨대, 단일클론 항체). 불행하게도, 이러한 치료법 후에 종양은 종종 동일하거나 상이한 위치(들)에 재발하며, 이는 모든 암 세포가 근절되지 않는 것을 나타낸다. 재발은 불충분한 화학치료제 복용량 및/또는 치료법에 저항성인 암 클론의 출현으로 인한 것일 수 있다. 따라서, 신규한 암 치료 전략이 요구된다.

[0003] 돌연변이 분석에서의 진보는 암 발생 동안에 일어나는 유전자 돌연변이의 심층 연구를 가능하게 하였다. 게놈 경관의 지식을 갖고 있음에도 불구하고, 현대의 종양학은 암 서브타입 전반에 걸친 1차 구동 돌연변이를 확인하는데 어려움을 갖는다. 이러한 냉혹한 현실은 각각의 환자의 종양이 독특하고, 단일 종양이 다수의 분기하는 클론 세포를 함유할 수 있기 때문으로 보인다. 따라서, 상이한 암 타입 사이의 공통성을 강조하는 새로운 접근법이 필요하다. 종양 및 정상 세포 사이의 대사적 차이점을 표적화하는 것은 신규한 암 치료 전략으로 유망하다. 인간 유방암 샘플 유래의 전사 프로파일 데이터를 분석하여 미토콘드리아 생물발생 및/또는 미토콘드리아 번역과 연관된 95개 이상의 상승된 mRNA 전사체를 밝혔다[Sotgia et al., *Cell Cycle*, 11(23):4390-4401 (2012)]. 추가적으로, 상기 95개의 상승조절된 mRNA 중 35개 이상은 미토콘드리아 리보솜 단백질(MRP)을 암호화한다. 마찬가지로, 인간 유방암 줄기 세포의 프로테옴 분석은 몇 가지 미토리보솜 단백질뿐만 아니라 미토콘드리아 생물발생과 연관된 다른 단백질의 현저한 과발현을 밝혔다[Lamb et al., *Oncotarget*, 5(22):11029-11037 (2014)].

[0004] 소정의 정균적(bacteriostatic) 항생제 또는 OXPHOS 억제제의 표적-외(off-target) 효과를 이용한 미토콘드리아 생물발생의 기능적 억제는 기능적인 미토콘드리아가 암 줄기 세포의 전파를 위해 필요하다는 추가적인 증거를 제공한다. 최근 본 발명자들은 미토콘드리아 형광 염료(MitoTracker)가 살아있는 세포의 이종성 집단(population)으로부터 암 줄기-유사 세포(CSC)의 농축 및 정제를 위해 효과적으로 사용될 수 있음을 보였다[Farnie et al., *Oncotarget*, 6:30272-30486 (2015)]. 가장 높은 미토콘드리아 질량을 갖는 암 세포는 보통 전이 잠재력과 연관된 특징인 앵커-독립적(anchorage-independent) 성장을 하기 위한 가장 강한 기능적 능력을 가졌다. 상기 '미토-높음(Mito-high)' 세포 서브-집단은 또한 전임상 모델을 이용해 나타낸 것과 같이 생체내에서 가장 높은 종양-개시 활성을 가졌다.

**발명의 내용**

[0005] 진술한 배경을 고려하여, 본 발명자들은 공지된 표적 및 확립된 작용 기전을 갖는 FDA-승인 약물 및 기타 관련 시험 화합물의 대규모 라이브러리를 스크리닝함으로써 미토콘드리아의 새로운 대사성 억제제에 대한 검색에 초점을 맞추었다. 본 발명자들은 (급성 독성 부작용이 있는 약물을 피하기 위해) 미토콘드리아 ATP 생산을 상당히

감소시키지만 세포 사멸을 유도하지는 않는 화합물로 검색을 제한하였다. 본 발명의 개시의 목적은 플라빈-함유 효소에 결합하고 미토콘드리아 ATP 생산을 억제하는 화합물인 미토플라보신을 확인하는 본 발명의 방법을 확인하는 것이다. 또한, 본 발명의 개시의 목적은 항암 및 항생제 특성을 갖는 미토플라보신을 확인하는 것이다. 또한, 본 발명의 개시의 목적은 항노화 특성을 갖는 미토플라보신을 확인하는 것이다. 또한, 본 발명의 개시의 목적은 방사선증감제 및 광증감제로서 기능하는 미토플라보신을 확인하는 것이다. 용어 "미토플라보신"은 플라빈-함유 효소에 결합하고 미토콘드리아 기능을 억제하는 화합물을 광범위하게 지칭한다. 따라서, 이들 화합물은 FMN, FAD, 및/또는 리보플라빈을 표적화 및 고갈시키도록 설계될 수 있다. 본 발명의 개시는 추가로 미토플라보신을 확인하는 방법, 이러한 미토플라보신을 제조하는 방법, 및 치료 목적으로 미토플라보신을 사용하는 방법에 관한 것이다.

[0006] 추가적으로, 이전에 생성된 데이터는 "미토플라보신"으로 지칭되는, 미토콘드리아 리보솜을 표적화하는 미토콘드리아 기능의 억제제가, 박테리아 및 병원성 효모를 표적화하고, 항노화 효과를 제공하고, 방사선증감제 및/또는 광증감제로서 기능하며, 벌크 암 세포 및 암 줄기 세포를 화학치료제, 제약 및/또는 식이 보충제와 같은 다른 천연물질 및 칼로리 제한에 민감하게 하는데 사용될 수 있음을 시사한다. 미토콘드리아 억제 특성을 감안할 때, 미토플라보신은 유사하게 박테리아 및 병원성 효모를 표적화하고, 항노화 효과를 제공하고, 방사선증감제 및/또는 광증감제로서 기능하며, 벌크 암 세포 및 암 줄기 세포를 화학치료제, 약제 및/또는 다른 천연 물질에 민감하게 하는데 사용될 수 있다.

[0007] 미토플라보신은 고-처리량 스크리닝의 수렴적 접근법에 이은 미토콘드리아 억제에 대한 시험관내 검증을 통해 확인될 수 있다. 미토플라보신은 인실리코(in silico) 약물 설계와 표현형적 약물 스크리닝을 조합하여 신속하게 개발될 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0008] 도 1은 본 발명의 접근법의 구현예에 따른 약물 개발 전략을 개략적으로 나타내는 도해를 보여준다.
- 도 2는 ATP 수준에 대한 디페닐렌요오도늄 클로라이드(DPI)의 효과를 보여준다.
- 도 3a는 MCF7 세포의 세포 생존능에 대한 DPI의 효과를 보여준다. 도 3b는 hTERT-BJ1 세포의 세포 생존능에 대한 DPI의 효과를 보여준다.
- 도 4a는 산소 소비 속도(OCR)에 대한 DPI로 24시간 처리의 효과를 보여준다. 도 4b는 기저 호흡, 양성자 누출, ATP-연계 호흡, 최대 호흡, 및 예비 호흡 용량에 대한 DPI의 효과를 보여준다.
- 도 5a는 세포의 산성화 속도(ECAR)에 대한 DPI로 24시간 처리의 효과를 보여준다. 도 5b는 해당작용, 해당작용 비축물, 비-글루코오스 유래의 ECAR, 및 해당작용 비축물 용량에 대한 DPI의 효과를 보여준다.
- 도 6은 L-락테이트 생산에 대한 DPI의 효과를 보여준다.
- 도 7은 맘모스피어(mammosphere) 형성에 대한 DPI의 효과를 보여준다.
- 도 8a 및 8b는 암 줄기 세포 마커 CD44+/CD24-에 대한 DPI의 효과를 보여준다.
- 도 9는 미토콘드리아 반응성 산소 종(ROS) 생산에 대한 DPI의 효과를 보여준다.
- 도 10은 OCR에 대한 DPI로 1시간 처리의 효과를 보여준다.
- 도 11은 ECAR에 대한 DPI로 1시간 처리의 효과를 보여준다.
- 도 12a 내지 도 12c는 OCR에 대한 DPI 처리, "세척", 및 회복의 효과를 보여준다.
- 도 13은 기저 호흡, 양성자 누출, ATP-연계 호흡, 최대 호흡, 및 예비 호흡 용량에 대한 DPI 처리, "세척", 및 회복의 효과를 보여준다.
- 도 14a는 OCR에 대한 DPI로 장기간 처리의 효과를 보여준다. 도 14b는 MCF7 세포의 형태학 및 밀도에 대한 DPI로 장기간 처리의 효과를 보여준다.
- 도 15는 화합물 A로서 DPI, 및 화합물 B로서 플라빈 모노뉴클레오타이드(FMN)의 구조의 비교를 보여준다.
- 도 16은 화합물 A로서 DPI, 및 관련 화합물 B로서 디페닐요오도늄 클로라이드의 구조를 비교한다.
- 도 17은 미토콘드리아를 표적화하기 위해 DPI 또는 DPI-관련 화합물에 첨가될 수 있는 작용기 R의 부착을 위한

가능한 위치를 보여준다.

도 18은 미토콘드리아 기능을 억제하는 리보플라빈의 유도체인 미토플라빈 화합물의 예를 보여준다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0009] 다음의 기재는 본 발명의 접근법을 실행할 수 있도록 본 발명의 접근법의 구현예를 충분히 상세하게 설명한다. 본 발명의 접근법이 상기 구체적인 구현예를 참조하여 개시되지만, 본 발명의 접근법은 상이한 형태로 구현될 수 있음이 인식되어야 하고, 이러한 개시가 임의의 첨부된 청구항을 본 명세서에 개시된 특정 구현예로 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다. 오히려, 상기 구현예는 이러한 개시가 철저하고 완전하며, 본 기술분야의 기술자에게 본 발명의 접근법의 범위를 충분히 전달하기 위해 제공된다.
- [0010] 미토콘드리아 대사는 암으로부터 박테리아 및 진균의 감염 및 노화에 이르는 범위의 다수의 고통을 치료하기 위한 미지의 관문이다. 암 줄기 세포의 전파를 위해서는 기능적 미토콘드리아가 요구된다. 암 세포에서 미토콘드리아 대사의 억제는 이들 세포의 전파를 저해한다. 본 발명의 접근법은 공지의 표적 및 확립된 작용 기전을 갖는 FDA 승인 약물 및 기타 관련 시험 화합물의 대규모 라이브러리를 스크리닝함으로써 이 관문을 탐색하였고, ATP 생산을 상당히 감소시키지만 세포 사멸을 유도하지는 않는 화합물로 검색을 추가로 제한하여, 급성 독성 부작용이 있는 약물을 회피하였다.
- [0011] 플라빈-함유 효소에 결합하는 미토콘드리아 ATP 생산의 신규 억제제인 미토플라보신은 표현형적 약물 스크리닝 및 기능적 검증을 결합한 접근법을 통해 확인될 수 있다. 도 1은 본 명세서에서 개시된 표현형적 약물 스크리닝 및 기능적 검증을 사용함으로써 미토플라보신을 확인하는 방법의 개요이다. 상기 방법의 구현예는 표현형적 약물 스크리닝(S101) 및 기능적 검증(S102), 및 결과로부터 하나 이상의 후보 약물을 선택하는 단계(S103)를 수반할 수 있다. 표현형적 약물 스크리닝(S101)은 ATP-고갈 분석법을 사용하여 수행될 수 있다. ATP-고갈 분석법은 세포 사멸을 유도하지 않으면서 기능적으로 ATP 고갈을 유도할 수 있는 화합물을 확인할 수 있으며, 이로써 독성 부작용을 회피할 수 있다. 상기 스크리닝 분석법은 분자의 라이브러리에 대해 수행될 수 있다. 예를 들면, 본 발명자들의 초기 개발 동안에, MCF7 세포(6,000 세포/웰)를 흑색 투명 바닥의 96-웰 플레이트에 플레이팅하고 처리 전에 밤새 인큐베이션하였다. 다음으로, Trocristeen™ 화합물 라이브러리(560 화합물)의 서브-세트에 대해 20 μM의 농도에서 표현형적 약물 스크리닝을 수행하였다(Bio-Techne Corp, MN, USA). 인큐베이션 72시간 후에 화합물을 시험하였고 실험은 3회 수행하였다. 처리 후, 배지를 상기 웰로부터 흡인하였고, 플레이트를 (Ca<sup>2+</sup> 및 Mg<sup>2+</sup>로 보충된) 따뜻한 PBS로 세척하였다. 이후, 세포를 Hoechst 33342(Sigma) 염색 용액(10 μg/ml)으로 30분 동안 인큐베이션하였고, PBS로 세척하였다. 355/460-nm에서 여기/방출 파장을 이용해 플레이트 관독기로 형광을 관독하였다. 이후, CellTiter-Glo 발광 분석법(Promega)을 수행하여 해당 화합물로 처리된 바로 그 동일한 웰에서의 대사 활성(ATP 함량)을 측정하였다. 제조사의 프로토콜에 따라 분석법을 수행하였다. 형광 강도(Hoechst 염색) 및 발광 강도(ATP 함량)를 비히클(vehicle)-단독 처리된 대조군에 대해 표준화하였고 백분율로 나타냈다. ATP-고갈을 강력하게 유도한 화합물을 확인하기 위해 더 낮은 농도(10 μM)에서 양성반응의 히트(hit)를 다시 스크리닝하였다. 본 기술분야의 기술자는 동일하거나 유사한 ATP-고갈 분석법을 도입하도록 선택하고, 이러한 분석법을 변형하고, 또는 상기 ATP-고갈 분석법을 미토콘드리아 억제를 위해 선택된 화합물을 스크리닝하기 위한 다른 방법론(예컨대, 산소 소비 분석법)으로 교체할 수 있음이 인식되어야 한다.
- [0012] DPI(디페닐렌요오도늄 클로라이드)는 ATP-고갈의 강력한 유도제로 확인되었다. 본 발명자들은 DPI가 훨씬 더 낮은 농도에서 ATP-고갈을 유도한다는 가설을 세웠다. 본 발명자들은 다양한 농도의 DPI로 인간 유방암 세포(MCF7)를 72시간 동안 처리하였다. 이후, 상기 세포를 형광 Hoechst DNA-염색 처리하고 세포 수에 대해 표준화하였다. 본 발명자들은 CellTiter-Glo를 프로브로서 사용함으로써 발광을 이용해 동일한 웰에서 ATP 함량을 측정할 수 있었다. 72시간의 처리에서, 500 nM DPI는 ATP 수준을 >80%까지 감소시켰지만, (DNA 함량에 의해 검출된 바와 같이) 플레이트에 부착된 세포의 수는 변하지 않고 유지되었으므로, 임의의 세포 사멸을 상당히 유도하지는 않았다. 도 2는 이들 결과를 요약하고, DPI가 거대한 세포 사멸을 유도하지 않으면서 ATP 수준을 선택적으로 고갈시킴을 입증한다.
- [0013] 본 발명의 접근법은 세포 생존능을 확인하는 방법을 포함한다. 본 기술분야의 기술자는 특정 구현예에 적합한 세포 생존능을 확인하기 위한 하나 이상의 방법을 선택할 수 있다. 본 발명자들은 세포 단백질 함량의 측정에 기반하는 셀로로다민(SRB) 분석법을 사용하였다. 96-웰 플레이트에서 5일 동안 처리한 후, 세포를 10% 트리클로로아세트산(TCA)으로 저온실에서 1시간 동안 고정하였고, 실온에서 밤새 건조시켰다. 이후, 세포를 SRB로 15분 동안 인큐베이션하였고, 1% 아세트산으로 2회 세척하였으며, 적어도 1시간 동안 공기 건조시켰다. 마지막으로,

단백질-결합된 염료를 10 mM Tris, pH 8.8 용액에 용해시켰고, 540-nm에서 플레이트 판독기를 이용해 판독하였다. 도 3a는 MCF7 세포의 세포 생존능에 대한 DPI의 효과를 보여준다. 구체적으로, 상기 데이터는 DPI가 5일의 처리 후에도, 세포 생존능에 상당히 영향을 미치지 않음을 보여준다. DPI는, 33 nM의 농도에서, MCF7 세포에 독성을 거의 또는 전혀 보여주지 않았다. 도 3b는 hTERT-BJ1 세포의 세포 생존능에 대한 DPI의 효과를 보여준다. 정상 섬유아세포(hTERT-BJ1)로도 사실상 동일한 결과를 얻었고, 이는 5일의 인큐베이션 후, 최대 100 nM에서, 독성 효과를 거의 또는 전혀 보여주지 않았다(도 3b).

[0014] 본 발명의 접근법은 기능적 검증 방법(S102)을 추가로 수반하며, 그 동안 미토콘드리아 억제제로서의 화합물의 기능이 확인될 수 있다. 예를 들면, 대사성 플럭스 분석법, 맘모스피어 분석법, 생존능 분석법, 및 항생제(항-박테리아 및/또는 항-진균) 활성을 포함하는 다수의 방법이 기능적 검증을 위해 사용될 수 있다. 본 발명자들은 시호스 세포의 플럭스(Seahorse Extracellular Flux)(XF96) 분석기(Seahorse Bioscience, MA, USA)를 이용하여 MCF7 세포에 대해 세포의 산성화 속도(ECAR) 및 실시간 산소 소비 속도(OCR)를 결정하였다. 간략히, MCF7 세포는 10% FBS(우 태아 혈청), 2 mM GlutaMAX, 및 1% Pen-Strep으로 보충된 DMEM에서 유지되었다. 웰 당 8,000개 세포를 XF96-웰 세포 배양 플레이트에 분주하였고, 5% CO<sub>2</sub> 가습 대기에서 37°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 다음날, 세포를 미리 데운 XF 분석 배지(OCR 측정의 경우, XF 분석 배지는 10 mM 글루코오스, 1 mM 피루베이트로 보충되었고, pH 7.4로 조정되었음)에서 세척하였다. 이후, 세포를 비-CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 37°C에서 175  $\mu$ l/웰의 XF 분석 배지에서 1시간 동안 유지하였다. 인큐베이션 동안에, XF 분석 배지 내에 25  $\mu$ l의 80 mM 글루코오스, 9  $\mu$ M 올리고마이신, 1 M 2-데옥시글루코오스(ECAR 측정의 경우) 및 25  $\mu$ l의 10  $\mu$ M 올리고마이신, 9  $\mu$ M FCCP, 10  $\mu$ M 로테논, 10  $\mu$ M 안티마이신 A(OCR 측정의 경우)를 XFe-96 센서 카트리지의 주입 포트 내에 로딩하였다. 실험 동안에, 상기 기기는 해당 시점에서 웰 내로 상기 억제제들을 주입하면서, ECAR/OCR을 연속해서 측정하였다. ECAR 및 OCR 측정을 단백질 함량에 의해 표준화하였다(셀포로다민 B 분석법). 일원(one-way) ANOVA 및 스튜던트 t-테스트 계산을 이용하여 XFe-96 소프트웨어에 의해 데이터 세트를 분석하였다. 모든 실험은 3회 수행하였다.

[0015] OCR 결과는 DPI가 2.5 nM의 농도에서 거의 또는 전혀 효과가 없음을 보여준다. 그러나, 5 nM에서, 기저 호흡은 ~50%까지 감소되었다. 최종적으로, 10 nM에서, 기저 호흡 속도는 ~85%까지 감소되었고, 그 결과 ATP 생산은 >90% 감소하였다. 도 4a 내지 도 4b는 이들 결과를 요약하고, DPI가 미토콘드리아 호흡을 강력하게 억제함을 설명한다. 도 4a는 시간 경과에 따른 OCR에 대한 DPI 처리의 효과를 보여주고, 도 4b는 기저 호흡, 양성자 누출, ATP-연계 호흡, 최대 호흡, 및 예비 호흡 용량에 대한 DPI 처리의 효과를 보여준다. 기능적 검증에 대해 수많은 방법이 공지되어 있고, 본 기술분야의 통상의 기술자는 검증 요구에 따라 하나 이상을 선택할 수 있음이 인식되어야 한다(예를 들어, 미토콘드리아 기능을 측정하거나 근사하는 다른 분석법).

[0016] 언급된 바와 같이, 본 발명자들은 DPI의 항-미토콘드리아 효과가 반응성 해당작용 응답을 유도하는지 여부를 결정하기 위해, ECAR을 결정함으로써, DPI-처리된 유방암 세포에 대해 "해당작용 스트레스 시험"을 수행하였다. 시호스 XFe96으로 MCF7 세포에 대해 대사성 플럭스 분석법을 수행하였고, 이 또한 L-락테이트 생산에 대한 대리 마커로서 ECAR을 측정한다. DPI(2.5 nM)로 24시간 처리 후에, 효과가 거의 또는 전혀 관찰되지 않았다. 그러나, 10 nM DPI에서, 해당작용은 2배까지 증가하였다. 도 5a 내지 도 5b는 DPI가 해당작용 표현형을 강력하게 유도하였음을 강조한다. 도 5a는 시간 경과에 따른 ECAR에 대한 DPI의 효과를 보여준다. 도 5b는 해당작용, 해당작용 비축물, 및 해당작용 비축물 용량에 대한 DPI의 효과를 보여준다.

[0017] 상기 ECAR에서 관찰된 증가가 L-락테이트 생산에 상응함을 확인하기 위해, ISCUS<sup>flex</sup> 미세 투석 분석기(M Dialysis Inc., MA, USA)를 이용하여 L-락테이트 수준을 직접 측정하였다. 배양 배지를 수집하고, 원심분리하고 1일, 3일 또는 5일 동안 다양한 농도의 DPI로 MCF7 세포를 처리한 후 ISCUS<sup>flex</sup> 미세 투석 분석기로 분석하였다. 상기 기기의 캘리브레이션은 제조사에서 제공한 샘플로 수행하였다. 이후, L-락테이트 수준을 측정하고 비히클 단독으로 처리된 MCF7 세포로부터 취한 샘플에 대해 표준화하였다. 도 6은 DPI가 상당한 L-락테이트 생산을 유도하여, 락테이트 생산량을 거의 2배로 증가시킴을 보여주고, 이는 해당작용에서 2배 증가와 일치한다.

[0018] 본 발명의 접근법은 일부 구현예에서, 항암 특성을 위하여 화합물을 시험하는 방법을 수반할 수 있다. 예를 들어, 본 발명자들은 MCF7 세포에서 맘모스피어 형성을 억제하는 DPI의 능력을 조사하였다. 효소(1x 트립신-EDTA, Sigma Aldrich) 및 수동 분해(25-게이지 바늘)를 이용하여 MCF7 세포의 단일 세포 현탁액을 제조하였다. 이후, 세포를 (2-하이드록시에틸메타크릴레이트) (폴리-HEMA, Sigma)로 코팅된 배양 접시에, 비부착 조건의 맘모스피어 배지(DMEM-F12/B27/20-ng/ml EGF/PenStrep)에서 500 세포/cm<sup>2</sup>의 밀도로 플레이팅하였다. 세포를 5일 동안 성

장시키고 가슴 인큐베이터에서 37°C에서 5% (v/v) 이산화탄소/공기의 대기압에서 유지하였다. 배양 5일 후, 접안 눈금판을 사용하여 >50 μm의 구를 계수하고, 구를 형성한 플레이팅된 세포의 백분율을 계산하고 이를 맘모스피어 형성 백분율로 지칭하고, 비히클-단독 처리 대조군에 대해 표준화하였다. 맘모스피어 분석법을 3회 수행하고 독립적으로 세번 반복하였다. 도 7은 맘모스피어 분석법에서 DPI가 용량-의존적으로 CSC 전파를 억제하였음을 강조한다. DPI 처리는 3.23 nM의 IC-50으로, 농도-의존적 방식으로, CSC 전파를 상당히 감소시켰다. 본 기술분야의 통상의 기술자는 특정 세포주에 대한 후보 미토플라보신의 효과를 평가하기 위해서 본 발명의 접근법을 벗어나지 않으면서 본 기술분야에 공지된 다른 방법을 사용할 수 있음이 인식되어야 한다. 또한, 억제제는 암 줄기 세포(CSC)를 표적화하므로, 본 기술분야의 통상의 기술자는 다른 암 유형에 대한 후보 미토플라보신의 효과를 평가할 수 있음이 인식되어야 한다. CSC는 대부분의 암 유형에 대해 보존적인(conserved) 또는 유사한 특징을 보여준다.

[0019] 상기 발견을 추가로 검증하기 위하여, 본 발명자들은 암 세포에서 "줄기세포능(stemness)"을 정량화하기 위해 제2의 독립적인 접근법을 사용하였다. 본 발명자들은 특정 세포 표면 마커, 즉 CD44 및 CD24를 겨냥한 형광 항체 프로브를 조사하였다. 상기 CD44+/CD24- 세포 집단은 CSC-풍부 분획을 나타낸다.  $1 \times 10^5$  MCF7 세포를 10% 열-불활성화된 FBS가 보충된 완전한 배지에서 6-웰 플레이트에 플레이팅하였다. 다음날, 세포를 5일 동안 DPI(5, 10, 50 nM)로 처리하였다. 비히클 단독(DMSO) 대조군 세포를 병렬로 처리하였다. 간략히, 7-AAD 염료 염색에 의해 확인된 바와 같이, 30,000-50,000개의 살아있는 세포에 대해 CD24/CD44 발현을 분석하였다. 본 발명자들은 BD LSR Fortessa(BD Bioscience)를 이용한, 형광 활성화 세포 분류(FACS) 분석법에 CD24(10Test CD24-PE, Beckman Coulter) 및 CD44(APC 마우스 Anti-Human CD44, BD Pharmingen) 항체를 사용하였다. 결과는 3개의 생물학적 복제물(반복)의 평균이고, 대조군에 대해 표준화된 평균 형광 강도의 백분율로서 표현된다. 본페로니의 다중 비교 시험과 함께 일원 ANOVA를 사용하였다. 도 8a 및 8b는 DPI가 총 세포 집단으로부터 이들 CSC를 선택적으로 제거함을 보여준다. 상기 CD44+/CD24- 세포 집단은 10 nM의 IC-50으로, DPI 처리에 의해 용량-의존적으로 감소되었다. 암 세포에서 줄기세포능을 정량화하기 위한 다른 방법이 공지되어 있고, 본 기술분야의 통상의 기술자는 검증 요구에 따라 하나 이상을 선택할 수 있음이 인식되어야 한다.

[0020] 본 발명자들은 DPI가 CSC 전파를 억제하는 가능한 메커니즘은 미토콘드리아 반응성 산소 종(ROS) 생산을 유도하는 것이라는 가설을 세웠다. 이 가설을 시험하기 위해서, 본 발명자들은 미토콘드리아 ROS 생산에 대한 DPI의 효과를 5 내지 50 nM 범위에서 결정하였다. 간략히, 미토콘드리아에 의한 슈퍼옥사이드의 생산은 MitoSOX™ Red 미토콘드리아 슈퍼옥사이드 지시약(ThermoFisher Sci., M36008)에 의해 측정하였다.  $3 \times 10^5$  MCF7 세포/웰을 10% 열-불활성화된 FBS가 보충된 완전한 배지에서 6-웰 플레이트에 플레이팅하였다. 다음날, 세포를 DPI(5, 50 nM) 또는 로테논(0.5 μM)으로 24시간 동안 처리하였다. 대조군 세포로서 비히클 단독(DMSO)을 병렬로 처리하였다. Fortessa(BD Bioscience)를 사용하여 FACS에 의해 적어도 30,000개의 사건을 기록하였다. 독립적인 실험에서 3개의 생물학적 복제물(반복)을 분석하였다. 결과는 각 실험의 평균값(mean)의 평균(average)이고 대조군에 대해 표준화된 평균 형광 강도의 백분율로 표현된다. 도 9는, 5 nM의 농도에서, DPI가 비히클 단독으로 처리된 대조군 세포에 비해, 임의의 검출가능한 미토콘드리아 ROS 생산을 유도하지 못했음을 보여준다. 그러나, 50 nM DPI는 양성 대조군으로 제공된 500 nM 로테논과 동일한 양의 미토콘드리아 ROS를 유도하였다. 따라서, 맘모스피어 형성을 >50%까지 억제한 것과 동일한 농도의 DPI(5 nM)는 미토콘드리아 ROS 생산을 증가시키지 못하였다. 이와 같이, 암세포의 "줄기세포능"에 대한 저용량 DPI의 효과는 ROS 생산에 의해 간단히 설명될 수 없다.

[0021] DPI의 높은 효능을 고려하여, 본 발명자들은 세포 대사에 신속하게 영향을 미치는 능력을 평가하였다. 도 10은 미토콘드리아 호흡에 대한 DPI의 빠른 작용을 입증한다. 1시간의 DPI 처리 후에도, 미토콘드리아 OCR은 10 내지 100 nM의 농도 범위에서, 점진적으로 감소되었다. 50 nM의 IC-50으로 기저 호흡이 억제되었다. 유사하게, DPI는 반응성 해당작용 표현형을 신속하게 유도하였다. 5 내지 100 nM의 농도 범위에서, 해당작용이 점진적으로 증가되었다. 도 11은 해당작용이 효과적으로 2배로 증가된 것을 보여준다.

[0022] 또한 DPI의 효과는 매우 가역적일 수 있다. DPI 효과의 가역성을 평가하기 위해서, MCF7 세포를 먼저 24시간 동안 DPI 처리하였다. 이후, DPI를 제거하고("세척") 상기 세포를 추가적인 24시간 동안 배양하여, 회복되도록 하였다. 도 12는, 10 nM DPI에서, 단지 24시간 후에, 100%에 근접한, 기저 호흡의 거의 완전한 회복이 있었음을 보여준다(도 12c). 회복이 완전하지는 않았지만, 더 높은 농도는 상당한 회복을 보여주었다. 유사하게, 도 13은 10 nM DPI 및 상기 10 nM "세척" 후 집단에 대한, 기저 호흡, 양성자 누출, ATP-연계 호흡, 및 최대 호흡에 대한 거의 완전한 또는 완전한 회복을 보여준다.

[0023] 또한, 본 발명자들은 세포에 대한 DPI로 장기간 처리의 효과를 조사하였다. MCF7 세포를 다양한 농도의 DPI(10,

25 및 50 nM)의 존재 하에서 1개월 동안 배양하였다. 이후, 미토콘드리아 호흡을 평가하였다. 도 14a는 이들 농도가 모두 호흡의 거의 완전한 억제를 보여줌을 설명한다. 10 nM의 DPI 농도에서, 세포의 형태학 및 밀도는 변하지 않고 유지된다(도 14b).

[0024] 본 발명자들은 DPI가 플라빈-함유 효소(플라빈 모노뉴클레오타이드(FMN), 플라빈 아데닌 디뉴클레오타이드(FAD), 및 리보플라빈)를 억제함으로써 미토콘드리아 호흡을 차단한다는 가설을 세운다. (A) DPI 및 (B) FMN의 구조의 비교를 도 15에 나타낸다. 플라빈-함유 효소는 미토콘드리아 복합체 I의 3개의 단백질 구성요소 - NDUFV1(51 kD), NDUFV2(24 kD) 및 NDUFV3(10 kD)을 포함한다. 또한 SDHA는 미토콘드리아 복합체 II와 크랩스 주기의 일부인 플라보-단백질(flavo-protein)이다. 생물 정보학적 참조 도구로서 GeneCards®를 사용하여, 본 발명자들은 모든 플라빈-함유 유전자 생성물의 ~70%가 미토콘드리아에 국한된 것으로 추정한다(Weizmann Institute of Science, Rehovot, IL). 이와 같이, 본 발명자들은 복합체 I 및 II에서 미토콘드리아를 억제함으로써 DPI 작용을 추측한다. DPI의 작용은 FMN 및/또는 FAD에서 미토콘드리아 결핍의 유도를 통한 것, 및/또는 CSC에서 플라빈-함유 효소의 불활성화에 의한 것일 수 있다. 따라서, 본 발명자들은 DPI, DPI의 유사체, 및 DPI 관련 화합물(예를 들어, 디페닐오도늄 클로라이드)이 CSC를 처리하는데 사용될 수 있을 것으로 예상한다(예를 들어, 도 17 참조). 본 명세서에서 개시된 방법은 예를 들어 항암 활성, 항노화 활성, 방사선증감 활성, 광증감 활성을 포함하는 약학적 효능에 대해 이러한 화합물을 스크리닝하고 검증하는데 사용될 수 있음이 인식되어야 한다.

[0025] 일부 구현예에서, 미토플라보신은 적어도 하나의 막-표적화 신호 및/또는 적어도 하나의 미토콘드리아-표적화 신호의 부착에 의해 미토콘드리아를 표적화하도록 설계될 수 있다. 본 발명의 접근법 하에서, 화합물은 미토콘드리아에 대한 화합물의 특이성을 증가시키는 표적화 신호로 변형될 수 있다. 예를 들어, 도 18은 미토콘드리아를 표적화하기 위해 DPI 또는 DPI-관련 화합물에 첨가될 수 있는 작용기 R의 부착을 위한 위치를 보여준다. 일부 구현예에서, 상기 막-표적화 신호는 팔미트산, 스테아르산, 미리스트산, 및 올레산과 같은 지방산을 포함한다. 이는 막-표적화 신호의 포괄적인 목록이 아니고, 나열되지 않은 막-표적화 신호가 본 발명의 접근법을 벗어나지 않으면서 사용될 수 있음이 인식되어야 한다. 일부 구현예에서, 상기 미토콘드리아-표적화 신호는 트리페닐-포스포늄(TPP), 구아니디늄계 모이어티, 및 콜린 에스테르를 포함한다. 이는 미토콘드리아-표적화 신호의 포괄적인 목록이 아니고, 나열되지 않은 미토콘드리아-표적화 신호가 본 발명의 접근법을 벗어나지 않으면서 사용될 수 있음이 인식되어야 한다.

[0026] 도 18에 나타난 작용기 R은 동일하거나 상이할 수 있고, 이후 확인된 다른 작용기 중에서, 수소, 탄소, 질소, 황, 산소, 불소, 염소, 브롬, 요오드, 카르복실, 알칸, 시클릭 알칸, 알칸계 유도체, 알켄, 시클릭 알켄, 알켄계 유도체, 알카인, 알카인계 유도체, 케톤, 케톤계 유도체, 알데하이드, 알데하이드계 유도체, 카르복실산, 카르복실산계 유도체, 에테르, 에테르계 유도체, 에스테르 및 에스테르계 유도체, 아민, 아미노계 유도체, 아마이드, 아마이드계 유도체, 모노시클릭 또는 폴리시클릭 아렌, 헤테로아렌, 아렌계 유도체, 헤테로아렌계 유도체, 페놀, 페놀계 유도체, 벤조산, 벤조산계 유도체, 및 하나 이상의 미토콘드리아 표적화 신호 중 임의의 것으로부터 선택될 수 있음이 인식되어야 한다. 명확히 하기 위해, 미토콘드리아 표적화 신호는 상기 부착된 분자를 미토콘드리아로 표적화하는 효율을 증가시키는 임의의 화학적 또는 펩타이드 개체로서 정의된다. 이러한 변형은 화합물의 효능 및 효과를 증가시킬 것으로 예상된다. 따라서, R은 다른 것 중에서, 트리-페닐-포스포늄(TPP), 구아니디늄계 모이어티 및/또는 콜린 에스테르와 같은 양이온성 화합물을 포함하는 임의의 미토콘드리아 표적화 신호(펩타이드 또는 화학 물질)일 수 있다.

[0027] DPI는 플라빈-함유 효소를 표적화하므로, 미토콘드리아 기능에 대한 이의 효과는 급성 리보플라빈(비타민 B2) 결핍의 약리학적 유도에 의해 설명될 수 있다. 리보플라빈은 FAD 및 FMN의 생화학적 전구체이다. 이전 연구는, 포유류의 HepG2 세포가 리보플라빈이 없는 배지에서 배양된 경우, 미토콘드리아 복합체 I(NDUFS1; NDUFV2) 및 복합체 II(SDHA)의 주요 구성요소가, AIFM1, DLD, MCAD 및 NQO1과 같은 많은 다른 미토콘드리아-관련 단백질과 같이, 상당히 (최대 5배까지) 감소됨을 보여주었다. 또한, 이전 데이터는 플라빈이, 증가된 미토콘드리아 력 및 상승된 CSC 활성의 자가 형광 마커임을 보여주었다. 따라서, DPI, DPI의 유사체, 및 DPI-관련 화합물은 플라빈을 표적화함으로써 CSC를 치료하는데 사용될 수 있다.

[0028] DPI가 (FMN과 같이) 플라빈-결핍의 급성 및 가역적 유도를 통한 미토콘드리아 호흡의 억제를 통해 CSC를 근절할 수 있으므로, 본 발명자들은 리보플라빈-결핍을 급격하게 유도하는 메커니즘(들) 또한 CSC를 치료적으로 근절하는데 유용할 수 있다는 가설을 세운다. 급성 리보플라빈 결핍을 유도하는 다른 방법은 리보플라빈의 "우세한 네거티브(dominant-negative)" 유도체를 사용하는 것일 수 있다. 또한 이들 리보플라빈 유도체는 이들의 효능을 증가시키기 위한 화학 작용기를 첨가함으로써 향상될 수 있다. 예를 들어, 로제오플라빈(Roseoflavin)[8-디메틸

-8-(디메틸아미노)-리보플라빈 또는 8-디메틸아미노리보플라빈]은 리보플라빈의 유도체인 자연 발생적 항균 화합물이고, 이는 CSC를 표적화하는 이의 잠재력을 최적화하기 위해 화학적으로 변형될 수 있다. 루미크롬(Lumichrome)(7,8-디메틸알록사진)은 리보플라빈 분해의 형광 광생성물이고, 이 또한 CSC를 표적화하는 이의 잠재력을 최적화하기 위해 화학적으로 변형될 수 있다. 리보플라빈의 다른 통상의 유도체는: 알록사진, 루미플라빈, 1,5-디하이드로리보플라빈 및 1,5-디하이드로플라빈을 포함한다. 이들 리보플라빈의 유도체는 미토콘드리아로 표적화하는 이들의 효율을 증가시키도록 막-표적화 신호 또는 미토콘드리아-표적화 신호, 예컨대 i) 지방산 모이어티 또는 ii) TPP(트리페닐 포스포늄) 모이어티의 첨가에 의해 변형될 수 있다. 이들 미토콘드리아적으로-표적화된 개체는 미토콘드리아 기능을 억제하는 리보플라빈의 유도체 화합물인 "미토플라빈"으로 지칭될 수 있다. 미토플라빈의 예는 도 18에 제공되고, 여기서 FA는 지방산 모이어티를 나타내고 TPP는 트리페닐 포스포늄 모이어티를 나타낸다.

[0029] 본 발명자들은 미토콘드리아에 대한 DPI의 효과에 대한 추가적인 메커니즘은 미토콘드리아 복합체 I에서 숙시네이트로부터의 역방향 전자 수송을 방지하고, 순방향 전자 수송에 영향을 미치지 않으면서, ROS 생산(즉, 슈퍼옥사이드 음이온)을 억제하는 것이라는 가설을 세운다. DPI는 미토콘드리아 호흡 동안, 불필요한 ROS 생산 및 세포 손상에 기여하는 원하지 않는 부산물의 생산을 방지한다.

[0030] 추가적인 증거는 다른 비타민의 대사를 표적화하는 것이 암 치료 전략으로서 사용될 수 있음을 보여준다. 항-엽산제(anti-folate)는 엽산의 작용을 차단하거나 방해하는 항-대사물질이다. 대부분의 항-엽산제 약물은 디하이드로폴레이트 리덕타아제(DHFR)를 표적화함으로써 이의 효과를 발휘한다. 엽산은 메타이오닌, 세린, 퓨린 및 티미딘 생합성을 추진하는 많은 생합성 효소(즉, 메틸트랜스퍼라아제)를 위한 보조-인자 역할을 한다. FDA-승인 항-엽산제 약물의 예는: 메토티렉세이트(Methotrexate); 페메트렉시드(Pemetrexed); 프로구아닐(Proguanil); 피리메타민(Pyrimethamine); 및 트리메토프림(Trimethoprim)을 포함한다. 항-엽산제의 작용은 특히 DNA-합성(세포 주기의 S기) 동안, 신속하게 분열하는 세포를 우선적으로 표적화한다. 현재, 메토티렉세이트 및 페메트렉시드는 골육종, 비소세포 폐암, 중피종 및 혈액암과 같은 다양한 암 유형의 치료에 일상적으로 사용된다. 따라서, 항-엽산제 치료법은 암 및 다양한 감염성 기생충 질환, 예컨대 말라리아, 독소플라스마증 및 뉴모시스티스성 폐렴을 치료하기 위한 성공적인 전략으로 여겨진다. 그러나, 항-엽산제는 정상 세포의 전파에도 영향을 미쳐, 메스꺼움, 구토, 복통, 무과립구증 및 무형성 빈혈(골수 저해)을 유발하기 때문에, 상당한 부작용을 또한 갖는다. DPI, DPI의 유사체, 및 DPI-관련 화합물(예를 들어, 디페닐요오도늄 클로라이드)을 이용한 플라빈 표적화는 이러한 현재의 치료에 비해 개선된 결과를 제공할 수 있다.

[0031] 미토콘드리아는 노화 과정에 직접적으로 관련되어 있다. 하지만, 이들의 정확한 역할은 격론의 주제로 남아있다. 본 발명자들은 DPI가 정상 세포를 노화 과정을 늦추거나 역전시키는데 매우 유용할 수 있는, 동면과 유사한, 대사 정지 상태 또는 "가사 상태"로 유지하는데 사용될 수 있다는 가설을 세운다. 이런 주장을 뒷받침함에 있어서, *C. elegans*의 이전 연구는 DPI가 산화 스트레스에 대한 응답 동안, 리포푸신(노화 관련 부산물 또는 마커)의 축적을 방지함을 보여주었다.

[0032] 본 발명의 상세한 설명에서 개시된 용어는 특정 구현예를 개시하기 위한 목적일 뿐이며, 본 발명을 제한하기 위한 의도는 아니다. 본 발명의 상세한 설명 및 첨부된 청구항에서 사용된 것과 같이, 단수 형태인 "한", "하나", 및 "상기"는, 문맥이 달리 명확하게 나타내지 않는 한, 복수 형태도 역시 포함하기 위한 의도이다. 본 발명의 상세한 설명의 고려로부터 명확하게 되는 것과 같이, 본 발명은 무수한 대안, 변형, 및 등가물을 포함한다.

[0033] "제1", "제2", "제3", "a)", "b)", 및 "c)" 등의 용어가 본 발명의 다양한 요소를 개시하기 위해 본 명세서에서 사용될 수 있지만, 이들 용어에 의해 제한되어서는 안됨이 인식될 것이다. 상기 용어들은 본 발명의 한 요소를 다른 요소와 구별하기 위해서만 사용된 것이다. 따라서, 하기 논의된 제1 요소는 요소 측면에서의 용어일 수 있고, 유사하게 본 발명의 사상을 벗어나지 않으면서 제3 요소가 될 수 있다. 따라서, "제1", "제2", "제3", "a)", "b)", 및 "c)" 등의 용어는 관련 요소들에게 순서 또는 다른 체계를 필수적으로 전달하기 위한 의도는 아니며, 확인을 위한 목적으로만 사용된다. 작동(또는 단계)의 순서는 청구항에서 제공된 순서에 한정되는 것은 아니다.

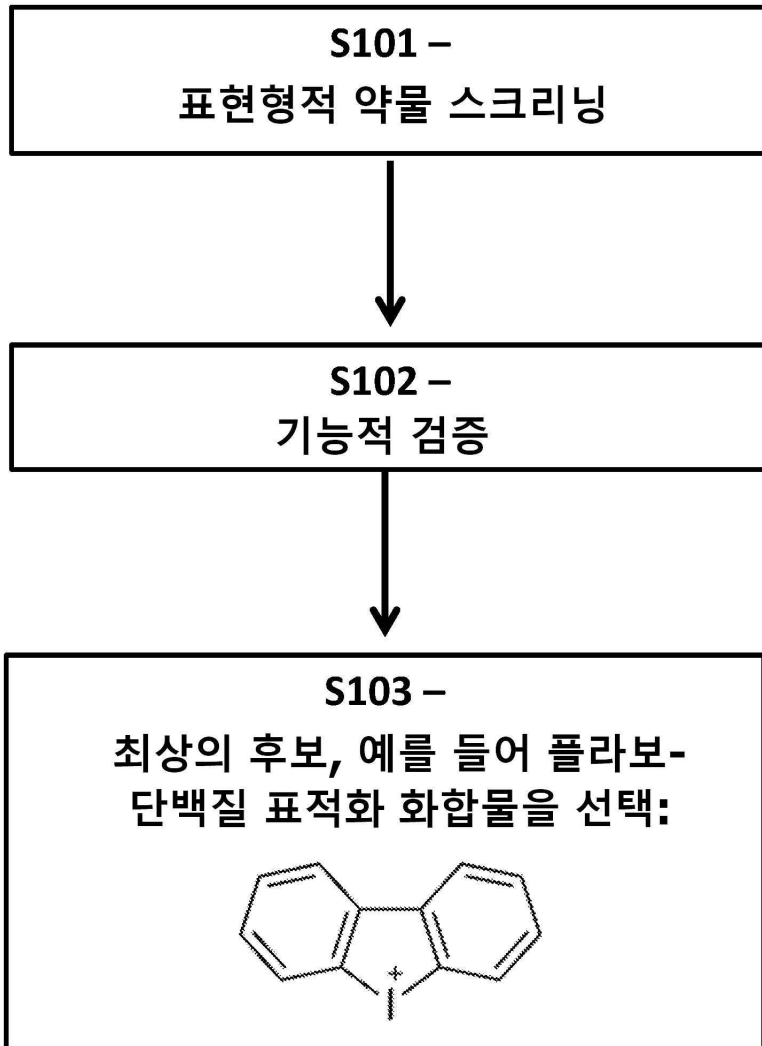
[0034] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 용어(기술적 및 과학적 용어 포함)는 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 기술자에 의해 보통 인식되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 보통 사용되는 사전에서 정의된 것과 같은 용어는 본 출원 및 관련 기술의 문맥에서의 의미와 일치되는 의미를 갖는 것으로 해석되어야 하고, 본 명세서에서 명시적으로 나타내지 않는 한 이상적이거나 매우 공식적인 의미로 해석되어서는 안됨이 추가로 인식될 것이다. 본 발명의 명세서에서 사용된 용어는 특정 구현예를 개시하기 위한 목적일 뿐이며, 본 발명의 범위

를 제한하기 위한 의도는 아니다. 본 명세서에 인용된 모든 공개문헌, 특허 출원, 특허 및 다른 참조문헌은 그 전체가 인용에 의해 포함된다. 명칭에 있어서 상충되는 경우, 본 발명의 명세서가 조정한다.

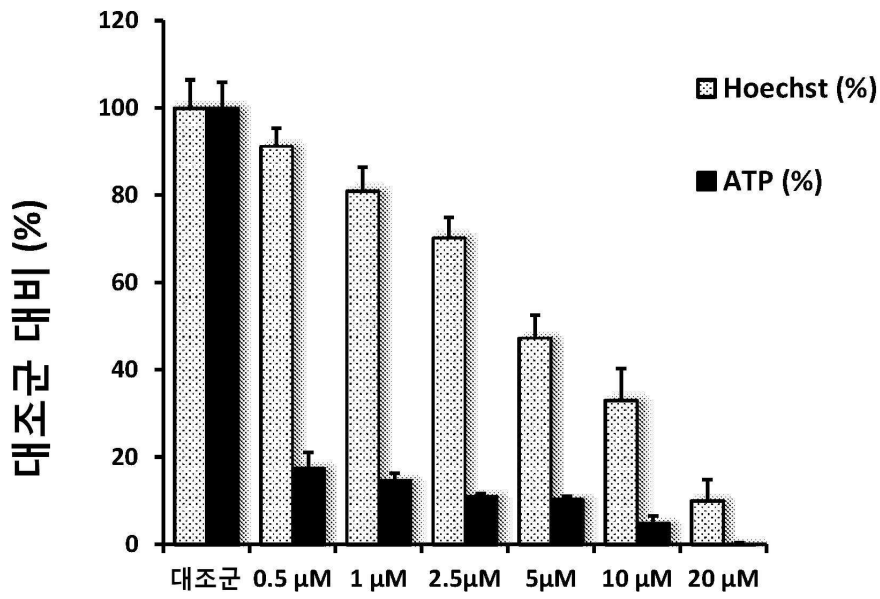
- [0035] 본 명세서에서 사용된 것과 같이, "및/또는"은 하나 이상의 연관된 목록의 아이템의 임의의 및 모든 가능한 조합뿐만 아니라, 대안적인 ("또는")으로 해석될 때는 조합의 부재를 나타내고 포괄한다.
- [0036] 문맥이 달리 나타내지 않는 한, 본 명세서에 개시된 본 발명의 다양한 특징들은 임의의 조합으로 사용될 수 있음을 구체적으로 의도한다. 아울러, 본 발명은 또한 본 발명의 일부 구현예에서 본 명세서에 개시된 임의의 특징 또는 특징들의 조합이 배제 또는 생략될 수 있음을 고려한다. 설명을 위하여, 본 명세서가 구성요소 A, B 및 C를 포함하는 복합체를 개시한다면, 이는 임의의 A, B 또는 C, 또는 그의 조합이 생략 및 배제될 수 있음을 구체적으로 의도하는 것이다.
- [0037] 본 명세서에 나타난 것과 같이, 과도기적 구인 "필수적으로 이루어지는"(및 문법적 변이체)은 언급된 물질 또는 단계와, 본 발명에서 청구된 "기본적이고 신규한 특징(들)에 물질적으로 영향을 미치지 않는 것들"을 포괄하는 것으로 해석되어야 한다. 따라서, 본 명세서에서 사용된 것과 같은 "필수적으로 이루어지는"이란 용어는 "포괄하는"과 등가인 것으로 해석되어서는 안된다.
- [0038] 본 명세서에서 사용된 것과 같은 "약"이란 용어는, 예를 들면, 양 또는 농도 등과 같은 측정가능한 수치를 나타낼 때, 특정된 양의  $\pm 20\%$ ,  $\pm 10\%$ ,  $\pm 5\%$ ,  $\pm 1\%$ ,  $\pm 0.5\%$ , 또는 심지어  $\pm 0.1\%$ 의 변동을 포괄하는 것을 의미한다. 측정가능한 수치에 대해 본 명세서에서 제공되는 범위는 그 안의 임의의 다른 범위 및/또는 개별 수치를 포함할 수 있다.
- [0039] 본 발명의 소정 구현예가 상기에 개시되었지만, 첨부된 청구항에 의해 정의된 본 발명은 상기 개시된 특정한 설명에 의해 제한되어서는 안되는데, 그 이유는 그의 많은 명백한 변동들이 청구항에서 개시된 사상 또는 범위를 벗어나지 않고서도 가능하기 때문임이 인식되어야 한다.

도면

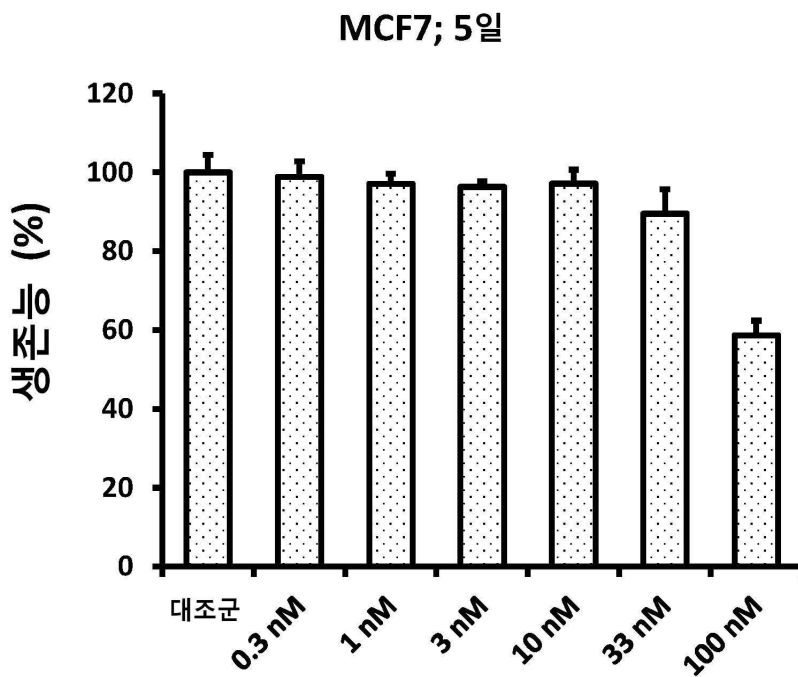
도면1



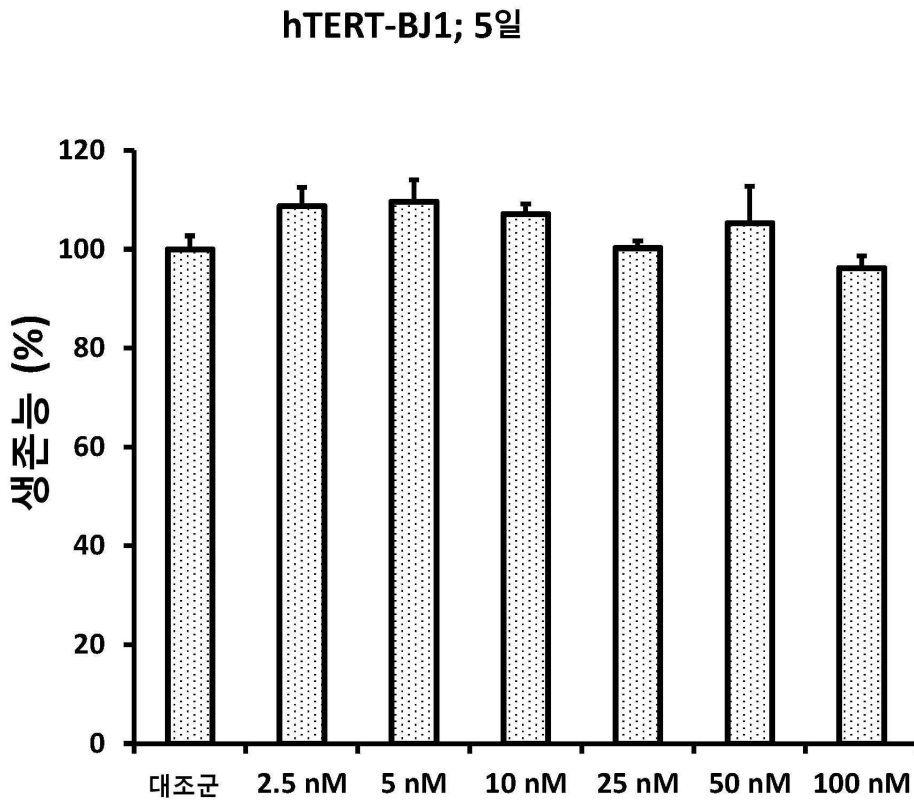
도면2



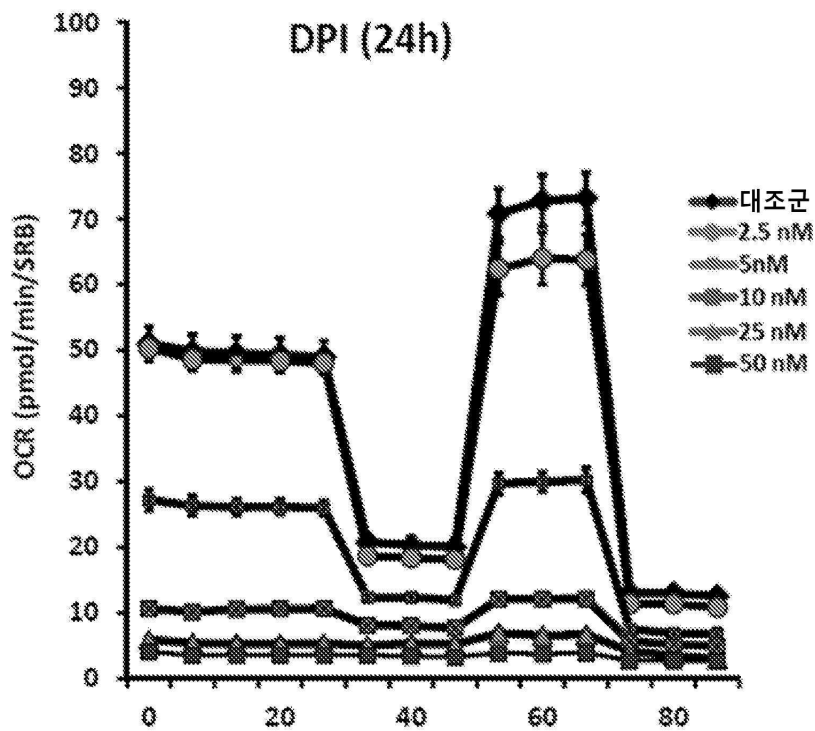
도면3a



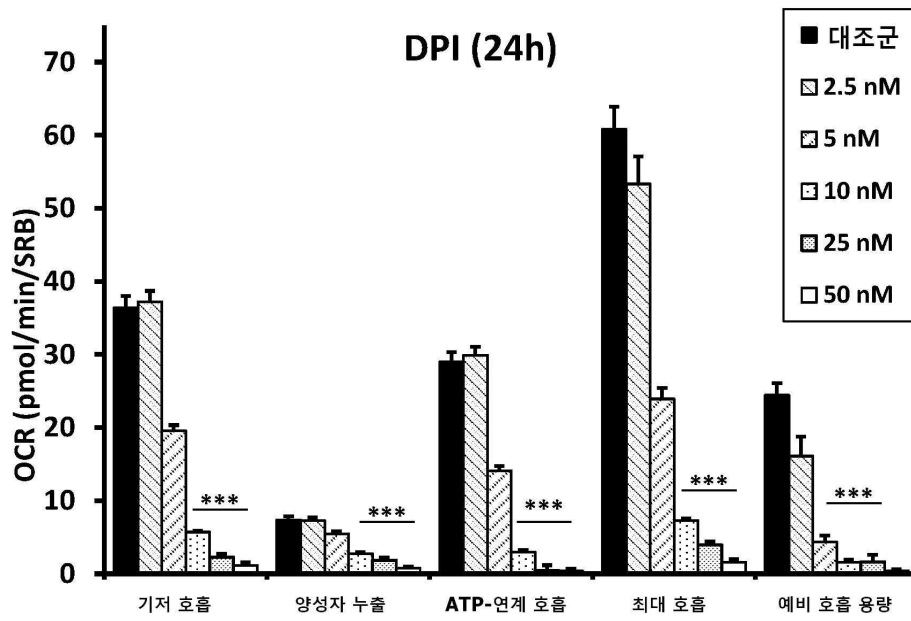
도면3b



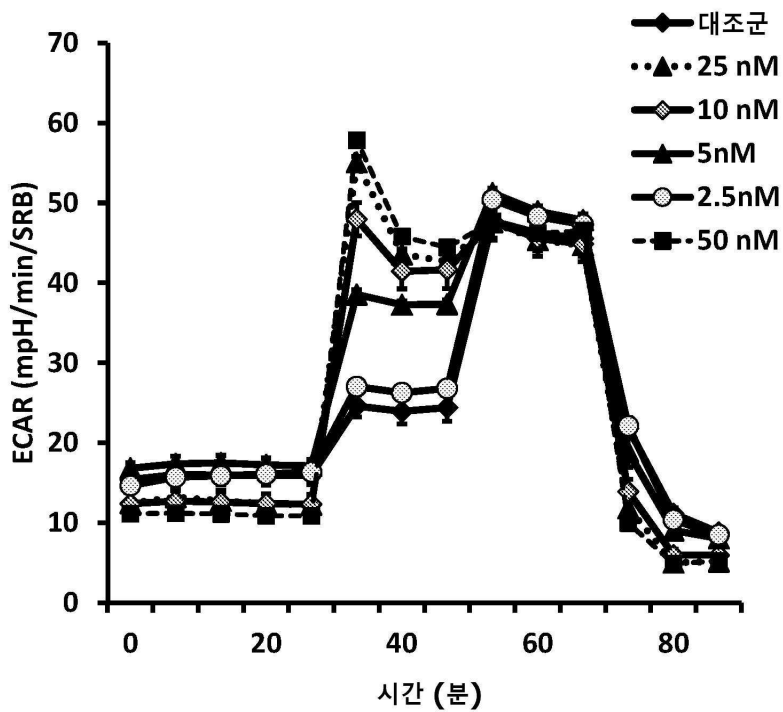
도면4a



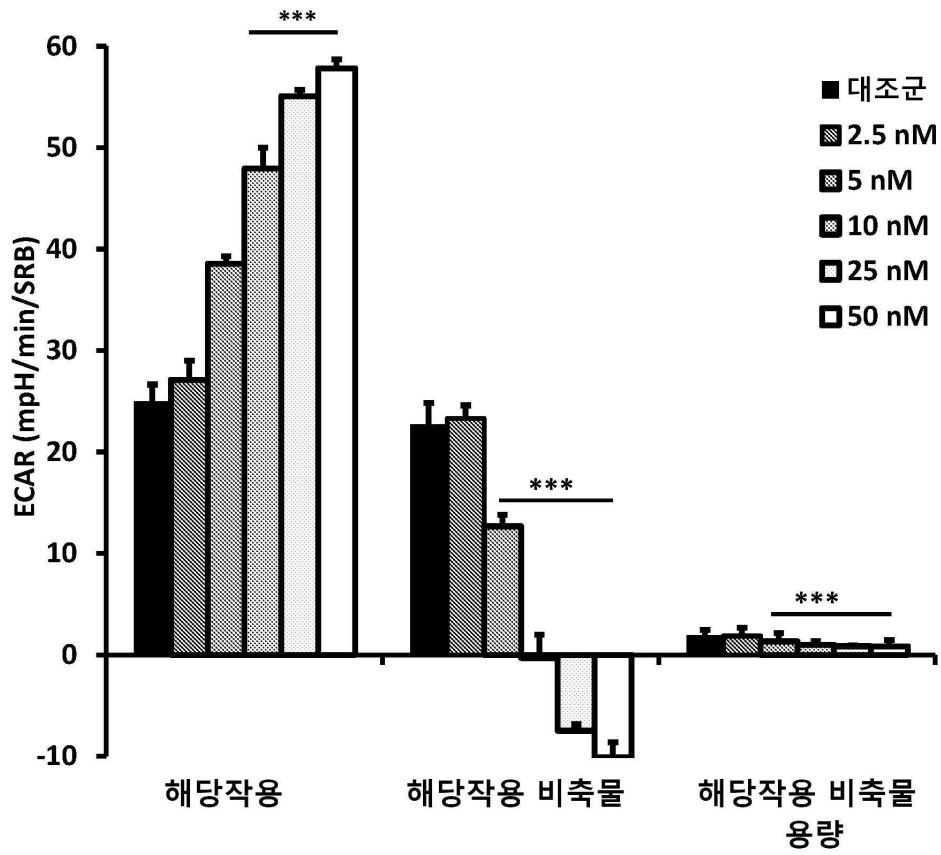
도면4b



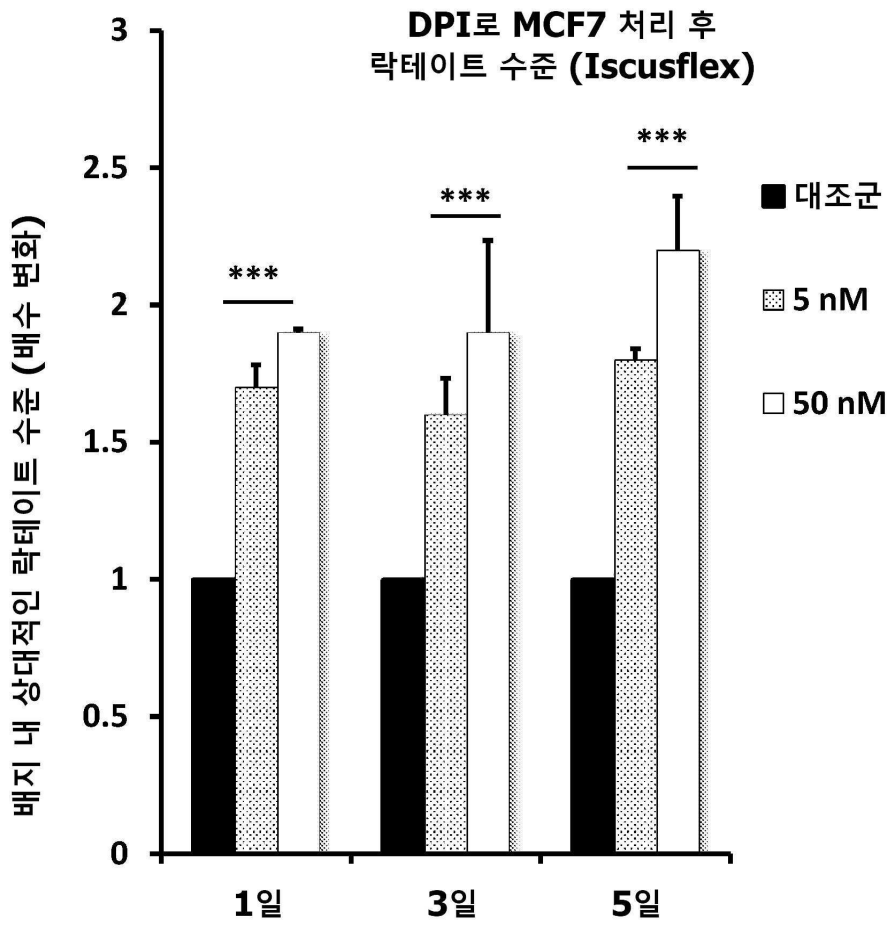
도면5a



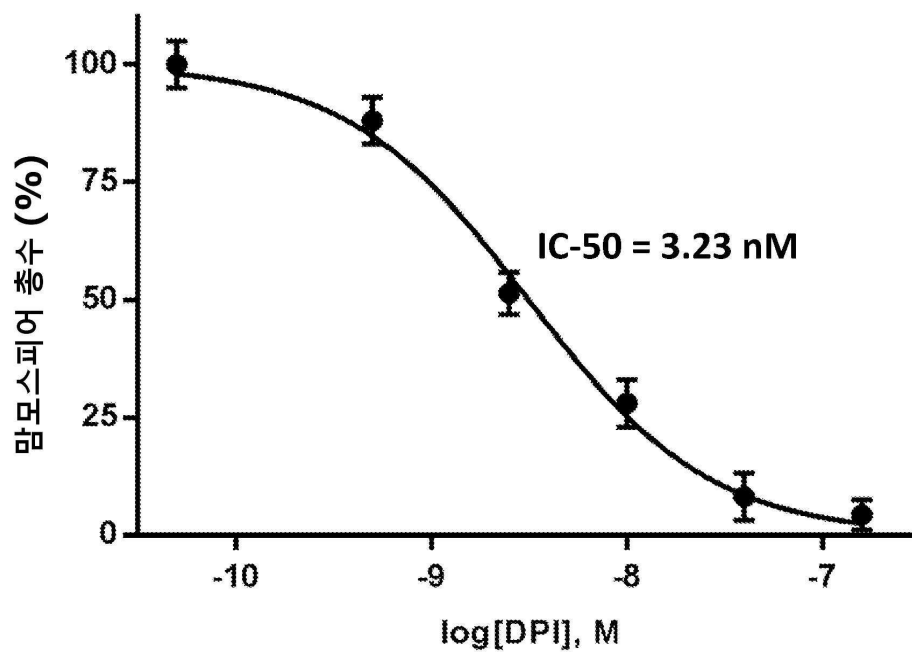
도면5b



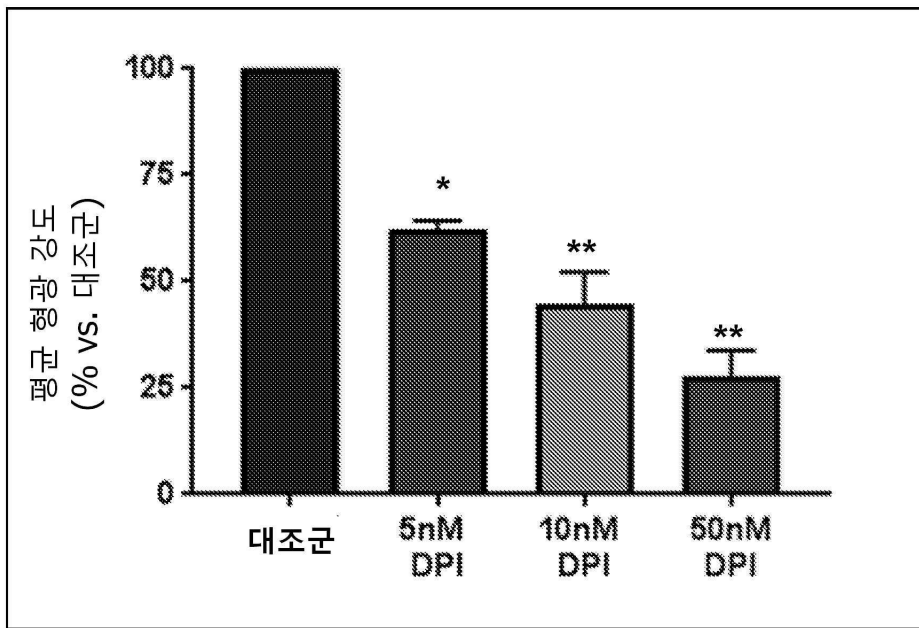
도면6



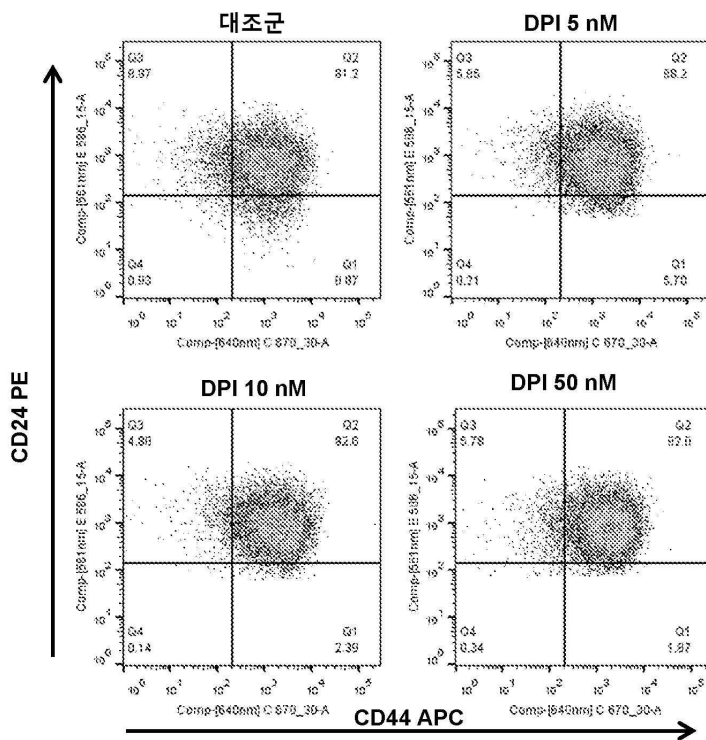
도면7



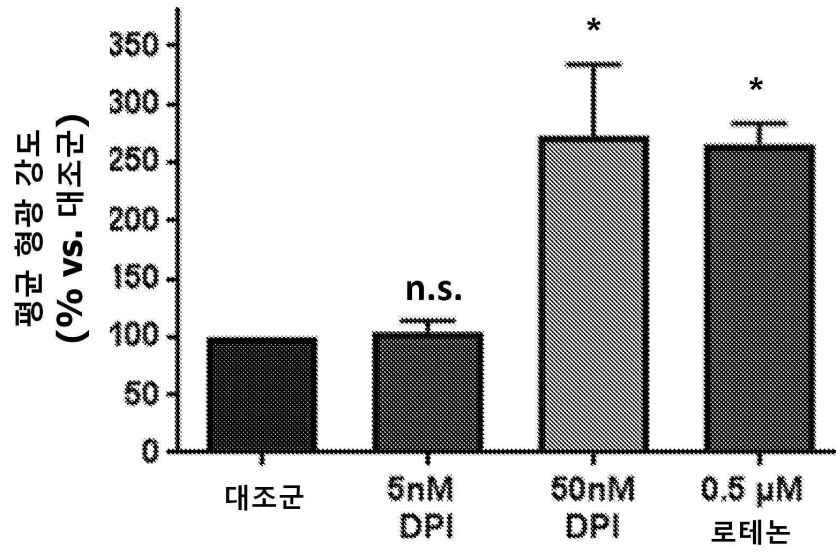
도면8a



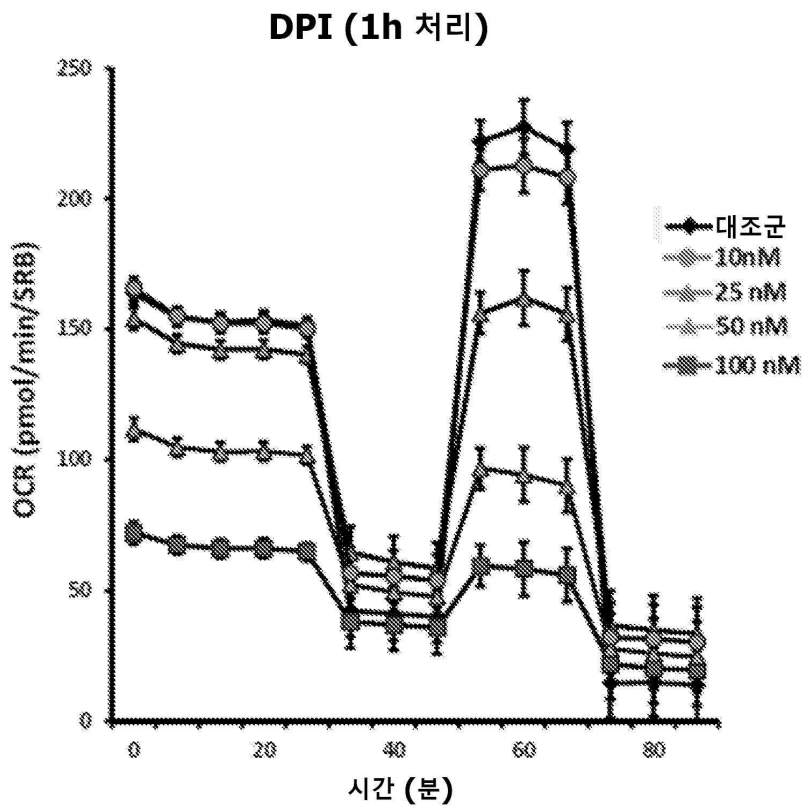
도면8b



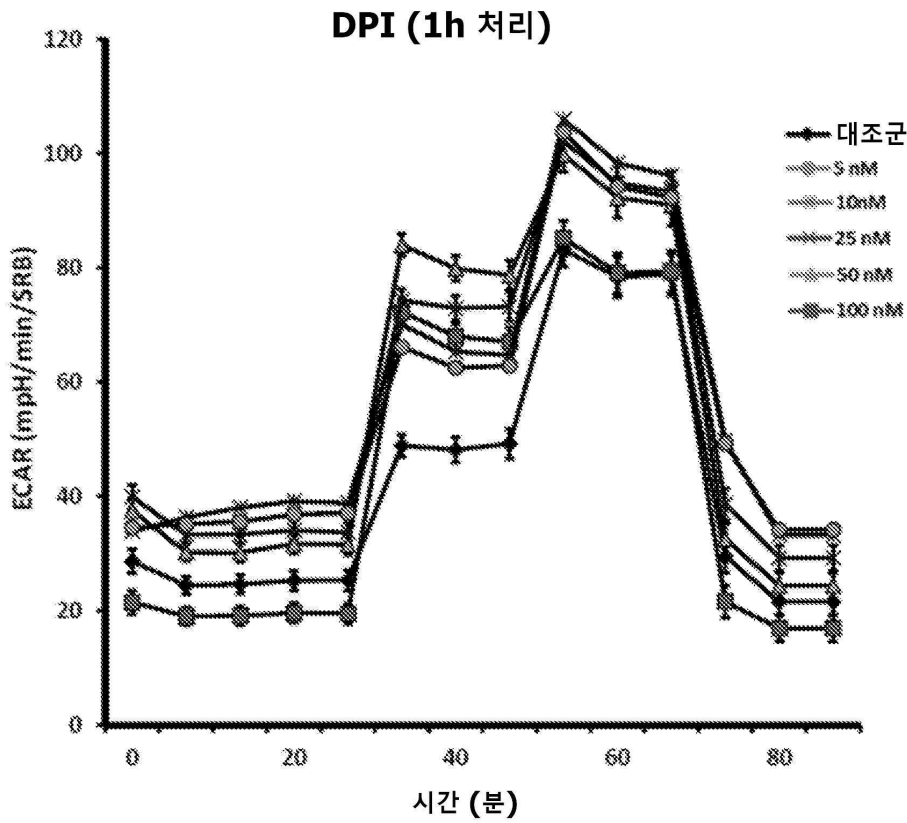
도면9



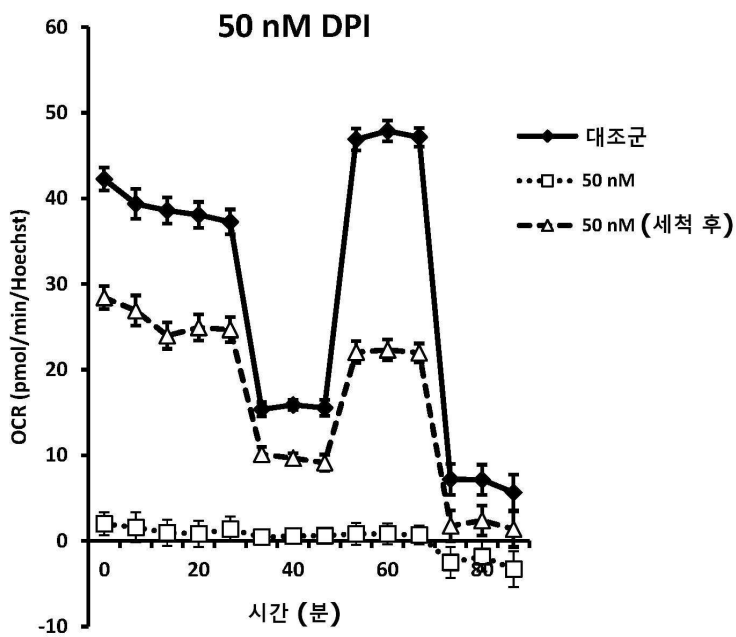
도면10



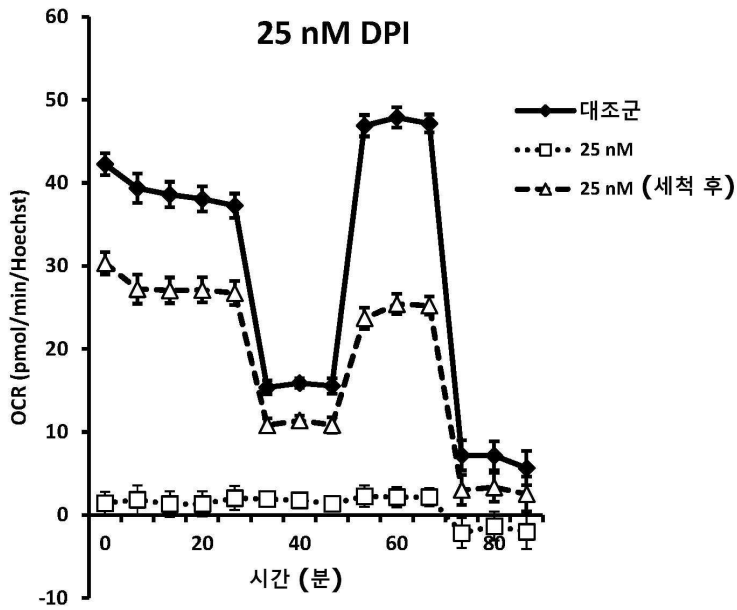
도면11



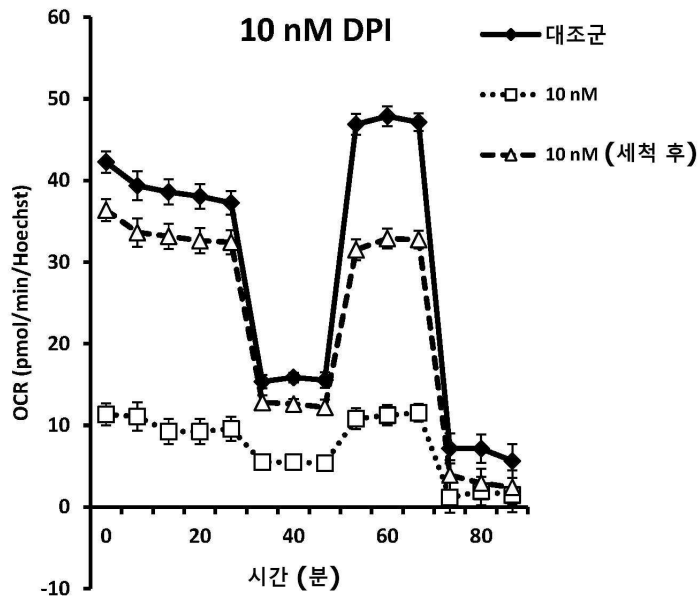
도면12a



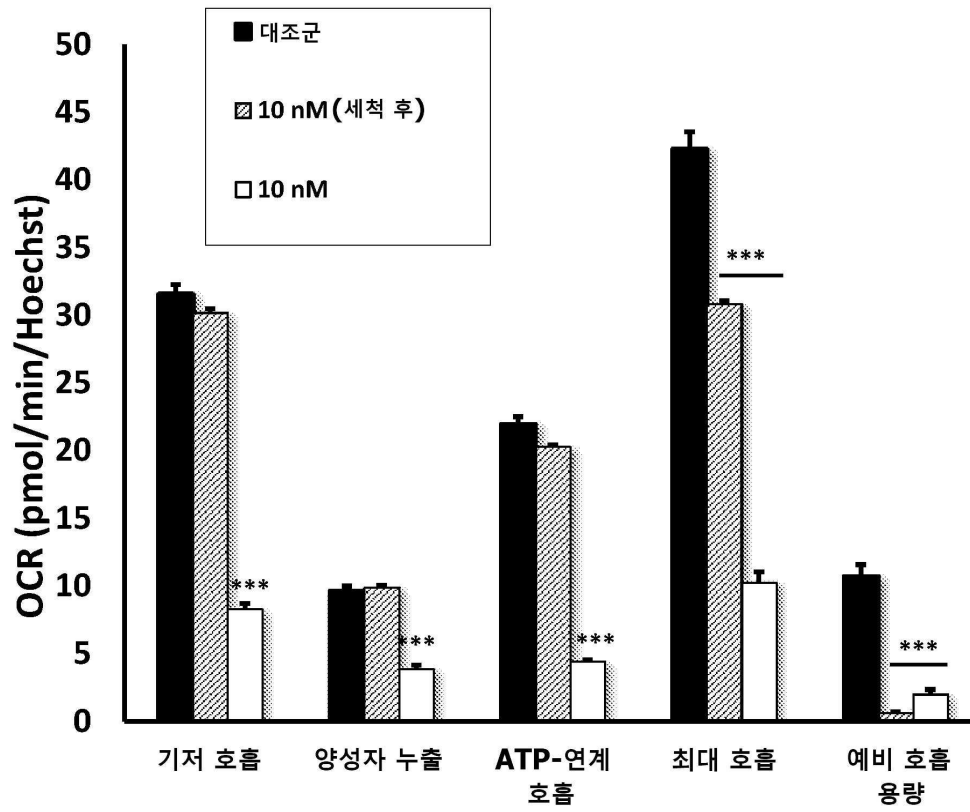
도면12b



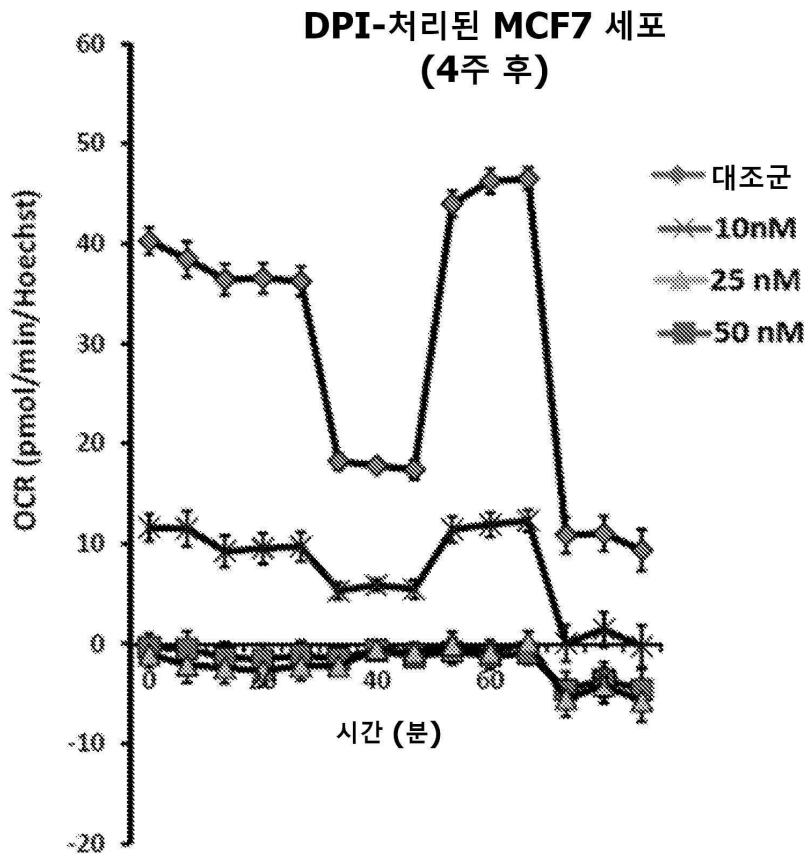
도면12c



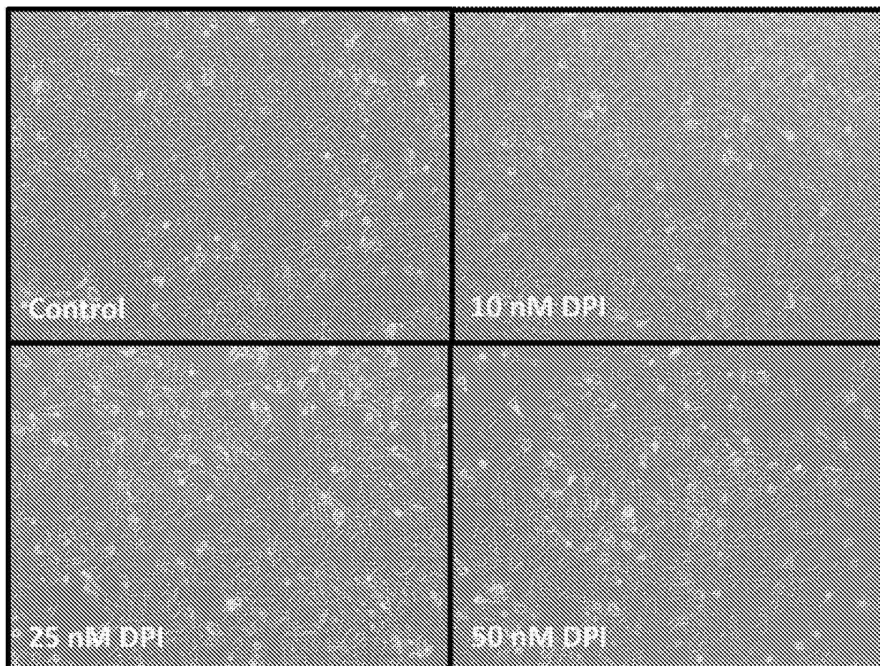
도면13



도면14a



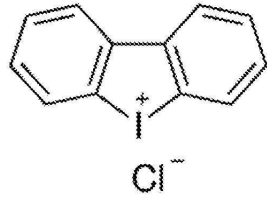
도면14b



도면15

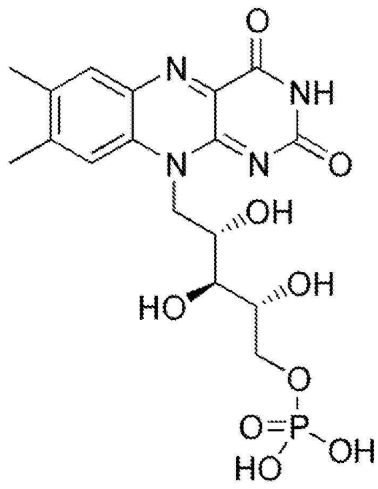
**DPI**

**A**



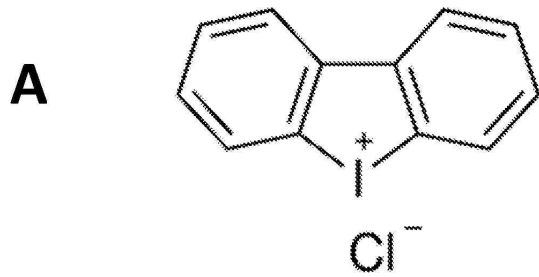
**FMN**

**B**

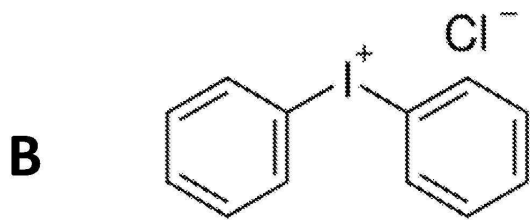


도면16

디페닐렌요오도늄 클로라이드

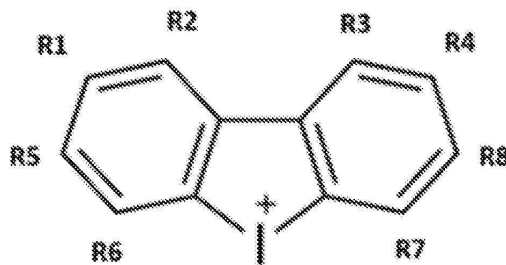


디페닐요오도늄 클로라이드

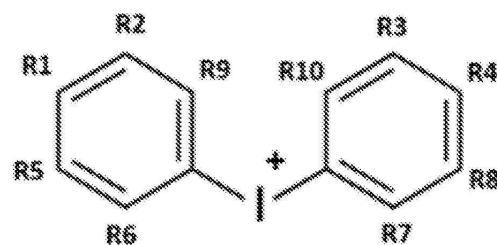


도면17

**DPI**



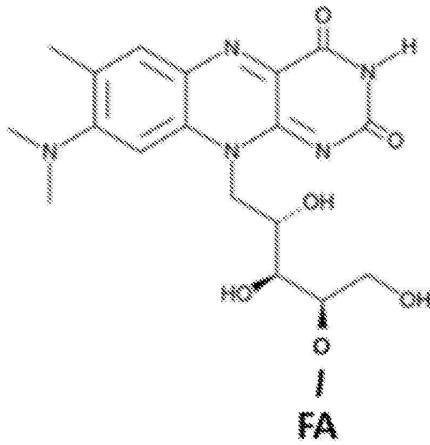
**DPI  
관련**



도면18

"미토플라빈"

로제오플라빈-FA



로제오플라빈-TPP

