



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0033421
(43) 공개일자 2025년03월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/421 (2006.01) A61P 39/06 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/421 (2013.01)
A61P 39/06 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2023-0113722
(22) 출원일자 2023년08월29일
심사청구일자 2023년08월29일

(71) 출원인
인천대학교 산학협력단
인천광역시 연수구 갯벌로 27, 인천대학교 이노베이션센터(송도동)
고려대학교 세종산학협력단
세종특별자치시 조치원읍 세종로 2511 (고려대학교세종캠퍼스내)
(72) 발명자
박준태
인천광역시 연수구 해송로 143, 101동 703호
이윤행
서울특별시 동작구 여의대방로44길 10, 111동 801호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
차준용

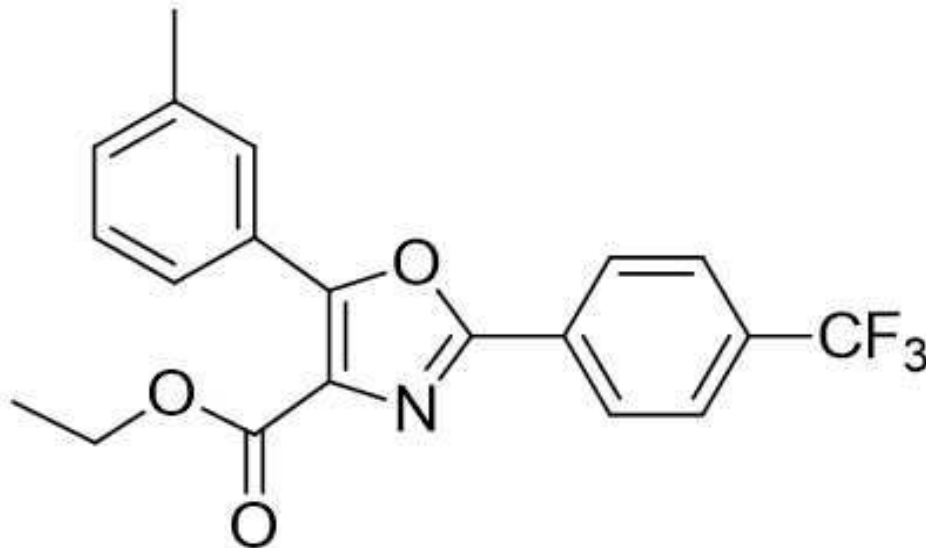
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 옥사졸 유사체를 유효성분으로 포함하는 항노화 조성물

(57) 요약

본 발명의 일실시예는 옥사졸 유사체를 유효성분으로 포함하는 항노화 조성물을 제공한다. 상기 조성물은 노화로 인해 나타나는 여러 표현형(phenotype)들을 약화시킬 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 일실시예에 따른 조성물은 활성산소(ROS)를 감소시킬 수 있고, 해당 과정(glycolysis)에 대한 의존성을 낮출 수 있다. 또한, 텔로미어(telomere)길이를 증가시킬 수 있으며, 미토콘드리아 막전위를 증가시킴으로써 미토콘드리아 기능을 회복시킬 수 있다.

대표도 - 도28



(52) CPC특허분류

A61P 43/00 (2018.01)

(72) 발명자

권형욱

서울특별시 서초구 효령로4길 56-16, 201호

변영주

대전광역시 유성구 엑스포로 448, 206동 408호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711185822
과제번호 2021R1A2C1004298
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 중견연구자지원사업
연구과제명 미토콘드리아 대사 기반 통합적 노화 제어
기 여 율 2/10
과제수행기관명 인천대학교 산학협력단
연구기간 2021.03.01 ~ 2024.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345358417
과제번호 2021R1A6C101A432
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국기초과학지원연구원
연구사업명 이공학학술연구기반구축
연구과제명 핵심연구지원센터조성지원과제(Cell to In-vivo 이미징 핵심연구지원센터)
기 여 율 0.2/10
과제수행기관명 가천대학교 산학협력단
연구기간 2021.06.01 ~ 2027.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 146504099
과제번호 HP23C0024
부처명 보건복지부
과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원
연구사업명 혁신성장 피부건강 기반기술 개발사업
연구과제명 활성 산소 억제를 통한 피부 역노화 기술 개발
기 여 율 2/10
과제수행기관명 인천대학교 산학협력단
연구기간 2023.07.01 ~ 2025.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345366487
과제번호 2020R1A6A1A03041954
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 대학중점연구소지원사업
연구과제명 융복합기반기술을 이용한 감염병 매개곤충 제어 플랫폼 구축
기 여 율 0.8/10
과제수행기관명 인천대학교 산학협력단
연구기간 2020.05.01 ~ 2023.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345362117
과제번호 2019R1A6A1A03031807
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명	대학중점연구소 지원사업
연구과제명	약과학연구소
기 여 율	3/10
과제수행기관명	고려대학교 세종산학협력단
연구기간	2019.06.01 ~ 2028.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업	
과제고유번호	1711180289
과제번호	2020M3E5D9080795
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	뇌질환극복연구사업
연구과제명	P2RX7-NLRP3-cytokine 네트워크 표적 신규 선도물질 발굴 및 약물 최적화 연구
기 여 율	2/10
과제수행기관명	고려대학교 세종산학협력단
연구기간	2020.07.01 ~ 2024.12.31

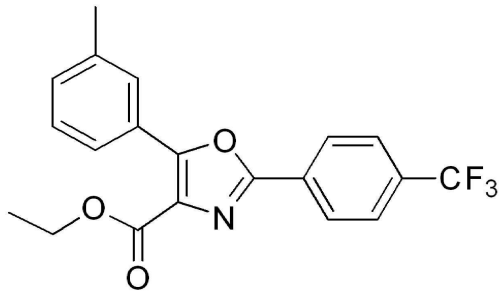
명세서

청구범위

청구항 1

하기 [화학식 1]로 표시되는 옥사졸(oxazole) 유사체를 유효성분으로 포함하는 항노화 조성물.

[화학식 1]



청구항 2

제1항에 있어서,

상기 조성물은 ROS(Reactive Oxygen Species)를 감소시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 조성물은 해당 과정(Glycolysis) 의존성을 감소시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 조성물은 텔로미어(telomere) 길이를 증가시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 조성물은 미토콘드리아 질량을 감소시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 조성물은 미토콘드리아 막전위(Mitochondrial membrane potential)를 증가시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 조성물은 세포질에서 리포푸신(lipofuscin)을 감소시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

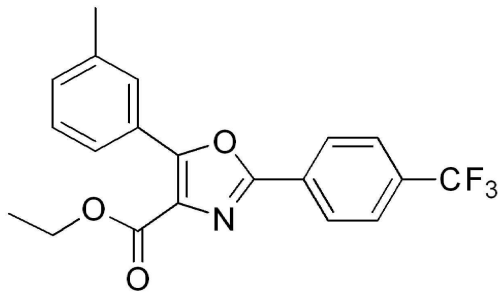
제1항에 있어서,

상기 조성물은 ENO1(alpha-enolase)에 결합하여 ENO1를 인산화(phosphorylation)시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

하기 [화합식 1]로 표시되는 옥사졸(oxazole) 유사체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 미토콘드리아 관련 질환의 증상을 예방, 억제 또는 치료하는 약학 조성물.

[화합식 1]



청구항 10

제9항에 있어서,

상기 미토콘드리아 관련 질환은 미토콘드리아 장애에 관련된 질환으로서, 근간대성 간질(Myoclonic epilepsy); 불균일 적색근육 섬유를 갖는 근간대성 간질(Myoclonic Epilepsy Associated with Ragged-Red Fibers)(MERRF), 레버씨 선천성 시신경병증(Leber's Hereditary Optic Neuropathy)(LHON), 신경병증 실조 망막색소변성(neuropathy ataxia and retinitis pigmentosa)(NARP), 미토콘드리아 근병증, 뇌병증, 고젖산혈증, 뇌졸중(Mitochondrial Myopathy, Encephalopathy, Lactacidosis, Stroke)(MELAS), 레이 증후군(Leigh syndrome), 레이-유사 증후군(Leigh-like syndrome), 우성유전 시신경 위축(Dominant Optic atrophy)(DOA), 쾨스-세이어 증후군(Kearns-Sayre Syndrome)(KSS), 모계유전 당뇨병 및 난청(Maternally Inherited Diabetes and Deafness)(MIDD), 알퍼스-후텐로처 증후군(Alpers-Huttenlocher syndrome), 실조 신경병증 스펙트럼(Ataxia Neuropathy spectrum), 만성 진행성 외안근마비(Chronic Progressive External Ophthalmoplegia)(CPEO), 피어슨 증후군(Pearson syndrome), 미토콘드리아 신경위장관 뇌병증(Mitochondrial Neuro-Gastro-Intestinal Encephalopathy)(MNGIE), 쎅거즈 증후군(Sengers syndrome), 3-메틸글루타콘 산성뇨, 감각신경성 난청, 뇌병증 및 레이-유사 증후군의 신경-방사선적 발견(MEGDEL), 근병증, 미토콘드리아 근병증, 심근증(cardiomyopathy), 및 뇌근병증(encephalomyopathy), SURF1(복합체 IV 과다 단백질 결핍(complex IV surfeit protein deficiency)으로 인한 COX 결핍 레이 증후군)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 약학 조성물.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 미토콘드리아 관련 질환은 미토콘드리아 기능이상과 관련된 질환으로서, 프리이드라이히 실조(Friedreich's Ataxia)(FRDA), 콩팥 요세관 산증(renal tubular acidosis), 파킨슨병(Parkinson's disease), 알츠하이머병, 근위축 측삭 경화증(amyotrophic lateral sclerosis)(ALS), 헌팅톤병(Huntington's disease), 전반적 발달 장애(developmental pervasive disorder), 청력 소실(hearing loss), 난청(deafness) 및 당뇨병으로 이루어진 군으로부터 선택되는 약화 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 항노화 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 옥사졸 유사체를 유효성분으로 포함하는 항노화 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 노화에 관한 연구는 과거로부터 현재에 이르기까지 지속되고 있다. 이는 노화가 질병을 일으킬 수 있는 질병 유발인자 중 하나이기 때문이다. 세포분열이 정지된 상태가 영구적으로 지속되는 단계를 세포의 노화로 규정하며, 이는 근본적인 노화의 기작으로서 암, 동맥경화 및 퇴행성관절염과 같은 노화에 따른 질병들을 유발하는 원인으로 조명되고 있다. 노화에 대한 연구 초기 생물학자들은 생체조직의 노화는 더 이상 분화하지 않는 세포들에 의한 주변세포들의 복구 기작의 억제에 의한 것이라 추측하였다. 더 이상 분화하지 않는 세포란 현재는 노화세포(senescent cells; SNC)라 불리며, 노화세포는 손상된 세포조직의 복구에 참여하지 않을 뿐만 아니라, 노화세포에서 분비되는 물질들에 의한 염증세포의 이동, 세포외부환경(extracellular matrix)의 재구성, 원치 않는 세포사멸 및 섬유증(fibrosis) 등을 유발한다고 알려져 있다. 이러한 노화세포는 노화에 따라 자연스럽게 축적되며, 이는 세포조직의 손상을 누적시키게 된다.

[0004] 현재 연구되는 기술들은 노화세포를 선택적으로 제거할 수 있으며, 이는 수많은 노화 관련 질환을 예방하고 치료하는 방법을 개발하는 데 있어 많은 가능성을 제공하게 되었다. 치료법을 크게 나누어 보면 senolysis, 면역력을 통한 노화세포의 제거 그리고 SASP의 무력화 등이 있다. 이 중에서 노화세포의 영구적인 제거는 SASP의 지속적인 감소를 유도할 뿐만 아니라 만일 노화세포가 살아남아 야기할 수 있는 암 생성의 위험성 또한 감소시킬 수 있다. 하지만, 이러한 기술들을 적용하기에 앞서 고려해야 될 사항들이 있다. 우선, 어떤 세포로부터 어떤 방법으로 노화세포를 유도하여 어떤 질병모델에 적용해야 할지 고려해야 한다. 그리고 실제 마우스 실험에 적용 시에 스트레스를 주거나, 수술을 통해 노화세포를 유도하거나 또는 나이 든 마우스를 이용하기도 하는데, 이중 어떤 방법으로 유도해야 할지도 중요한 것이다. 하지만 여전히 노화에 대한 연구는 그 성과를 아직 맺지 못하고 있고, 이에 따라서 노화를 억제시킬 수 있는 신규한 물질이나 방법의 개발이 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 옥사졸 유사체를 유효성분으로 포함하는 항노화 조성물을 제공하는 것이다.

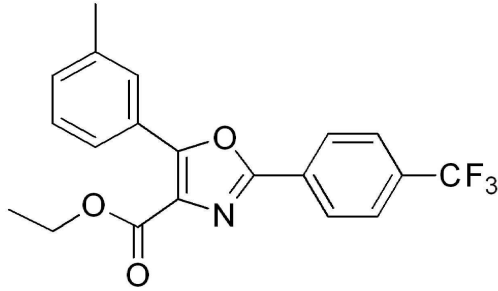
[0007] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 기술적 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 기술적 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 기술적 과제를 달성하기 위하여, 본 발명의 일실시예는 하기 [화학식 1]로 표시되는 옥사졸(oxazole) 유사

체를 유효성분으로 포함하는 항노화 조성물을 제공한다.

[화학식 1]



본 발명의 실시예에 있어서, 상기 조성물은 ROS(Reactive Oxygen Species)를 감소시킬 수 있다.

본 발명의 실시예에 있어서, 상기 조성물은 해당 과정(Glycolysis) 의존성을 감소시킬 수 있다.

본 발명의 실시예에 있어서, 상기 조성물은 텔로미어(telomere) 길이를 증가시킬 수 있다.

본 발명의 실시예에 있어서, 상기 조성물은 미토콘드리아 질량을 감소시킬 수 있다.

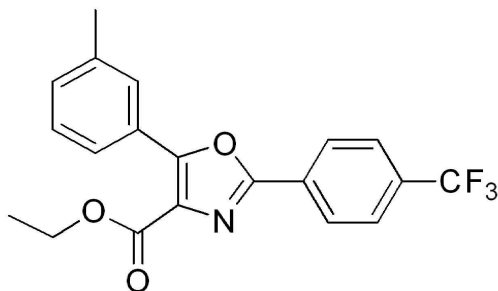
본 발명의 실시예에 있어서, 상기 조성물은 미토콘드리아 막전위(Mitochondrial membrane potential)를 증가시킬 수 있다.

본 발명의 실시예에 있어서, 상기 조성물은 세포질에서 리포푸신(lipofuscin)을 감소시킬 수 있다.

본 발명의 실시예에 있어서, 상기 조성물은 ENO1(alpha-enolase)에 결합하여 ENO1를 인산화(phosphorylation)시킬 수 있다.

상기 기술적 과제를 달성하기 위하여, 본 발명의 다른 실시예는 하기 [화학식 1]로 표시되는 옥사졸(oxazole) 유사체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는, 미토콘드리아 관련 질환의 증상을 예방, 억제 또는 치료하는 약학 조성물을 제공한다.

[화학식 1]



본 발명의 실시예에 있어서, 상기 미토콘드리아 관련 질환은 미토콘드리아 장애에 관련된 질환으로서, 근간대성 간질(Myoclonic epilepsy); 불균일 적색근육 섬유를 갖는 근간대성 간질(Myoclonic Epilepsy Associated with Ragged-Red Fibers)(MERRF), 레버씨 선천성 시신경병증(Leber's Hereditary Optic Neuropathy)(LHON), 신경병 증 실조 망막색소변성(neuropathy ataxia and retinitis pigmentosa)(NARP), 미토콘드리아 근병증, 뇌병증, 고 젖산혈증, 뇌졸중(Mitochondrial Myopathy, Encephalopathy, Lactacidosis, Stroke)(MELAS), 레이 증후군 (Leigh syndrome), 레이-유사 증후군(Leigh-like syndrome), 우성유전 시신경 위축(Dominant Optic atrophy)(DOA), 컨스-세이어 증후군(Kearns-Sayre Syndrome)(KSS), 모계유전 당뇨병 및 난청(Maternally Inherited Diabetes and Deafness)(MIDD), 알퍼스-후텐로처 증후군(Alpers-Huttenlocher syndrome), 실조 신경 병증 스펙트럼(Ataxia Neuropathy spectrum), 만성 진행성 외안근마비(Chronic Progressive External Ophthalmoplegia)(CPEO), 피어슨 증후군(Pearson syndrome), 미토콘드리아 신경위장관 뇌병증(Mitochondrial Neuro-Gastro-Intestinal Encephalopathy)(MNGIE), 쎅거즈 증후군(Sengers syndrome), 3-메틸글루타콘 산성뇨, 감각신경성 난청, 뇌병증 및 레이-유사 증후군의 신경-방사선적 발견(MEGDEL), 근병증, 미토콘드리아 근병증,

심근증(cardiomyopathy), 및 뇌근병증(encephalomyopathy), SURF1(복합체 IV 과다 단백질 결핍(complex IV surfeit protein deficiency)으로 인한 COX 결핍 레이 증후군)으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0024] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 미토콘드리아 관련 질환은 미토콘드리아 기능이상과 관련된 질환으로서, 프리이드라이히 실조(Friedreich's Ataxia)(FRDA), 콩팥 요세관 산증(renal tubular acidosis), 파킨슨병(Parkinson's disease), 알츠하이머병, 근위축 측삭 경화증(amyotrophic lateral sclerosis)(ALS), 헌팅톤병(Huntington's disease), 전반적 발달 장애(developmental pervasive disorder), 청력 소실(hearing loss), 난청(deafness) 및 당뇨병으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

발명의 효과

[0026] 본 발명의 실시예에 따른 옥사졸 유사체는 노화를 억제시킬 수 있다.

[0027] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 특허청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1은 4 μ M 및 8 μ M 농도에서 In-house HTS 결과이다. 4 μ M KB2764와 비교해보면, 8 μ M KB2764가 상대적으로 결과값에서 더 유효한 증가를 보였다. $*P < 0.1$, $**P < 0.01$, Student's t-test. Mean $\pm$ S.D., $n = 10$.

도 2는 본 발명의 KB2764의 합성과정을 보여주는 그림이다.

도 3은 본 발명의 KB2764의 비오틴화(biotinylated)를 보여주는 그림이다.

도 4는 본 발명에서 합성된 화합물의 NMR 데이터이다. (a)는 600 MHz, $CDCl_3$ 에서 측정된, 화합물 2의 1H NMR 스펙트럼이다. (b)는 600 MHz, $CDCl_3$ 에서 측정된, 화합물 3의 1H NMR 스펙트럼이다.

도 5는 본 발명에서 합성된 화합물의 NMR 데이터이다. (a)는 600 MHz, $CDCl_3$ 에서 측정된, 화합물 4(KB2764)의 1H NMR 스펙트럼이다. (b)는 600 MHz, $CDCl_3$ 에서 측정된, 화합물 5의 1H NMR 스펙트럼이다.

도 6은 본 발명에서 합성된 화합물의 NMR 데이터이다. (a)는 600 MHz, $CDCl_3$ 에서 측정된, 화합물 6의 1H NMR 스펙트럼이다. (b)는 600 MHz, $CDCl_3$ 에서 측정된, 화합물 7의 1H NMR 스펙트럼이다.

도 7은 본 발명에서 합성된 화합물 8 (Biotinylated KB2764)의 NMR 데이터로서, 구체적으로 600 MHz, MeOD 에서 측정된, 화합물 8의 1H NMR 스펙트럼이다.

도 8은 화합물 4 (KB2764)의 HRMS 데이터이다.

도 9는 화합물 8 (Biotinylated KB2764)의 HRMS 데이터이다.

도 10은 화합물 4 (KB2764)의 HPLC 데이터이다.

도 11은 화합물 8 (Biotinylated KB2764)의 HPLC 데이터이다.

도 12는 본 발명의 KB2764이 가지는 노화 억제에 대한 잠재적 능력을 보여주는 그림으로서, 구체적으로, 세포 증식 검사법(cell proliferation assay)을 이용한 세포 증식의 정량분석 결과를 보여준다. $**P < 0.01$, Student's t-test. Mean $\pm$ S.D., $n = 10$. 이다.

도 13은 본 발명의 KB2764이 가지는 노화 억제에 대한 잠재적 능력을 보여주는 그림으로서, 구체적으로, KB2764 (0-32 μ M)의 농도를 다양하게 하여, 12일째에 세포 증식 평가를 보여준다. $n.s$ (not significant), $**P < 0.01$, Student's t-test. Mean $\pm$ S.D., $n = 10$. 이다.

도 14는 본 발명의 KB2764이 가지는 노화 억제에 대한 잠재적 능력을 보여주는 그림으로서, 구체적으로, 8 μ M

및 50 μ M 농도에서 KB2764의 독성을 조사하기 위한 세포 생존도(Cell viability) 평가를 보여준다. *n.s* (not significant), $**P < 0.01$, two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-test. Mean $\pm$ S.D., *n* = 3. 이다.

도 15는 본 발명의 KB2764이 가지는 노화 억제에 대한 잠재적 능력을 보여주는 그림으로서, 구체적으로, 12일동안 DMSO 또는 KB2764로 처리된 노화 섬유아세포의 형태(morphology)를 보여준다. 노화 섬유아세포에 DMSO를 적용한 결과, 넓고 평평한 모양을 보여준 반면, 노화 섬유아세포에 KB2764을 사용한 결과, 얇은 모양을 보여주었다. Scale bar 100 μ m.이다.

도 16은 본 발명의 KB2764이 가지는 노화 억제에 대한 잠재적 능력을 보여주는 그림으로서, 구체적으로, 약물 처리에 의해 콜로니가 형성되는지 여부를 확인하기 위해 아가로스 배지에서 세포의 형태 확인결과를 보여준다. DMSO 및 KB2764로 처리된 노화 섬유아세포가 HeLa 세포들과 비교되었다. Scale bar 100 μ m.이다.

도 17은 본 발명의 KB2764이 노화 표현형(phenotype)을 약화시킨다는 점을 보여주는 그림으로서, 구체적으로, MitoSO를 사용하여, 활성산소(ROS)의 유세포 분석(Flow cytometric analysis) 결과를 보여준다. $**P < 0.01$, Student *t*-test. Mean $\pm$ S.D., *n* = 3.

도 18은 본 발명의 KB2764이 노화 표현형(phenotype)을 약화시킨다는 점을 보여주는 그림으로서, 구체적으로, MitoTracker green을 사용하여, 미토콘드리아 질량(mitochondrial mass)의 유세포 분석(Flow cytometric analysis) 결과를 보여준다. $**P < 0.01$, Student *t*-test. Mean $\pm$ S.D., *n* = 3. 이다.

도 19는 본 발명의 KB2764이 노화 표현형(phenotype)을 약화시킨다는 점을 보여주는 그림으로서, 구체적으로, Cyto-ID green 을 사용하여, 자가포식 흐름(autophagy flux)의 유세포 분석(Flow cytometric analysis) 결과를 보여준다. $**P < 0.01$, Student *t*-test. Mean $\pm$ S.D., *n* = 3. ~이다.

도 20은 본 발명의 KB2764이 노화 표현형(phenotype)을 약화시킨다는 점을 보여주는 그림으로서, 구체적으로, JC-10을 사용해서, 미토콘드리아 막전위(mitochondrial membrane potential, MMP)의 유세포 분석(Flow cytometric analysis) 결과를 보여준다. $**P < 0.01$, Student *t*-test. Mean $\pm$ S.D., *n* = 3. ~이다.

도 21은 본 발명의 KB2764이 노화 표현형(phenotype)을 약화시킨다는 점을 보여주는 그림으로서, 구체적으로, 염색하지 않은 상태에서 리포푸신(lipofuscin)의 유세포 분석(Flow cytometric analysis) 결과를 보여준다. $**P < 0.01$, Student *t*-test. Mean $\pm$ S.D., *n* = 3. 이다.

도 22는 본 발명의 KB2764이 노화 표현형(phenotype)을 약화시킨다는 점을 보여주는 그림으로서, 구체적으로, 12일동안 DMSO 및 KB2764으로 처리된 노화 섬유아세포의 DNA tail 길이 분석 결과를 보여준다. DNA tail 길이 분석을 위해 comet assay가 사용되었다. $**P < 0.01$, Student *t*-test. Mean $\pm$ S.D., *n* = 10 이다.

도 23은 본 발명의 KB2764이 노화 표현형(phenotype)을 약화시킨다는 점을 보여주는 그림으로서, 구체적으로, quantitative PCR을 사용해서, DNA 텔로미어(telomere) 길이 비교를 보여준다. $**P < 0.01$, Student *t*-test. Mean $\pm$ S.D., *n* = 4.

도 24는 본 발명의 KB2764이 노화 섬유아세포의 대사과정을 조절한다는 점을 보여주는 그림으로서, 구체적으로, 12일동안 DMSO로 처리된(그래프상에서 노화 그룹) 노화 섬유아세포의 해당과정(glycolysis)동안 pH 변화를 비교한 결과를 보여준다. 해당과정 비교는 세포외 산화율 (extracellular acidification rate, ECAR) 검사법으로 수행되었다. $**P < 0.01$, two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-test. Mean $\pm$ S.D., *n* = 3. ~이다.

도 25는 본 발명의 KB2764이 노화 섬유아세포의 대사과정을 조절한다는 점을 보여주는 그림으로서, 구체적으로, 12일동안 KB2764과 함께 AZD7545 (AZD), 및 AZD만으로 각각 처리된 노화 섬유아세포의 해당과정(glycolysis)동안 pH 변화를 비교한 결과를 보여준다. 해당과정 비교는 세포외 산화율 (extracellular acidification rate, ECAR) 검사법으로 수행되었다. $**P < 0.01$, two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-test. Mean $\pm$ S.D., *n* = 3.

도 26은 본 발명의 KB2764이 노화 섬유아세포의 대사과정을 조절한다는 점을 보여주는 그림으로서, 구체적으로 12일동안 DMSO로 처리된(그래프상에서 노화 그룹) 노화 섬유아세포의 기본 표현형(basal phenotype)(각 그룹의 좌측 하단) 및 스트레스 표현형(stressed phenotype)(각 그룹의 우측 상단)을 보여준다. 점선으로 연결된 기본 표현형 및 스트레스 표현형은 대사적 전위(metabolic potential)를 가리킨다. Mean $\pm$ S.D., *n* = 3

도 27은 본 발명의 KB2764이 노화 섬유아세포의 대사과정을 조절한다는 점을 보여주는 그림으로서, 구체적으로 12일동안 KB2764 과 함께 AZD, 및 AZD만 로 각각 처리된 노화 섬유아세포의 기본 표현형(basal phenotype)(각

그룹의 좌측 하단) 및 스트레스 표현형(stressed phenotype)(각 그룹의 우측 상단)을 보여준다. 점선으로 연결된 기본 표현형 및 스트레스 표현형은 대사적 전위(metabolic potential)를 가리킨다. Mean $\pm$ S.D., $n = 3$

도 28은 본 발명의 KB2764의 화학구조식이다.

도 29는 비오틴화(biotinylated)된 KB2764의 화학구조식이다.

도 30은 비오틴화(biotinylated)된 KB2764를 사용하는 면역침강법(immunoprecipitation) 모식도이다.

도 31은 비오틴화(biotinylated)된 KB2764과 반응하는 총 382개의 단백질 중 선택된 pyruvate kinase M (PKM) 및 alpha-enolase (ENO1) 단백질에 대한 $-10\log P: -10\log (p\text{-value})$, Avg. Mass (kDa): 단백질 분자 질량 평균 (protein molecular mass average)을 보여준다. 비오틴화(biotinylated)된 KB2764과 반응하는 총 382개의 단백질을 탐지하기 위해 Ion Mobility Tandem Mass Spectrometer Time-of-Flight (IM-MS TOF) 기술이 사용되었다.

도 32는 해당과정(glycolysis) 및 각 단계에서의 단백질 모식도이다.

도 33은 비오틴화(biotinylated)된 KB2764와, Myc-tagged 대조군, Myc-tagged Pyruvate kinase M 또는 Myc-tagged Alpha-enolase와의 공동 면역침강(Co-immunoprecipitation)을 보여주는 그림이다. 면역블롯(immunoblotting) 과정에서 사용된 1차 항체는 Myc-tagged 항체 및 β -actin 항체이다.

도 34는 본 발명의 KB2764가 매개하는 노화 회복(rejuvenation)을 위해 PKM 및 ENO1 발현 유지가 필수적임을 보여주는 그림으로서, 구체적으로, (a)는 대조군 shRNA (control shRNA, shCTRL) 또는 pyruvate kinase M shRNA (shPKM)에 대한 렌티 바이러스(lenti-virus)가 형질주입(transfection)된 노화 섬유아세포로부터 나온 용해물(lysates)의 면역블랏(immunoblots)을 보여준다. 면역블랏 과정에 사용된 1차 항체는 anti-PKM 항체 및 β -actin 항체이다. (b) 대조군 shRNA (control shRNA, shCTRL) 또는 alpha-enolase shRNA (shENO1)에 대한 렌티 바이러스(lenti-virus)가 형질주입(transfection)된 노화 섬유아세포로부터 나온 용해물(lysates)의 면역블랏(immunoblots)을 보여준다. 면역블랏 과정에 사용된 1차 항체는 anti-ENO1 항체 및 anti- β -actin 항체이다.

도 35는 본 발명의 KB2764가 매개하는 노화 회복(rejuvenation)을 위해 PKM 및 ENO1 발현 유지가 필수적임을 보여주는 그림으로서, 구체적으로, shCTRL, shPKM 및 shENO1가 형질주입된 노화 섬유아세포에서 해당과정(glycolysis)동안 pH 변화의 비교를 보여준다. 해당과정의 비교는 ECAR 검사법으로 수행되었다. $**P < 0.01$, two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-test. Mean $\pm$ S.D., $n = 3$.

도 36은 본 발명의 KB2764가 매개하는 노화 회복(rejuvenation)을 위해 PKM 및 ENO1 발현 유지가 필수적임을 보여주는 그림으로서, 구체적으로, shCTRL, shPKM 및 shENO1가 형질주입된 노화 섬유아세포에서 본 발명의 KB2764로 처리되었을 때와 처리되지 않았을 때의 활성산소(ROS)를 비교한 결과를 보여준다. $**P < 0.01$, Student t-test. Mean $\pm$ S.D., $n = 3$.

도 37은 본 발명의 KB2764가 매개하는 노화 회복(rejuvenation)을 위해 PKM 및 ENO1 발현 유지가 필수적임을 보여주는 그림으로서, 구체적으로, (a)는 본 발명의 KB2764와 pyruvate kinase M (PKM) 간의 친화도(binding affinity)를 정량적으로 평가하기 위한 마이크로스케일 열영동(Microscale thermophoresis, MST) 분석 결과를 보여준다. PKM의 해리상수(dissociation constant, K_d)는 $9.32 \mu\text{M}$ 였고 이는, 본 발명의 KB2764와 PKM 간의 친화도를 보여준다. (b)는 본 발명의 KB2764와 alpha-enolase (ENO1)간의 친화도(binding affinity)를 정량적으로 평가하기 위한 마이크로스케일 열영동(Microscale thermophoresis, MST) 분석 결과를 보여준다. ENO1의 해리상수(dissociation constant, K_d)는 94.7 nM 였고 이는, 본 발명의 KB2764와 ENO1 간의 친화도를 보여준다.

도 38은 본 발명의 KB2764가 ENO1 인산화를 조절한다는 점을 보여주는 그림으로서, 구체적으로, 본 발명의 KB2764가 세포에서 ENO1 인산화에 대한 효과를 보여준다. pCMV-Myc-ENO1 (WT)을 세포에 형질주입하였고, 그 후에 DMSO 또는 KB2764로 처리되었다. 그런 다음, Myc-tag을 표적으로 하는 항체를 사용하여 공동 면역침강(co-immunoprecipitation)을 수행했다. 본 발명의 KB2764 처리는 ENO1 (WT) 인산화를 증가시켰다(점선 박스 부분).

도 39는 본 발명의 KB2764가 ENO1 인산화를 조절한다는 점을 보여주는 그림으로서, 구체적으로, 여러 서열 열라 인먼트(multiple sequence alignment)의 활용은 다양한 종(인간, 수마트라오랑우탄(ponab), 쥐, 소)에 걸쳐서 ENO1에서 보존된 모티프(motif)의 존재를 밝혀냈다는 것을 보여준다. 인산화 효소(kinase) 예상 툴의 활용은 ENO1에서 잠재적 인산화 모티프에 대한 예상을 가능하게 했다(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>). ENO1 단백질은 Ser 254, Ser 272, Ser 353에서 추정 인산화 부위를 포함하는 것으로 알려졌다.

도 40은 본 발명의 KB2764가 ENO1 인산화를 조절한다는 점을 보여주는 그림으로서, 구체적으로, pCMV-Myc-ENO1 (WT) 또는 pCMV-Myc-ENO1 (mutant construct)을 세포에 형질주입시키고, 그런 다음 DMSO 또는 KB2764을 접종시키는 실험을 수행한 결과를 보여준다. 각 형질변환된 세포들은 Myc-tag, ENO1 (WT) 및 ENO1 (mutant construct)에 대한 항체로 공동 면역침강(co-immunoprecipitation)되었다. 인산화는 *p*-SQ/TQ 항체로 탐지되었다. 본 발명의 KB2764 처리는 ENO1 (S254A) 인산화를 증가시키지 않았다(점선 박스 부분).

도 41은 alpha enolase (PDB ID: 3B97)에서 본 발명의 KB2764의 *In silico* 결합 모드(binding mode)를 보여준다. 점선 부분들은 각각 수소 결합 반응 및 cation- π 반응을 가리킨다. 본 발명의 KB2764은 oxazole (2.11 Å 및 ester (2.14 Å부분(moieties)을 사용해서 Ser 254와 수소 결합을 하는 것으로 예측되었다. 또한, 3-메틸-페닐 고리(3-methylphenyl ring)이 Arg 253 (4.79 Å와 cation- π stacking 반응을 했다.

도 42는 교차 결합된 ENO1의 면역블랏(immunoblotting)을 보여준다. Enolase-1 및 HRP-conjugated β -actin이 1차 항체로 사용되었다.

도 43은 *in vivo*에서 본 발명의 KB2764 매개 노화 회복(rejuvenation)을 확인시켜주는 그림이다. 생존율(survival) 분석은 DMSO 또는 KB2764 (100 μ M)로 동기화된 *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*)를 계속적으로 처리하면서 수행되었다. 본 발명의 KB2764은 *C. elegans*의 수명을 평균 3일까지 연장시켰다. $^{**}P < 0.01$, Kaplan-Meier analysis., $n = 60$.

도 44는 DMSO 또는 본 발명의 KB2764(100 μ M)로 동기화된 *C. elegans*를 10일동안 처리한 후, 형광 현미경으로 관찰된 리포푸신(lipofuscin)을 보여준다. 나이를 먹은 *C. elegans*에서 더 많은 리포푸신이 관찰되었다(화살표 부분).

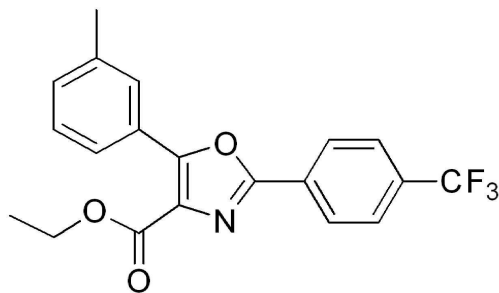
도 45는 DMSO 또는 본 발명의 KB2764(100 μ M)로 동기화된 *C. elegans*를 처리한 후, 0일째, 7일째, 14일째 관찰된 체휘도(body bends)를 보여준다. 체휘도는 하나의 반복되는 모션(reciprocating motion)으로서 측정되었고 1분당 횟수(number of times per minute.)로 평가되었다. *n.s* (not significant), $^{*}P < 0.05$, Student's *t*-test. Mean $\pm$ S.D., $n = 5$.

도 46은 노화를 회복시키는 효과를 가진 본 발명의 KB2764의 작용 메커니즘을 보여준다. 본 발명의 KB2764은 ENO1를 표적으로 하고 대사과정을 조절한다. 제어된 대사과정은 노화 관련 분비 표현형(secretory phenotype)을 회복시켰고, DNA 회복(repair)를 도왔다. 본 발명의 KB2764은 *in vitro* 및 *in vivo*에서 모두 노화 회복효과를 보였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0030] 이하에서는 첨부한 도면을 참조하여 본 발명을 설명하기로 한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며, 따라서 여기에서 설명하는 실시예로 한정되는 것은 아니다. 그리고 도면에서 본 발명을 명확하게 설명하기 위해서 설명과 관계없는 부분은 생략하였으며, 명세서 전체를 통하여 유사한 부분에 대해서는 유사한 도면 부호를 붙였다.
- [0031] 명세서 전체에서, 어떤 부분이 다른 부분과 "연결(접속, 접촉, 결합)"되어 있다고 할 때, 이는 "직접적으로 연결"되어 있는 경우뿐 아니라, 그 중간에 다른 부재를 사이에 두고 "간접적으로 연결"되어 있는 경우도 포함한다. 또한 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 구비할 수 있다는 것을 의미한다.
- [0032] 본 명세서에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 본 발명을 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.
- [0034] 본 발명의 일측면에 따르면, 본 발명은 하기 [화학식 1]로 표시되는 옥사졸(oxazole) 유사체를 유효성분으로 포함하는 항노화 조성물을 제공한다.

[0035] [화학식 1]



[0036]

[0038] 상기 옥사졸 유사체는 에틸 5-(m-톨릴)-2-(4-(트리플루오로메틸)페닐)옥사졸-4-카르복실레이트 (Ethyl 5-(m-tolyl)-2-(4-(trifluoromethyl)phenyl)oxazole-4-carboxylate (4); KB2764)이다.

[0039] HTS(High-Throughput Screening)은 화합물 라이브러리에서 대상 물질을 찾는 데 널리 사용되고 있다. 본 발명에서는 HTS 기술을 사용하여 화합물 라이브러리의 세포 증식 능력을 측정하는 데 사용되었다. 세포 수의 결정은 DNA 함량을 기반으로 한 방법으로 수행되었다. 화합물 라이브러리에서 노화 섬유아세포는 각 8 μM 으로 처리되었으며, 세포 증식은 12일째에 측정되었다(도 12). 노화 섬유아세포의 수를 가장 많이 증가시킨 화합물 KB2764가 후보 화합물로 선택되었다(도 12에서 붉은 막대). 도 1은 KB2764 합성에 사용된 반응 조건 및 시약에 대한 포괄적인 내용을 제공한다.

[0040] HTS를 통해 확인된 본 발명의 KB2764는 노화 약화 이외에도 목적하지 않은 다른 효과를 가질 수 있다. 따라서 KB2764가 세포 노화 약화 외에 다른 변화를 유발하는지 여부를 추가로 조사하였다. KB2764의 세포 증식 효과는 다시 다양한 농도(0-32 μM)에서 평가되었다(도 13). 2 μM 에서 세포 증식 효과가 두드러지게 증가하였으며, 4-32 μM 에서 유의미한 증식 효과가 관찰되었다(그림 13). 농도 의존적으로 관찰된 노화 섬유아세포 증식 효과는 KB2764에 의해 영향을 받았음을 의미한다(도 13).

[0041] 다음으로, KB2764의 독성은 0-20일까지 세포 생존도를 측정하여 확인되었다. 8 μM 의 KB2764 처리된 노화 섬유아세포는 음성 대조군에 대해 일관성을 보였다. 반면, 50 μM 의 KB2764로 처리된 세포는 생존도가 감소되었다(도 14). 적절한 농도의 KB2764 처리는 독성이 없었다(도 14). 높은 농도의 KB2764 (50 μM)에서 세포 생존도가 감소하였으며, 낮은 농도 (2 μM)에서는 효과가 미미하였다. 따라서 본 발명에서 사용된 KB2764의 농도는 8 μM 이 바람직하다(도 1).

[0042] 노화의 주목할만한 특성 중 하나는 세포 표면적의 증가이다. 본 발명의 일실시예에서, KB2764의 노화 섬유아세포 형태(morphology)에 미치는 영향이 조사되었다. 8 μM 의 KB2764로 12일 동안 처리한 후, 노화 섬유아세포는 역상 대비 현미경(inverted phase-contrast microscope)으로 관찰되었다. 노화 섬유아세포는 넓고 평평한 구조를 보였다(도 15). 반면, KB2764로 처리된 노화 섬유아세포는 젊은 세포의 특징 중 하나인 작은 주름 모양을 보였다(도 15).

[0043] 본 발명의 일실시예에서, 약물 유발 세포 증식이 세포의 종양 형성을 유발할 수 있으므로 콜로니 형성을 확인하였다. 자궁경부암으로 잘 알려진 HeLa 세포는 소프트 아가 검사(soft agar assay)에서 12일 후에 콜로니를 형성하였지만, 노화된 세포 및 KB2764 처리 그룹에서는 콜로니가 관찰되지 않았다(도 16). 이러한 결과는 KB2764가 세포 종양 형성을 유발하지 않음을 나타낸다.

[0044] 종합하면, KB2764는 중간 농도에서 독성이 없으며, 노화 약화에만 집중된 것으로 확인되었다.

[0045] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 조성물은 활성 산소(Reactive Oxygen Species, ROS)를 감소시킬 수 있다. 손상된 미토콘드리아로 인한 세포 노화의 발생은 과량의 활성산소(Reactive oxygen species, ROS)의 존재가 그 특징이고, 이로 인해 세포 및 세포기관 기능이 심각하게 저해된다. 최근 연구들은 ROS 수준을 감소시키는 것이 노화 약화의 중요한 대상임을 확인해준다(Tan, I.L. & Velarde, M.C. Targeting Mitochondria as a Strategy to Inhibit Cellular Senescence. *Current Molecular Biology Reports* **7**, 20-29 (2021)). 세포 수준의 ROS의 유의한 감소가 노화의 개선을 효과적으로 설명할 수 있다(Davalli, P., Mitic, T., Caporali, A., Lauriola, A. & D'Arca, D. ROS, Cell Senescence, and Novel Molecular Mechanisms in Aging and Age-Related Diseases. *Oxid Med Cell Longev* **2016**, 3565127 (2016)). 본 발명의 일실시예에서, KB2764로 처리된 노화 섬유

아세포에서 ROS 수준을 측정하였다. KB2764의 처리는 노화 섬유아세포 내에서 ROS 수준을 유의하게 감소시켰다(도 17). ROS의 감소는 미토콘드리아 및 세포 자체를 포함한 기관의 회복을 의미한다.

[0046] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 조성물은 해당 과정(Glycolysis) 의존성을 감소시킬 수 있다. 세포 내에서의 대사 과정은 생명에 필수적인 에너지원 아데노신 삼인산(ATP)을 생성한다. 노화된 세포는 비정상적인 대사 기능으로 인해 원활하게 ATP를 생성하지 못한다고 알려져 있다. 부족한 ATP는 과도한 해당 과정(glycolysis)의 순환을 통해 보상된다. 따라서, 본 발명에서는 세포의 전반적인 대사 과정이 평가되었다. 해당 과정은 세포의 산화율(extracellular acidification rate, ECAR)로 측정되었다. 그 결과, KB2764로 처리된 섬유아세포가 노화 섬유아세포에 비해 해당 과정에 더 적은 의존성을 나타내는 것을 보여주었다(도 24). KB2764로 인한 ECAR 감소가 대사 재프로그래밍(metabolic reprogramming)에 의한 것인지 확인하였다. 본 발명에서 AZD7545는 피루베이트 탈수소효소 키나제 2 억제제(a pyruvate dehydrogenase kinase 2 inhibitor, PDK2)로써 적용되었으며, 이는 아세틸-CoA 사이클을 효과적으로 방해한다. AZD7545 처리는 ECAR 비율을 유의하게 변화시키지 않았으며, KB2764와의 병행 처리도 ECAR 비율을 유의하게 변화시키지 않았다(도 25). KB2764가 해당 과정을 조정하는 역할을 할 수 있다는 결과를 기반으로, KB2764가 OXPHOS의 효율을 조절하는 역할을 할 수도 있다고 추론되었다. 이를 확인하기 위해, 산소 소비율(oxygen consumption rate, OCR)을 미토콘드리아 호흡의 지표로 평가하였다. 노화 섬유아세포는 KB2764로 처리된 섬유아세포보다 약간 낮은 기본 및 최대 OCR을 가졌으며 유의한 변화가 없었다. 그러나 AZD7545 처리는 섬유아세포의 OCR을 유의하게 낮추었으며, KB2764 처리는 감소한 OCR 값을 유의하게 회복시켰다. 추가로, 기초 ECAR, OCR 및 스트레스 ECAR, OCR 값들을 비교하여 대사 잠재력을 평가하였다. KB2764로 처리된 섬유아세포는 노화 섬유아세포보다 더 활동적이었다(도 26). 이러한 데이터는 KB2764가 처리된 섬유아세포의 대사 잠재력(metabolic potential)을 증가시킨다는 것을 의미한다. AZD7545로 처리된 노화 섬유아세포는 대사 잠재력이 감소하였으며, KB2764와의 병행 처리는 대사 잠재력을 회복시켰다(도 27).

[0047] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 조성물은 텔로미어(telomere) 길이를 증가시킬 수 있다. 상기 텔로미어(telomere)는 염색체의 말단 영역에 위치한 반복적인 DNA 서열을 나타내며, 이는 닳아 없어짐과 엉킴(fraying and tangling)으로 인한 잠재적인 손상으로부터 염색체를 보호하는 역할을 한다. 세포 분열 또는 ROS와 같은 외부 요인에 의해 DNA가 손상될 때 텔로미어의 길이가 줄어든다고 알려져 있다. 본 발명의 일실시예에서, quantitative PCR을 사용하여 텔로미어 길이를 측정하였다. 본 발명의 KB2764로 처리된 섬유아세포의 텔로미어 길이는 노화 섬유아세포보다 24% 길었다(도 23). KB2764로 처리된 섬유아세포에서 텔로미어 길이의 유의한 증가는 손상된 DNA의 회복을 의미한다(도 23).

[0048] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 조성물은 세포핵 길이를 감소시킬 수 있다. DNA는 복제와 전사를 통해 생명 활동에 중요한 역할을 한다. 일반적으로, 세포 노화에서는 DNA가 반영구적으로 손상되어 노화를 가속화시킨다고 알려져 있다. 손상된 DNA는 작은 조각 형태로 세포핵 내에 존재한다. 따라서 노화 섬유아세포를 KB2764로 처리한 후, 손상된 DNA를 조사하기 위해 comet assay를 수행하였다. 노화 섬유아세포는 KB2764로 처리된 섬유아세포와 비교하여 유의하게 커진 세포핵을 보여주었다(도 22). KB2764 처리 후 세포핵 길이의 감소는 더 적은 DNA 손상을 나타내었다(도 22).

[0049] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 조성물은 미토콘드리아 질량을 감소시킬 수 있다. 미토콘드리아의 질량과 크기 증가는 노화 과정의 결과로 알려져 있다. 그리고, 미토콘드리아 질량의 증가는 ROS 과다 발현과 손상된 미토콘드리아의 보상 반응에 의해 유발된다고 알려져 있다. 본 발명의 일실시예에서, Mito-Tracker green을 사용하여 미토콘드리아 질량을 조사했다. KB2764 처리는 미토콘드리아 질량을 유의하게 감소시켰고, 이는 기능이상 미토콘드리아(dysfunctional mitochondria)의 축적을 억제한다는 것을 의미한다(도 18).

[0050] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 조성물은 자가포식(autophagy) 기능을 회복시킬 수 있다. 세포 내에서 기능을 제거하는 데 중요한 시스템인 자가포식(autophagy)은 기능이상 기관의 분해를 위한 것이다. 자가포식 기능의 복원은 노화 약화의 핵심 요소로 인식되고 있다. 본 발명에서는 노화된 세포의 자가포식 기능 상태를 조사하였다. Cyto-ID green 염색용액을 사용하여 KB2764로 처리된 세포에서 자가포식 흐름(autophagy flux)을 측정했다. KB2764로 처리된 노화된 세포는 자가포식 흐름이 유의하게 증가했고, 이는 KB2764에 의한 자가포식 시스템의 기능적 회복을 의미한다(도 19).

[0051] 본 발명에서 노화 섬유아세포에서 본 발명의KB2764가 매개된 ROS, 미토콘드리아 질량 및 자가포식 기능의 회복으로 인한 미토콘드리아의 간접적인 기능 회복이 확인되었다.

[0052] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 조성물은 미토콘드리아 막전위(Mitochondrial membrane potential)를 증가시킬 수 있다. 미토콘드리아 막전위(Mitochondrial membrane potential, MMP)는 전자 전달 사슬을 통한 ATP 합

성에 필요한 수소 이온의 전기 화학적 전위를 유지하는 필수적인 노화 지표로 알려져 있다. 본 발명의 일실시예에서, 미토콘드리아의 기능 회복을 확인하기 위해 JC-10 염색을 통해 MMP를 확인하였다. KB2764로 처리된 섬유아세포는 노화 섬유아세포와 비교하여 MMP가 유의하게 증가한 것을 확인하였(도 20). 이 결과는 직접적인 미토콘드리아 회복을 나타낸다.

[0053] 본 발명에서 노화 섬유아세포에서 본 발명의 KB2764가 매개된 ROS, 미토콘드리아 질량 및 자가포식 기능의 회복으로 인한 미토콘드리아의 간접적인 기능 회복이 확인되었다.

[0054] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 조성물은 세포질에서 리포푸신(lipofuscin)을 감소시킬 수 있다. 상기 리포푸신(Lipofuscin)은 세포 노화 중에 세포질에 축적되는 노랑-갈색 형광을 띠는 지질 함유 피그먼트로서, 이는 세포 노화 회복의 지표로 볼 수 있다. 본 발명의 일실시예에서, 세포질 내 리포푸신을 염색 없이 측정하였다. 결과적으로, KB2764로 처리된 섬유아세포는 세포질에 축적된 리포푸신이 유의하게 감소하였다(도 21).

[0055] 본 발명의 KB2764 (도 28)은 예 도 2에 설명된 방법대로 합성되었다. 노화와 관련된 IL-33의 일부는 아직 명확하게 밝혀지지 않았으며, 이전에 몇 차례의 연구가 이루어졌었다. 본 발명에서는 KB2764의 상호작용 파트너 단백질 및 그 기능의 발견에 단서를 제공하기 위해 KB2764와 상호작용하는 단백질을 조사하였다. KB2764 비오틴화 화합물 (도 3 및 도 29)을 합성하여 풀다운(pull-down) 샘플을 얻었다. 노화 섬유아세포는 streptavidin-immunoprecipitation(streptavidin 면역침강(IP))으로 샘플을 얻기 위해서, 8μM의 바이오틴화 KB2764(biotinylated-KB2764)로 처리되었다(도 30). KB2764 확인 및 상호작용하는 단백질 파트너를 확인하기 위해 IM-MS TOF 실험이 수행되었다. 382개의 상호작용 단백질이 샘플에서 확인되었다. 상세한 단백질 목록은 하기 표 1에 나와있다. 후보 단백질의 선택은 p-value에 의한 KB2764와의 친화도(affinity) 및 노화와 관련된성을 기반으로 하였다. 데이터를 요약하면, KB2764로 인한 대사 변화는 유의미하며, 이로 인해 해당 과정(glycolysis) 관련 단백질인 PKM (pyruvate kinase M) 및 alpha-enolase (ENO1) 단백질이 가장 유망한 후보로 나타났다(도 31). 특히, PKM 및 ENO1은 해당 과정(glycolysis)에 참여하는 단백질로 알려져 있다. PKM은 인산페놀피루빈산(phosphophenol pyruvate)을 피루빈산(pyruvate)으로 매개하며, ENO1은 2-인산글리세르산(2-phosphoglycerate)을 인산페놀피루빈산(phosphophenol pyruvate)으로 매개하는 역할을 합니다 (도 32). 후보 단백질인 PKM과 ENO1 사이의 상호작용을 확인하기 위해 풀다운 시험(pull-down assay)이 실행되었다. pCMV-Myc-PKM 및 pCMV-Myc-ENO1 플라스미드를 HEK293T 세포주에 형질주입(transfection)시킨 다음 비오틴화 된 KB2764로 처리하고, 이어서 streptavidin-IP 처리를 하였다. 결과적으로 Myc-tag 항체를 사용한 면역 블랏(immunoblotting)에서 탐지되었다 (도 33). 면역침강(IP) 결과는 비오틴화 KB2764가 PKM 및 ENO1 단백질과 상호작용함을 의미하며, IM-MS TOF 결과를 재확인시켜주었다. 그 다음, 두 후보 중 더 높은 친화성을 나타내는 단백질을 예측하기 위해 *in silico* docking 분석이 수행되었다.

표 1

[0056]

연번	Accession	-10lgP	Avg. Mass	설명
1	P08670 VIME_HUMAN	420.52	53652	Vimentin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=VIM PE=1 SV=4
2	P60709 ACTB_HUMAN	367.61	41737	Actin cytoplasmic 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACTB PE=1 SV=1
3	P63261 ACTG_HUMAN	367.61	41793	Actin cytoplasmic 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACTG1 PE=1 SV=1
4	P02545 LMNA_HUMAN	316.29	74140	Prelamin-A/C OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LMNA PE=1 SV=1
5	tr A0A6Q8PFJ0 A0A6Q8PFJ0_HUMAN	316.29	80903	Prelamin-A/C OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LMNA PE=1 SV=1
6	P07196 NFL_HUMAN	260.77	61517	Neurofilament light polypeptide OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NEFL PE=1 SV=3
7	Q07065 CKAP4_HUMAN	235.03	66023	Cytoskeleton-associated protein 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CKAP4 PE=1 SV=2
8	P10412 H14_HUMAN	232.94	21865	Histone H1.4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H1-4 PE=1 SV=2
9	P16403 H12_HUMAN	216.37	21365	Histone H1.2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H1-2 PE=1 SV=2
10	P16401 H15_HUMAN	208.96	22580	Histone H1.5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H1-5 PE=1 SV=3
11	tr Q60FE5 Q60FE5_HUMAN	202.92	278224	Filamin-A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FLNA PE=1 SV=1

12	P21333 FLNA_HUMAN	202.92	280737	Filamin-A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FLNA PE=1 SV=4
13	Q16352 AINX_HUMAN	195.75	55391	Alpha-internexin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=INA PE=1 SV=2
14	Q562R1 ACTBL_HUMAN	194.94	42003	Beta-actin-like protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACTBL2 PE=1 SV=2
15	Q9UHD8 SEPT9_HUMAN	189.04	65402	Septin-9 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SEPTIN9 PE=1 SV=2
16	P48681 NEST_HUMAN	187.02	177438	Nestin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NES PE=1 SV=2
17	Q9UHB6 LIMA1_HUMAN	183.61	85226	LIM domain and actin-binding protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LIMA1 PE=1 SV=1
18	tr AOA087WWU8 AOA087WWU8_HUMAN	176.36	26421	Tropomyosin alpha-3 chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TPM3 PE=1 SV=1
19	Q05682 CALD1_HUMAN	170.97	93231	Caldesmon OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CALD1 PE=1 SV=3
20	tr F8W1R7 F8W1R7_HUMAN	167.75	16290	Myosin light polypeptide 6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MYL6 PE=1 SV=1
21	P60660 MYL6_HUMAN	167.75	16930	Myosin light polypeptide 6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MYL6 PE=1 SV=2
22	tr J3KND3 J3KND3_HUMAN	167.75	17058	Myosin light polypeptide 6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MYL6 PE=1 SV=1
23	tr G8JLA2 G8JLA2_HUMAN	167.75	17089	Myosin light polypeptide 6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MYL6 PE=1 SV=1
24	tr G3V1V0 G3V1V0_HUMAN	167.75	18037	Myosin light polypeptide 6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MYL6 PE=1 SV=1
25	tr B7Z6Z4 B7Z6Z4_HUMAN	167.75	26707	Myosin light polypeptide 6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MYL6 PE=1 SV=1
26	tr HOYA55 HOYA55_HUMAN	161.52	51578	Albumin (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ALB PE=1 SV=1
27	tr AOA0C4DGB6 AOA0C4DGB6_HUMAN	161.52	69227	Albumin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ALB PE=1 SV=1
28	P02768 ALBU_HUMAN	161.52	69367	Albumin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ALB PE=1 SV=2
29	tr HOYKS4 HOYKS4_HUMAN	159.93	19530	Annexin (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ANXA2 PE=1 SV=1
30	tr HOYNB8 HOYNB8_HUMAN	159.93	21046	Annexin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ANXA2 PE=1 SV=2
31	tr HOYMD0 HOYMD0_HUMAN	159.93	25342	Annexin (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ANXA2 PE=1 SV=1
32	tr HOYMU9 HOYMU9_HUMAN	159.93	25569	Annexin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ANXA2 PE=1 SV=1
33	tr HOYN42 HOYN42_HUMAN	159.93	28825	Annexin (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ANXA2 PE=1 SV=1
34	P07355 ANXA2_HUMAN	159.93	38604	Annexin A2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ANXA2 PE=1 SV=2
35	Q15149 PLEC_HUMAN	157.67	531796	Plectin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PLEC PE=1 SV=3
36	tr AOA2R8YGX3 AOA2R8YGX3_HUMAN	154.28	20986	Tropomyosin alpha-4 chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TPM4 PE=1 SV=1
37	tr AOA2R8Y5V9 AOA2R8Y5V9_HUMAN	154.28	28609	Tropomyosin alpha-4 chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TPM4 PE=1 SV=1
38	P67936 TPM4_HUMAN	154.28	28522	Tropomyosin alpha-4 chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TPM4 PE=1 SV=3
39	P14854 CX6B1_HUMAN	154.27	10192	Cytochrome c oxidase subunit 6B1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=COX6B1 PE=1 SV=2
40	P11142 HSP7C_HUMAN	151.85	70898	Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPA8 PE=1 SV=1
41	P62807 H2B1C_HUMAN	145.94	13906	Histone H2B type 1-C/E/F/G/I OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H2BC4 PE=1 SV=4
42	Q16778 H2B2E_HUMAN	145.94	13920	Histone H2B type 2-E OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H2BC21 PE=1 SV=3
43	P57053 H2BFS_HUMAN	141.57	13944	Histone H2B type F-S OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H2BS1 PE=1 SV=2

44	O60814 H2B1K_HUMAN	141.57	13890	Histone H2B type 1-K OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H2BC12 PE=1 SV=3
45	P06899 H2B1J_HUMAN	141.57	13904	Histone H2B type 1-J OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H2BC11 PE=1 SV=3
46	P09382 LEG1_HUMAN	141.32	14716	Galectin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LGALS1 PE=1 SV=2
47	tr J3KN67 J3KN67_HUMAN	140.74	33223	Tropomyosin alpha-3 chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TPM3 PE=1 SV=1
48	tr AOA7I2V5J8 AOA7I2V5J8_HUMAN	139.57	22184	Nucleophosmin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NPM1 PE=1 SV=1
49	tr E5RI98 E5RI98_HUMAN	139.57	25294	Nucleophosmin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NPM1 PE=1 SV=2
50	P06748 NPM_HUMAN	139.57	32575	Nucleophosmin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NPM1 PE=1 SV=2
51	tr AOA7I2YQCO AOA7I2YQCO_HUMAN	139.57	35714	Nucleophosmin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NPM1 PE=1 SV=1
52	tr HOYKX5 HOYKX5_HUMAN	137.25	16365	Tropomyosin alpha-1 chain (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TPM1 PE=1 SV=1
53	P20674 COX5A_HUMAN	136.07	16762	Cytochrome c oxidase subunit 5A mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=COX5A PE=1 SV=2
54	tr H3BNX8 H3BNX8_HUMAN	136.07	17235	Cytochrome c oxidase polypeptide Va OS=Homo sapiens OX=9606 GN=COX5A PE=1 SV=1
55	tr H3BTN5 H3BTN5_HUMAN	130.78	53045	Pyruvate kinase (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PKM PE=1 SV=1
56	P14618 KPYM_HUMAN	130.78	57937	Pyruvate kinase PKM OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PKM PE=1 SV=4
57	tr AOA804F6T5 AOA804F6T5_HUMAN	130.78	61594	Pyruvate kinase PKM OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PKM PE=4 SV=1
58	tr AOA804F729 AOA804F729_HUMAN	130.78	65931	Pyruvate kinase PKM OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PKM PE=4 SV=1
59	tr HOY3Z3 HOY3Z3_HUMAN	123.01	47440	Protein disulfide-isomerase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=P4HB PE=1 SV=2
60	tr H7BZ94 H7BZ94_HUMAN	123.01	52502	Protein disulfide-isomerase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=P4HB PE=1 SV=2
61	tr I3L0S0 I3L0S0_HUMAN	123.01	52549	Protein disulfide-isomerase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=P4HB PE=1 SV=2
62	tr AOA7POT8CO AOA7POT8CO_HUMAN	123.01	54310	Protein disulfide-isomerase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=P4HB PE=1 SV=1
63	tr AOA7POT8J3 AOA7POT8J3_HUMAN	123.01	54911	Protein disulfide-isomerase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=P4HB PE=1 SV=1
64	P07237 PDI1A_HUMAN	123.01	57116	Protein disulfide-isomerase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=P4HB PE=1 SV=3
65	tr AOA7POTB26 AOA7POTB26_HUMAN	123.01	59698	Protein disulfide-isomerase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=P4HB PE=1 SV=1
66	tr AOA7POTA35 AOA7POTA35_HUMAN	123.01	61043	Protein disulfide-isomerase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=P4HB PE=1 SV=1
67	tr AOA7POTA71 AOA7POTA71_HUMAN	123.01	62032	Protein disulfide-isomerase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=P4HB PE=1 SV=1
68	tr AOA7POTA97 AOA7POTA97_HUMAN	123.01	53581	Protein disulfide-isomerase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=P4HB PE=1 SV=1
69	tr AOA7POT8X1 AOA7POT8X1_HUMAN	123.01	54015	Protein disulfide-isomerase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=P4HB PE=1 SV=1
70	tr I3L4M2 I3L4M2_HUMAN	123.01	60835	Protein disulfide-isomerase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=P4HB PE=1 SV=2
71	P10606 COX5B_HUMAN	122.17	13696	Cytochrome c oxidase subunit 5B mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=COX5B PE=1 SV=2
72	tr AOA7I2YQK6 AOA7I2YQK6_HUMAN	112.46	51233	60 kDa chaperonin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPD1 PE=1 SV=1
73	tr AOA7I2V599 AOA7I2V599_HUMAN	112.46	57786	60 kDa chaperonin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPD1 PE=1 SV=1
74	tr AOA7I2V2X6 AOA7I2V2X6_HUMAN	112.46	57759	60 kDa chaperonin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPD1 PE=1 SV=1
75	P10809 CH60_HUMAN	112.46	61055	60 kDa heat shock protein mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPD1 PE=1 SV=2

76	tr AOA7P0Z497 AOA7P0Z497_HUMAN	111.44	20210	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PPIB PE=1 SV=1
77	tr AOA7P0TB45 AOA7P0TB45_HUMAN	111.44	23813	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PPIB PE=1 SV=1
78	P23284 PPIB_HUMAN	111.44	23743	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PPIB PE=1 SV=2
79	P62861 RS30_HUMAN	110.56	6648	40S ribosomal protein S30 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FAU PE=1 SV=1
80	tr E9PR30 E9PR30_HUMAN	110.56	10905	40S ribosomal protein S30 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FAU PE=1 SV=1
81	tr AOA7P0TAIO AOA7P0TAIO_HUMAN	108.5	68092	78 kDa glucose-regulated protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPA5 PE=1 SV=1
82	tr AOA7P0TB36 AOA7P0TB36_HUMAN	108.5	69011	78 kDa glucose-regulated protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPA5 PE=1 SV=1
83	P11021 BIP_HUMAN	108.5	72333	Endoplasmic reticulum chaperone BiP OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPA5 PE=1 SV=2
84	P38606 VATA_HUMAN	108.5	68304	V-type proton ATPase catalytic subunit A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP6V1A PE=1 SV=2
85	tr AOA087WVQ9 AOA087WVQ9_HUMAN	107.97	49870	Elongation factor 1-alpha OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EEF1A1 PE=1 SV=2
86	tr AOA7I2V659 AOA7I2V659_HUMAN	107.97	49824	Elongation factor 1-alpha OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EEF1A1 PE=1 SV=1
87	P68104 EF1A1_HUMAN	107.97	50141	Elongation factor 1-alpha 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EEF1A1 PE=1 SV=1
88	Q5VTE0 EF1A3_HUMAN	107.97	50185	Putative elongation factor 1-alpha-like 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EEF1A1P5 PE=5 SV=1
89	Q05639 EF1A2_HUMAN	107.97	50470	Elongation factor 1-alpha 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EEF1A2 PE=1 SV=1
90	tr AOA2U3TZH3 AOA2U3TZH3_HUMAN	107.97	54341	Elongation factor 1-alpha OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EEF1A2 PE=1 SV=1
91	tr F5H2U8 F5H2U8_HUMAN	106.05	10767	High mobility group protein HMGI-C OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HMGA2 PE=1 SV=1
92	P52926 HMGA2_HUMAN	106.05	11832	High mobility group protein HMGI-C OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HMGA2 PE=1 SV=1
93	tr F5H2A4 F5H2A4_HUMAN	106.05	12714	High mobility group protein HMGI-C OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HMGA2 PE=1 SV=1
94	tr F5H6HO F5H6HO_HUMAN	106.05	16424	High mobility group protein HMGI-C OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HMGA2 PE=1 SV=1
95	P39019 RS19_HUMAN	105.47	16060	40S ribosomal protein S19 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS19 PE=1 SV=2
96	Q6NZI2 CAVN1_HUMAN	104.92	43476	Caveolae-associated protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAVIN1 PE=1 SV=1
97	tr F8W6I7 F8W6I7_HUMAN	104.47	33155	Helix-destabilizing protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPA1 PE=1 SV=2
98	tr AOA7I2V3R8 AOA7I2V3R8_HUMAN	104.47	34139	Helix-destabilizing protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPA1 PE=1 SV=1
99	tr AOA7I2V3W0 AOA7I2V3W0_HUMAN	104.47	34964	Helix-destabilizing protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPA1 PE=1 SV=1
100	P09651 ROA1_HUMAN	104.47	38747	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPA1 PE=1 SV=5
101	tr AOA7I2V4S4 AOA7I2V4S4_HUMAN	103.87	28222	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPA2B1 PE=1 SV=1
102	tr AOA024RA28 AOA024RA28_HUMAN	103.87	31163	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 isoform CRA_d OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPA2B1 PE=1 SV=1
103	tr AOA7I2V4N1 AOA7I2V4N1_HUMAN	103.87	32487	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPA2B1 PE=1 SV=1
104	tr AOA7I2V3P1 AOA7I2V3P1_HUMAN	103.87	33271	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPA2B1 PE=1 SV=1
105	tr AOA7I2V4I6 AOA7I2V4I6_HUMAN	103.87	34260	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPA2B1 PE=1 SV=1
106	tr AOA7I2V3P7 AOA7I2V3P7_HUMAN	103.87	34566	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPA2B1 PE=1 SV=1

107	tr AOA7I2V323 AOA7I2V323_HUMAN	103.87	35222	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPA2B1 PE=1 SV=1
108	P22626 ROA2_HUMAN	103.87	37430	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPA2B1 PE=1 SV=2
109	Q14247 SRC8_HUMAN	102.04	61586	Src substrate cortactin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CTTN PE=1 SV=2
110	P62318 SMD3_HUMAN	101.25	13916	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SNRPD3 PE=1 SV=1
111	P28799 GRN_HUMAN	100.2	63545	Progranulin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GRN PE=1 SV=2
112	P27105 STOM_HUMAN	97.79	31731	Stomatin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=STOM PE=1 SV=3
113	PODP25 CALM3_HUMAN	97.36	16838	Calmodulin-3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CALM3 PE=1 SV=1
114	PODP24 CALM2_HUMAN	97.36	16838	Calmodulin-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CALM2 PE=1 SV=1
115	PODP23 CALM1_HUMAN	97.36	16838	Calmodulin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CALM1 PE=1 SV=1
116	tr E7EMB3 E7EMB3_HUMAN	97.36	21689	Calmodulin-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CALM2 PE=1 SV=1
117	P04264 K2C1_HUMAN	96.13	66039	Keratin type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KRT1 PE=1 SV=6
118	tr AOA2R8Y811 AOA2R8Y811_HUMAN	95.95	16160	40S ribosomal protein S14 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS14 PE=1 SV=1
119	P62263 RS14_HUMAN	95.95	16273	40S ribosomal protein S14 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS14 PE=1 SV=3
120	tr G3V576 G3V576_HUMAN	94.57	25257	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPC PE=1 SV=1
121	tr G3V4W0 G3V4W0_HUMAN	94.57	28916	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPC PE=1 SV=1
122	tr B4DY08 B4DY08_HUMAN	94.57	31972	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPC PE=1 SV=1
123	tr B2R5W2 B2R5W2_HUMAN	94.57	31948	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPC PE=1 SV=1
124	tr G3V4C1 G3V4C1_HUMAN	94.57	32238	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPC PE=1 SV=1
125	tr G3V2Q1 G3V2Q1_HUMAN	94.57	33571	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPC PE=1 SV=1
126	P07910 HNRPC_HUMAN	94.57	33670	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPC PE=1 SV=4
127	tr AOA1X7SBS1 AOA1X7SBS1_HUMAN	94.16	81795	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPU PE=1 SV=1
128	tr AOA1W2PPS1 AOA1W2PPS1_HUMAN	94.16	88318	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPU PE=1 SV=1
129	Q00839 HNRPU_HUMAN	94.16	90585	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPU PE=1 SV=6
130	Q92743 HTRA1_HUMAN	93.44	51287	Serine protease HTRA1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HTRA1 PE=1 SV=1
131	tr MOR1H6 MOR1H6_HUMAN	93.29	10123	40S ribosomal protein S11 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS11 PE=1 SV=1
132	tr MOQZC5 MOQZC5_HUMAN	93.29	13997	40S ribosomal protein S11 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS11 PE=1 SV=1
133	P62280 RS11_HUMAN	93.29	18431	40S ribosomal protein S11 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS11 PE=1 SV=3
134	tr HOYH81 HOYH81_HUMAN	91.81	38258	ATP synthase subunit beta (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP5F1B PE=1 SV=1
135	P06576 ATPB_HUMAN	91.81	56560	ATP synthase subunit beta mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP5F1B PE=1 SV=3
136	P07305 H10_HUMAN	91.2	20863	Histone H1.0 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H1-0 PE=1 SV=3
137	P82979 SARNP_HUMAN	87.59	23671	SAP domain-containing ribonucleoprotein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SARNP PE=1 SV=3

138	tr F8VZQ9 F8VZQ9_HUMAN	87.59	24105	SAP domain-containing ribonucleoprotein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SARNP PE=1 SV=1
139	tr AOA0D9SF54 AOA0D9SF54_HUMAN	86.8	282835	Spectrin alpha chain non-erythrocytic 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SPTAN1 PE=1 SV=1
140	Q13813 SPTN1_HUMAN	86.8	284538	Spectrin alpha chain non-erythrocytic 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SPTAN1 PE=1 SV=3
141	tr AOA0D9SGF6 AOA0D9SGF6_HUMAN	86.8	287604	Spectrin alpha chain non-erythrocytic 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SPTAN1 PE=1 SV=1
142	Q0ZGT2 NEXN_HUMAN	84.18	80658	Nexilin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NEXN PE=1 SV=1
143	tr D6RGI3 D6RGI3_HUMAN	83.84	49006	Septin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SEPTIN11 PE=1 SV=1
144	Q9NVA2 SEP11_HUMAN	83.84	49398	Septin-11 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SEPTIN11 PE=1 SV=3
145	tr D6RER5 D6RER5_HUMAN	83.84	49809	Septin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SEPTIN11 PE=1 SV=1
146	tr H9KV75 H9KV75_HUMAN	83.5	94826	Alpha-actinin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACTN1 PE=1 SV=1
147	tr AOA804HLF4 AOA804HLF4_HUMAN	83.5	95912	Alpha-actinin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACTN1 PE=4 SV=1
148	tr AOA804HL31 AOA804HL31_HUMAN	83.5	95174	Alpha-actinin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACTN1 PE=4 SV=1
149	tr AOA804HJU8 AOA804HJU8_HUMAN	83.5	101238	Alpha-actinin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACTN1 PE=4 SV=1
150	tr AOA804HIN7 AOA804HIN7_HUMAN	83.5	102090	Alpha-actinin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACTN1 PE=4 SV=1
151	tr AOA804HK61 AOA804HK61_HUMAN	83.5	102581	Alpha-actinin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACTN1 PE=4 SV=1
152	P12814 ACTN1_HUMAN	83.5	103058	Alpha-actinin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACTN1 PE=1 SV=2
153	tr AOA7I2V4Y4 AOA7I2V4Y4_HUMAN	83.5	103606	Alpha-actinin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACTN1 PE=1 SV=1
154	tr AOA804HII9 AOA804HII9_HUMAN	83.5	105440	Alpha-actinin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACTN1 PE=4 SV=1
155	tr AOA804HKE2 AOA804HKE2_HUMAN	83.5	106466	Alpha-actinin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACTN1 PE=4 SV=1
156	tr E9PP50 E9PP50_HUMAN	82.71	17778	Cofilin non-muscle isoform (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CFL1 PE=1 SV=8
157	P23528 COF1_HUMAN	82.71	18502	Cofilin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CFL1 PE=1 SV=3
158	tr E5RGE1 E5RGE1_HUMAN	80.65	5763	14-3-3 protein zeta/delta (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=YWHAZ PE=1 SV=8
159	tr E5RIR4 E5RIR4_HUMAN	80.65	8434	14-3-3 protein zeta/delta (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=YWHAZ PE=1 SV=1
160	tr E9PD24 E9PD24_HUMAN	80.65	10612	14-3-3 protein zeta/delta (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=YWHAZ PE=1 SV=1
161	tr E7EVZ2 E7EVZ2_HUMAN	80.65	11270	14-3-3 protein zeta/delta (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=YWHAZ PE=1 SV=1
162	tr E7ESK7 E7ESK7_HUMAN	80.65	15697	14-3-3 protein zeta/delta (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=YWHAZ PE=1 SV=1
163	P63104 1433Z_HUMAN	80.65	27745	14-3-3 protein zeta/delta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=YWHAZ PE=1 SV=1
164	tr E7EX29 E7EX29_HUMAN	80.65	28037	14-3-3 protein zeta/delta (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=YWHAZ PE=1 SV=1
165	tr BOQZK9 BOQZK9_HUMAN	80.49	8150	Heterochromatin protein 1-binding protein 3 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HP1BP3 PE=1 SV=8
166	tr BOQZK8 BOQZK8_HUMAN	80.49	13684	Heterochromatin protein 1-binding protein 3 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HP1BP3 PE=1 SV=1
167	Q5SSJ5 HP1B3_HUMAN	80.49	61207	Heterochromatin protein 1-binding protein 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HP1BP3 PE=1 SV=1
168	Q9P2E9 RRBP1_HUMAN	79.74	152456	Ribosome-binding protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RRBP1 PE=1 SV=5

169	tr AOA087WVV2 AOA087WVV2_HUMAN	79.74	102775	Ribosome-binding protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RRBP1 PE=1 SV=1
170	tr Q86WV2 Q86WV2_HUMAN	79.65	9291	COX4I1 protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=COX4I1 PE=1 SV=1
171	tr H3BPG0 H3BPG0_HUMAN	79.65	12649	Cytochrome c oxidase subunit 4 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=COX4I1 PE=1 SV=1
172	tr H3BN72 H3BN72_HUMAN	79.65	14369	Cytochrome c oxidase subunit 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=COX4I1 PE=1 SV=1
173	tr H3BNV9 H3BNV9_HUMAN	79.65	15725	Cytochrome c oxidase subunit 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=COX4I1 PE=1 SV=1
174	P13073 COX41_HUMAN	79.65	19577	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1 mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=COX4I1 PE=1 SV=1
175	Q13200 PSMD2_HUMAN	78.41	100200	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PSMD2 PE=1 SV=3
176	P23246 SFPQ_HUMAN	78.02	76150	Splicing factor proline- and glutamine-rich OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SFPQ PE=1 SV=2
177	POC0S5 H2AZ_HUMAN	73.52	13553	Histone H2A.Z OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H2AZ1 PE=1 SV=2
178	Q71U19 H2AV_HUMAN	73.52	13509	Histone H2A.V OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H2AZ2 PE=1 SV=3
179	tr C9J3N8 C9J3N8_HUMAN	72.4	3888	Heat shock protein beta-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPB1 PE=1 SV=1
180	tr AOA6Q8PFK8 AOA6Q8PFK8_HUMAN	72.4	21882	Heat shock protein beta-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPB1 PE=1 SV=1
181	P04792 HSPB1_HUMAN	72.4	22783	Heat shock protein beta-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPB1 PE=1 SV=2
182	tr AOA6Q8PGK1 AOA6Q8PGK1_HUMAN	72.4	23705	Heat shock 27 kDa protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPB1 PE=1 SV=1
183	tr B3KWK7 B3KWK7_HUMAN	72.18	21844	Insulin-like growth factor binding protein 3 isoform CRA_b OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IGFBP3 PE=1 SV=1
184	tr AGXNDO AGXNDO_HUMAN	72.18	29747	Insulin-like growth factor-binding protein 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IGFBP3 PE=1 SV=1
185	P17936 IBP3_HUMAN	72.18	31674	Insulin-like growth factor-binding protein 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IGFBP3 PE=1 SV=2
186	P31930 QCR1_HUMAN	71.41	52646	Cytochrome b-c1 complex subunit 1 mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=UQCRC1 PE=1 SV=3
187	P15144 AMPN_HUMAN	70.93	109539	Aminopeptidase N OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ANPEP PE=1 SV=4
188	Q86V81 THOC4_HUMAN	70.83	26888	THO complex subunit 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ALYREF PE=1 SV=3
189	tr E9PB61 E9PB61_HUMAN	70.83	27558	THO complex subunit 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ALYREF PE=1 SV=1
190	P05198 IF2A_HUMAN	70.54	36112	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF2S1 PE=1 SV=3
191	tr HOYDU3 HOYDU3_HUMAN	69.83	22443	Torsin-1A-interacting protein 1 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TOR1AIP1 PE=1 SV=2
192	tr HOYD16 HOYD16_HUMAN	69.83	22350	Torsin-1A-interacting protein 1 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TOR1AIP1 PE=1 SV=1
193	tr AOA0A0MSK5 AOA0A0MSK5_HUMAN	69.83	52406	Torsin-1A-interacting protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TOR1AIP1 PE=1 SV=1
194	Q5JTV8 TOIP1_HUMAN	69.83	66248	Torsin-1A-interacting protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TOR1AIP1 PE=1 SV=2
195	tr Q5T123 Q5T123_HUMAN	69.24	9381	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SH3BGR13 PE=1 SV=1
196	Q9H299 SH3L3_HUMAN	69.24	10438	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SH3BGR13 PE=1 SV=1
197	tr HOY6E7 HOY6E7_HUMAN	68.63	31865	RNA-binding motif protein X chromosome (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RBMX PE=1 SV=2

198	tr H3BT71 H3BT71_HUMAN	68.63	32197	RNA-binding motif protein X chromosome OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RBMX PE=1 SV=1
199	P38159 RBMX_HUMAN	68.63	42332	RNA-binding motif protein X chromosome OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RBMX PE=1 SV=3
200	tr E9PIE4 E9PIE4_HUMAN	68.58	28549	Mitochondrial carrier homolog 2 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MTCH2 PE=1 SV=8
201	Q9Y6C9 MTCH2_HUMAN	68.58	33331	Mitochondrial carrier homolog 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MTCH2 PE=1 SV=1
202	tr AOA7I2V4K9 AOA7I2V4K9_HUMAN	68.54	47746	Non-POU domain-containing octamer-binding protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NONO PE=1 SV=1
203	tr AOA7I2V4J2 AOA7I2V4J2_HUMAN	68.54	53818	Non-POU domain-containing octamer-binding protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NONO PE=1 SV=1
204	Q15233 NONO_HUMAN	68.54	54232	Non-POU domain-containing octamer-binding protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NONO PE=1 SV=4
205	tr AOA7I2V5Y7 AOA7I2V5Y7_HUMAN	68.54	54826	Non-POU domain-containing octamer-binding protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NONO PE=1 SV=1
206	tr AOA7I2V535 AOA7I2V535_HUMAN	68.54	57686	Non-POU domain-containing octamer-binding protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NONO PE=1 SV=1
207	P62937 PPIA_HUMAN	68.12	18012	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PPIA PE=1 SV=2
208	P35527 K1C9_HUMAN	68.01	62064	Keratin type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KRT9 PE=1 SV=3
209	tr K7EMV3 K7EMV3_HUMAN	67.59	10334	Histone H3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H3-3B PE=1 SV=1
210	tr K7EP01 K7EP01_HUMAN	67.59	12808	Histone H3.3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H3-3B PE=1 SV=1
211	tr AOA59OUJJ6 AOA59OUJJ6_HUMAN	67.59	13655	Histone H3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H3-3A PE=1 SV=1
212	tr B4DEB1 B4DEB1_HUMAN	67.59	14053	Histone H3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H3-3A PE=1 SV=1
213	tr K7EK07 K7EK07_HUMAN	67.59	14914	Histone H3 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H3-3B PE=1 SV=1
214	Q6NXT2 H3C_HUMAN	67.59	15214	Histone H3.3C OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H3-5 PE=1 SV=3
215	Q71DI3 H32_HUMAN	67.59	15388	Histone H3.2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H3C15 PE=1 SV=3
216	P84243 H33_HUMAN	67.59	15328	Histone H3.3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H3-3A PE=1 SV=2
217	Q16695 H31T_HUMAN	67.59	15508	Histone H3.1t OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H3-4 PE=1 SV=3
218	P68431 H31_HUMAN	67.59	15404	Histone H3.1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H3C1 PE=1 SV=2
219	Q5TEC6 H3PS2_HUMAN	67.59	15430	Histone HIST2H3PS2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H3-2 PE=1 SV=1
220	tr K7ES00 K7ES00_HUMAN	67.59	16621	Histone H3.3 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H3-3B PE=1 SV=1
221	O75380 NDUS6_HUMAN	66.37	13712	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 6 mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NDUFS6 PE=1 SV=1
222	tr D6RBT3 D6RBT3_HUMAN	66.37	18752	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 6 mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NDUFS6 PE=1 SV=1
223	P62805 H4_HUMAN	66.25	11367	Histone H4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H4C1 PE=1 SV=2
224	tr I3L1P8 I3L1P8_HUMAN	65.6	32182	Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC25A11 PE=1 SV=1

225	Q02978 M2OM_HUMAN	65.6	34062	Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC25A11 PE=1 SV=3
226	P47985 UCRI_HUMAN	65.16	29668	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=UQCRFS1 PE=1 SV=2
227	POC7P4 UCRIL_HUMAN	65.16	30815	Putative cytochrome b-c1 complex subunit Rieske-like protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=UQCRFS1P1 PE=5 SV=1
228	P24534 EF1B_HUMAN	65.07	24764	Elongation factor 1-beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EEF1B2 PE=1 SV=3
229	Q99536 VAT1_HUMAN	64.58	41920	Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog OS=Homo sapiens OX=9606 GN=VAT1 PE=1 SV=2
230	tr K7EJM4 K7EJM4_HUMAN	64.58	3358	Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=VAT1 PE=1 SV=1
231	tr I3L3H2 I3L3H2_HUMAN	62.97	44511	RNA helicase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF4A3 PE=1 SV=2
232	P38919 IF4A3_HUMAN	62.97	46871	Eukaryotic initiation factor 4A-III OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF4A3 PE=1 SV=4
233	tr HOY2V1 HOY2V1_HUMAN	61.81	48646	Microtubule-associated protein (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MAP4 PE=1 SV=1
234	tr H7C4C5 H7C4C5_HUMAN	61.81	50985	Microtubule-associated protein (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MAP4 PE=1 SV=1
235	tr B5MEG9 B5MEG9_HUMAN	61.81	80332	Microtubule-associated protein 4 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MAP4 PE=1 SV=9
236	tr F8W9U4 F8W9U4_HUMAN	61.81	88277	Microtubule-associated protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MAP4 PE=1 SV=1
237	P27816 MAP4_HUMAN	61.81	121005	Microtubule-associated protein 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MAP4 PE=1 SV=3
238	tr AOA804HKE7 AOA804HKE7_HUMAN	61.81	245370	Microtubule-associated protein 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MAP4 PE=4 SV=1
239	tr E7EVA0 E7EVA0_HUMAN	61.81	245442	Microtubule-associated protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MAP4 PE=1 SV=1
240	P62857 RS28_HUMAN	61.75	7841	40S ribosomal protein S28 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS28 PE=1 SV=1
241	tr HOY9H2 HOY9H2_HUMAN	61.24	48527	Alpha-adducin (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ADD1 PE=1 SV=1
242	tr E7EV99 E7EV99_HUMAN	61.24	70056	Alpha-adducin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ADD1 PE=1 SV=1
243	tr E7ENYO E7ENYO_HUMAN	61.24	73404	Alpha-adducin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ADD1 PE=1 SV=1
244	P35611 ADDA_HUMAN	61.24	80955	Alpha-adducin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ADD1 PE=1 SV=2
245	P19105 ML12A_HUMAN	60.27	19794	Myosin regulatory light chain 12A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MYL12A PE=1 SV=2
246	O14950 ML12B_HUMAN	60.27	19779	Myosin regulatory light chain 12B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MYL12B PE=1 SV=2
247	tr J3QRS3 J3QRS3_HUMAN	60.27	20457	Myosin regulatory light chain 12A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MYL12A PE=1 SV=1
248	Q9Y310 RTCB_HUMAN	59.54	55210	RNA-splicing ligase RtcB homolog OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RTCB PE=1 SV=1
249	tr E5RHHO E5RHHO_HUMAN	58.81	11663	V-type proton ATPase subunit H (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP6V1H PE=1 SV=1
250	tr G3V1N2 G3V1N2_HUMAN	58.8	11948	HCG1745306 isoform CRA_a OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HBA2 PE=1 SV=1
251	tr AOA2R8Y7CO AOA2R8Y7CO_HUMAN	58.8	13962	Hemoglobin subunit alpha (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HBA2 PE=1 SV=1
252	P69905 HBA_HUMAN	58.8	15258	Hemoglobin subunit alpha OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HBA1 PE=1 SV=2
253	tr J3QR48 J3QR48_HUMAN	57.8	16398	Importin subunit beta-1 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KPNB1 PE=1 SV=8
254	Q14974 IMB1_HUMAN	57.8	97170	Importin subunit beta-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KPNB1 PE=1 SV=2

255	P36543 VATE1_HUMAN	56.95	26145	V-type proton ATPase subunit E 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP6V1E1 PE=1 SV=1
256	tr AOA087X1B7 AOA087X1B7_HUMAN	55.72	8520	Chromatin target of PRMT1 protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CHTOP PE=1 SV=1
257	Q9Y3Y2 CHTOP_HUMAN	55.72	26397	Chromatin target of PRMT1 protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CHTOP PE=1 SV=2
258	tr E7EUT5 E7EUT5_HUMAN	55.61	27871	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GAPDH PE=1 SV=1
259	P04406 G3P_HUMAN	55.61	36053	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GAPDH PE=1 SV=3
260	tr E9PJT3 E9PJT3_HUMAN	55.6	29135	Splicing factor 3B subunit 2 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SF3B2 PE=1 SV=1
261	tr E9PJ04 E9PJ04_HUMAN	55.6	38417	Splicing factor 3B subunit 2 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SF3B2 PE=1 SV=8
262	tr HOYCG1 HOYCG1_HUMAN	55.6	42457	Splicing factor 3B subunit 2 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SF3B2 PE=1 SV=1
263	Q13435 SF3B2_HUMAN	55.6	100228	Splicing factor 3B subunit 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SF3B2 PE=1 SV=2
264	Q9NX14 NDUBB_HUMAN	54.69	17317	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 11 mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NDUFB11 PE=1 SV=1
265	tr MOR2I7 MOR2I7_HUMAN	54.45	22708	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPM PE=1 SV=1
266	tr MOQZM1 MOQZM1_HUMAN	54.45	40052	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPM PE=1 SV=1
267	tr AOA087XOX3 AOA087XOX3_HUMAN	54.45	77570	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPM PE=1 SV=1
268	P52272 HNRPM_HUMAN	54.45	77516	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPM PE=1 SV=3
269	tr AOA7I2V3F7 AOA7I2V3F7_HUMAN	53.62	65856	Stress-70 protein mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPA9 PE=1 SV=1
270	tr AOA7I2V2S7 AOA7I2V2S7_HUMAN	53.62	70320	75 kDa glucose-regulated protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPA9 PE=1 SV=1
271	tr D6RCD7 D6RCD7_HUMAN	53.62	72251	75 kDa glucose-regulated protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPA9 PE=1 SV=2
272	P38646 GRP75_HUMAN	53.62	73681	Stress-70 protein mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPA9 PE=1 SV=2
273	tr HOY400 HOY400_HUMAN	52.64	21798	Spliceosome RNA helicase DDX39B (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX39B PE=1 SV=1
274	tr AOA140T9X3 AOA140T9X3_HUMAN	52.64	38079	Spliceosome RNA helicase DDX39B (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX39B PE=1 SV=1
275	tr AOA0G2JJZ9 AOA0G2JJZ9_HUMAN	52.64	38244	Spliceosome RNA helicase DDX39B (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX39B PE=1 SV=1
276	tr Q5STU3 Q5STU3_HUMAN	52.64	48826	RNA helicase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX39B PE=1 SV=2
277	O00148 DX39A_HUMAN	52.64	49130	ATP-dependent RNA helicase DDX39A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX39A PE=1 SV=2
278	Q13838 DX39B_HUMAN	52.64	48991	Spliceosome RNA helicase DDX39B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX39B PE=1 SV=1
279	P62328 TYB4_HUMAN	51.78	5053	Thymosin beta-4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TMSB4X PE=1 SV=2
280	Q14956 GPNMB_HUMAN	51.75	63923	Transmembrane glycoprotein NMB OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GPNMB PE=1 SV=2
281	tr AOA3B3ISS6 AOA3B3ISS6_HUMAN	51.75	65942	Transmembrane glycoprotein NMB OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GPNMB PE=1 SV=1
282	tr AOA7I2V3K6 AOA7I2V3K6_HUMAN	51.29	27900	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF3I PE=1 SV=1
283	tr AOA7I2V4S8 AOA7I2V4S8_HUMAN	51.29	28293	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF3I PE=1 SV=1

284	tr Q5TFK1 Q5TFK1_HUMAN	51.29	29880	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF3I PE=1 SV=2
285	tr A0A7I2YQU2 A0A7I2YQU2_HUMAN	51.29	30922	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF3I PE=1 SV=1
286	tr A0A7I2YQT9 A0A7I2YQT9_HUMAN	51.29	30955	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF3I PE=1 SV=1
287	tr A0A7I2YQC8 A0A7I2YQC8_HUMAN	51.29	32939	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF3I PE=1 SV=1
288	tr A0A7I2V685 A0A7I2V685_HUMAN	51.29	33436	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF3I PE=1 SV=1
289	tr A0A7I2V640 A0A7I2V640_HUMAN	51.29	34400	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF3I PE=1 SV=1
290	tr A0A7POMRT9 A0A7POMRT9_HUMAN	51.29	36252	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF3I PE=1 SV=1
291	tr A0A7I2V3U3 A0A7I2V3U3_HUMAN	51.29	36374	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF3I PE=1 SV=1
292	Q13347 EIF3I_HUMAN	51.29	36502	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF3I PE=1 SV=1
293	tr A0A7I2V2M3 A0A7I2V2M3_HUMAN	51.29	38475	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF3I PE=1 SV=1
294	tr A0A7I2V3N2 A0A7I2V3N2_HUMAN	51.29	39404	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF3I PE=1 SV=1
295	tr A0A7I2V607 A0A7I2V607_HUMAN	51.29	40066	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF3I PE=1 SV=1
296	tr A0A7I2YQF8 A0A7I2YQF8_HUMAN	51.29	40490	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF3I PE=1 SV=1
297	tr A0A7I2V613 A0A7I2V613_HUMAN	51.29	42323	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF3I PE=1 SV=1
298	tr A0A7I2YQI6 A0A7I2YQI6_HUMAN	51.29	44901	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF3I PE=1 SV=1
299	tr A0A7I2YQI2 A0A7I2YQI2_HUMAN	51.29	48457	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF3I PE=1 SV=1
300	tr A0A0AOMRQ5 A0A0AOMRQ5_HUMAN	50.96	10676	Peroxiredoxin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRDX1 PE=1 SV=1
301	tr A0A0AOMSIO A0A0AOMSIO_HUMAN	50.96	18976	Peroxiredoxin-1 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRDX1 PE=1 SV=1
302	P32119 PRDX2_HUMAN	50.96	21892	Peroxiredoxin-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRDX2 PE=1 SV=5
303	Q06830 PRDX1_HUMAN	50.96	22110	Peroxiredoxin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRDX1 PE=1 SV=1
304	tr A0A6Q8PFY6 A0A6Q8PFY6_HUMAN	49.02	79916	Atriopeptidase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MME PE=1 SV=1
305	P08473 NEP_HUMAN	49.02	85514	Neprilysin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MME PE=1 SV=2
306	tr A0A7I2U302 A0A7I2U302_HUMAN	49.02	89011	Atriopeptidase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MME PE=1 SV=1
307	Q96C19 EFHD2_HUMAN	48.04	26697	EF-hand domain-containing protein D2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EFHD2 PE=1 SV=1

308	tr E9PG15 E9PG15_HUMAN	47.89	17048	14-3-3 protein theta (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=YWHAQ PE=1 SV=1
309	P27348 1433T_HUMAN	47.89	27764	14-3-3 protein theta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=YWHAQ PE=1 SV=1
310	Q07666 KHDR1_HUMAN	47.37	48227	KH domain-containing RNA-binding signal transduction-associated protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KHDRBS1 PE=1 SV=1
311	P01023 A2MG_HUMAN	46.71	163290	Alpha-2-macroglobulin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=A2M PE=1 SV=3
312	Q9NYU2 UGGT1_HUMAN	46.01	177189	UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=UGGT1 PE=1 SV=3
313	tr HOYKH2 HOYKH2_HUMAN	45.41	10815	SAFB-like transcription modulator (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLTM PE=1 SV=1
314	tr H7C3F4 H7C3F4_HUMAN	45.41	70492	SAFB-like transcription modulator (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLTM PE=1 SV=1
315	Q9NWH9 SLTM_HUMAN	45.41	117149	SAFB-like transcription modulator OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLTM PE=1 SV=2
316	tr J3QL14 J3QL14_HUMAN	45.11	26824	V-type proton ATPase subunit d 1 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP6VOD1 PE=1 SV=1
317	tr R4GN72 R4GN72_HUMAN	45.11	31676	V-type proton ATPase subunit d 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP6VOD1 PE=1 SV=1
318	P61421 VAOD1_HUMAN	45.11	40329	V-type proton ATPase subunit d 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP6VOD1 PE=1 SV=1
319	tr F5GYQ1 F5GYQ1_HUMAN	45.11	44660	V-type proton ATPase subunit OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP6VOD1 PE=1 SV=1
320	tr AOA2R8Y6I8 AOA2R8Y6I8_HUMAN	44.72	3562	Alpha-enolase (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ENO1 PE=1 SV=1
321	tr K7ERS8 K7ERS8_HUMAN	44.72	9074	Alpha-enolase (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ENO1 PE=1 SV=9
322	tr AOA2R8Y879 AOA2R8Y879_HUMAN	44.72	13496	Alpha-enolase (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ENO1 PE=1 SV=1
323	tr AOA2R8YEM5 AOA2R8YEM5_HUMAN	44.72	18381	2-phospho-D-glycerate hydro-lyase (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ENO1 PE=1 SV=1
324	tr K7EM90 K7EM90_HUMAN	44.72	21020	2-phospho-D-glycerate hydro-lyase (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ENO1 PE=1 SV=1
325	P06733 ENOA_HUMAN	44.72	47169	Alpha-enolase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ENO1 PE=1 SV=2
326	P13639 EF2_HUMAN	44.58	95338	Elongation factor 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EEF2 PE=1 SV=4
327	Q969G5 CAVN3_HUMAN	43.04	27701	Caveolae-associated protein 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAVIN3 PE=1 SV=3
328	tr E9PIE3 E9PIE3_HUMAN	43.04	31088	Caveolae-associated protein 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAVIN3 PE=1 SV=1
329	tr AOA7I2V354 AOA7I2V354_HUMAN	41.75	26468	Cathepsin K OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CTSK PE=1 SV=1
330	tr AOA7I2V5Y9 AOA7I2V5Y9_HUMAN	41.75	29186	Cathepsin K OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CTSK PE=1 SV=1
331	P43235 CATK_HUMAN	41.75	36966	Cathepsin K OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CTSK PE=1 SV=1
332	tr AOA7I2V2M6 AOA7I2V2M6_HUMAN	41.75	36932	Cathepsin K OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CTSK PE=1 SV=1
333	tr AOA7I2V4B1 AOA7I2V4B1_HUMAN	41.75	37395	Cathepsin K OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CTSK PE=1 SV=1
334	tr AOA7I2V5Y6 AOA7I2V5Y6_HUMAN	41.75	38459	Cathepsin K OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CTSK PE=1 SV=1
335	tr AOA7I2V4B6 AOA7I2V4B6_HUMAN	41.75	38611	Cathepsin K OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CTSK PE=1 SV=1
336	tr Q5QP40 Q5QP40_HUMAN	41.75	44101	Cathepsin K OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CTSK PE=1 SV=2
337	tr Q96B60 Q96B60_HUMAN	40.74	28841	Ecto-5'-nucleotidase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NT5E PE=1 SV=1
338	P21589 5NTD_HUMAN	40.74	63368	5'-nucleotidase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NT5E PE=1 SV=1

339	tr H7C2Y0 H7C2Y0_HUMAN	40.32	21650	Septin-2 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SEPTIN2 PE=1 SV=1
340	tr B5MCX3 B5MCX3_HUMAN	40.32	36940	Septin-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SEPTIN2 PE=1 SV=1
341	Q15019 SEPT2_HUMAN	40.32	41487	Septin-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SEPTIN2 PE=1 SV=1
342	Q14568 HS902_HUMAN	40.17	39365	Heat shock protein HSP 90-alpha A2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSP90AA2P PE=1 SV=2
343	Q58FF8 H90B2_HUMAN	40.17	44349	Putative heat shock protein HSP 90-beta 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSP90AB2P PE=1 SV=2
344	P08238 HS90B_HUMAN	40.17	83264	Heat shock protein HSP 90-beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSP90AB1 PE=1 SV=4
345	P07900 HS90A_HUMAN	40.17	84660	Heat shock protein HSP 90-alpha OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSP90AA1 PE=1 SV=5
346	tr AOA140T9X0 AOA140T9X0_HUMAN	40.08	26386	Flotillin (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FLOT1 PE=1 SV=1
347	tr AOA140T9R1 AOA140T9R1_HUMAN	40.08	39777	Flotillin (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FLOT1 PE=1 SV=1
348	O75955 FLOT1_HUMAN	40.08	47355	Flotillin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FLOT1 PE=1 SV=3
349	Q15293 RCN1_HUMAN	39.83	38890	Reticulocalbin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RCN1 PE=1 SV=1
350	tr G3V1Q4 G3V1Q4_HUMAN	39.58	46566	Septin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SEPTIN7 PE=1 SV=2
351	Q16181 SEPT7_HUMAN	39.58	50680	Septin-7 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SEPTIN7 PE=1 SV=2
352	O43678 NDUA2_HUMAN	39.45	10922	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NDUFA2 PE=1 SV=3
353	tr C9JM50 C9JM50_HUMAN	39.18	20843	Keratin type I cytoskeletal 19 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KRT19 PE=1 SV=1
354	tr F8VZY9 F8VZY9_HUMAN	39.18	43774	Keratin type I cytoskeletal 18 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KRT18 PE=1 SV=1
355	P08727 K1C19_HUMAN	39.18	44106	Keratin type I cytoskeletal 19 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KRT19 PE=1 SV=4
356	P05783 K1C18_HUMAN	39.18	48058	Keratin type I cytoskeletal 18 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KRT18 PE=1 SV=2
357	Q9NX63 MIC19_HUMAN	37.92	26152	MICOS complex subunit MIC19 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CHCHD3 PE=1 SV=1
358	tr C9JRZ6 C9JRZ6_HUMAN	37.92	26753	MICOS complex subunit MIC19 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CHCHD3 PE=1 SV=2
359	tr F8WAR4 F8WAR4_HUMAN	37.92	27735	MICOS complex subunit MIC19 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CHCHD3 PE=1 SV=1
360	tr C9J6J8 C9J6J8_HUMAN	37.92	7827	Sequestosome-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SQSTM1 PE=1 SV=2
361	tr AOA0D9SFY5 AOA0D9SFY5_HUMAN	37.07	18459	Lamin-B1 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LMNB1 PE=1 SV=1
362	tr AOA0D9SFE5 AOA0D9SFE5_HUMAN	37.07	37581	Lamin B1 isoform CRA_a OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LMNB1 PE=1 SV=1
363	tr E9PBF6 E9PBF6_HUMAN	37.07	44643	Lamin-B1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LMNB1 PE=1 SV=1
364	P20700 LMNB1_HUMAN	37.07	66408	Lamin-B1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LMNB1 PE=1 SV=2
365	tr R4GN98 R4GN98_HUMAN	36.98	9681	Protein S100 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=S100A6 PE=1 SV=1
366	P06703 S10A6_HUMAN	36.98	10180	Protein S100-A6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=S100A6 PE=1 SV=1
367	tr F5H6E2 F5H6E2_HUMAN	36.76	118994	Unconventional myosin-Ic OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MYO1C PE=1 SV=1
368	O00159 MYO1C_HUMAN	36.76	121682	Unconventional myosin-Ic OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MYO1C PE=1 SV=4
369	tr V9GYGO V9GYGO_HUMAN	36.55	22885	ADP/ATP translocase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC25A4 PE=1 SV=1

370	P05141 ADT2_HUMAN	36.55	32852	ADP/ATP translocase 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC25A5 PE=1 SV=7
371	P12235 ADT1_HUMAN	36.55	33065	ADP/ATP translocase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC25A4 PE=1 SV=4
372	P12236 ADT3_HUMAN	36.55	32866	ADP/ATP translocase 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC25A6 PE=1 SV=4
373	Q9H0C2 ADT4_HUMAN	36.55	35022	ADP/ATP translocase 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC25A31 PE=1 SV=1
374	tr AOA7I2U3A3 AOA7I2U3A3_HUMAN	33.69	29641	Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PIK3R2 PE=1 SV=1
375	tr AOA087WYW3 AOA087WYW3_HUMAN	33.57	131823	NK-tumor recognition protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NKTR PE=1 SV=1
376	P30414 NKTR_HUMAN	33.57	165676	NK-tumor recognition protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NKTR PE=1 SV=2
377	tr AOA087XOM7 AOA087XOM7_HUMAN	30.12	68018	Protein FAM13C OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FAM13C PE=1 SV=1
378	tr E9PNW4 E9PNW4_HUMAN	29.39	11985	CD59 glycoprotein OS=Homo sapiens OX=9606 PE=1 SV=1
379	tr AOA2U3TZL5 AOA2U3TZL5_HUMAN	29.39	13343	CD59 glycoprotein (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CD59 PE=1 SV=1
380	P13987 CD59_HUMAN	29.39	14177	CD59 glycoprotein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CD59 PE=1 SV=1
381	P09669 COX6C_HUMAN	29.14	8781	Cytochrome c oxidase subunit 6C OS=Homo sapiens OX=9606 GN=COX6C PE=1 SV=2
382	Q9Y4C1 KDM3A_HUMAN	28.81	147341	Lysine-specific demethylase 3A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KDM3A PE=1 SV=4

[0058]

어떤 화합물에 의해 표적이 된 단백질의 부재는 대상 단백질을 판별하는 기초를 제공한다. 본 발명의 발명가들은, 이전 연구에서, 화합물의 대상 단백질을 knock-down하여 화합물 매개 노화 회복 메커니즘을 밝혀내었다 (Lee, Y.H. et al. Targeting regulation of ATP synthase 5 alpha/beta dimerization alleviates senescence. *Aging (Albany NY)* **14**, 678-707 (2022)). 따라서 본 발명의 KB2764가 매개한 노화 변화에서 PKM 및 ENO1의 역할을 결정하기 위해 단백질이 knock-down되었다. 노화 섬유아세포에 대조군 shRNA (shCTRL), PKM shRNA (shPKM) 및 ENO1 shRNA (shENO1)을 렌티바이러스 감염시킨 후 단백질 knock-down이 평가되었고, 단백질 발현 수준이 평가되었다. shRNA 매개 PKM 및 ENO1 knock-down은 단백질의 내부 발현 수준을 감소시켰다 (도 34(a) 및 34(b)). 또한 shRNA 매개 PKM 및 ENO1 knock-down은 노화 섬유아세포의 ECAR 비율을 유의하게 감소시켰다 (도 35). 이러한 데이터는 PKM 및 ENO1 단백질이 노화 섬유아세포의 대사를 조절할 수 있다는 것을 나타낸다. 또한 본 발명의 발명가들은 KB2764를 통한 특정 단백질 제어에 의한 대사 변화가 노화와 관련이 있는지 가설을 세웠다. 이 가설은 KB2764로 처리된 PKM 또는 ENO1 knock-down 세포에서 노화 표지자를 측정하여 확인되었다. 대조군 shRNA 섬유아세포는 KB2764에 반응하여 ROS를 유의하게 감소시켰다(도 36(a)). PKM이 knock-down된 노화 섬유아세포는 KB2764 처리시 유의한 ROS 감소를 보였다 (도 36(a)). 이 결과는 KB2764에 의한 노화 변화의 영향이 PKM의 존재나 부재에 의존하지 않음을 나타낸다. 그러나 ENO1이 knock-down된 노화 섬유아세포는 KB2764에 대한 ROS 감소를 유발하지 않았다 (도 36(b)). 이러한 데이터는 ENO1이 KB2764 매개 노화 억제 효과에서 중요한 역할을 한다는 것을 보여준다. 이어서 MST assay를 수행하여 KB2764와 ENO1 간의 친화도를 확인하였다. His-tag를 달고 있는 ENO1이 다양한 농도의 KB2764가 함께 측정되었다. 해리상수(dissociation constant, K_d)가 94.7 nM로 측정되어 KB2764와 ENO1 간의 강한 연관성이 있음을 입증하였다(도 37(a)). 반면 KB2764와 PKM 간의 해리상수는 9.32 μ M로 측정되어 ENO1과 비교하여 작은 상호작용 정도를 나타내었다(도 37(b)). 종합적으로, 유전자 knock-down 결과는 KB2764가 ENO1 제어를 통해 노화를 개선한다는 것을 시사한다.

[0059]

ENO1과 KB2764 간의 상호작용은 세포 내에서 확인되었다. 그러나 KB2764 매개 ENO1 규제의 상세한 메커니즘은 아직 조사되지 않았다. 따라서 ENO1의 KB2764 매개 제어를 조사하기 위해 인산화 과정을 조사하였다. 여기서 조사된 ENO1의 새로운 인산화 부위를 식별하면 노화에서의 해당 과정(glycolysis)를 설명하는 데 도움이 될 수 있다. 그러므로 ENO1의 인산화 과정을 조사하기 위해 pCMV-Myc-ENO1(WT)를 HEK293T 세포주에 형질주입시켰다. 형질주입된 HEK293T는 DMSO 또는 KB2764로 처리한 후 Myc-tag 항체에 의해 면역 침강되었다. 면역침강된 ENO1(WT)는 KB2764에 반응하여 인산화된 형태가 증가하는 것으로 나타났다(도 38의 박스). KB2764에 의해 매개

되는 ENO1의 특정 인산화 부위는 phosphorylation motif kinase prediction tool(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)를 사용하여 조사되었다. 또한, *in silico* docking에서 KB2764는 ENO1과 수소 결합 상호작용을 형성하기 위한 가능한 결합 모드(binding mode)를 예측하였다(PDB ID: 3B97). ENO1 Ser 254 residue가 가능한 phosphorylation motif로 확인되었으며 다양한 종 간에 최소한의 차이(divergence)를 나타내었다(도 39). 예측된 인산화 부위를 확인하기 위해 254 Ser motif를 알라닌(alanine)으로 point mutation (S254A) 했다. 대조군으로 272 Ser (S272A)와 353 Ser (S353A)도 point mutation 했다(도 39). 이후 pCMV-Myc-ENO1(WT), pCMV-Myc-ENO1(S254A), pCMV-Myc-ENO1(S272A) 및 pCMV-Myc-ENO1(S353A)를 형질주입시키고, DMSO 또는 KB2764로 처리한 후 Myc-tag 항체에 의해 면역침강되었다(도 40). KB2764 처리는 ENO1(WT, S272A 및 S353A) 인산화를 증가시켰다(도 40). 반면, 예측된 ENO1 (S254A) motif는 KB2764에 반응하여 증가하지 않았으며, 이는 KB2764 매개 ENO1의 인산화가 Ser 254에서 형성된다는 것을 시사한다 (도 40의 박스 영역). KB2764는 ENO1과 수소 결합 상호작용을 형성하기 위한 가능한 결합 모드를 예측하였다(PDB ID: 3B97). 도 41에 나타난 것처럼, 옥사졸(oxazole)과 에스터(ester) 부분이 Ser 254와 상호 작용을 형성했다. 또한, 3-methylphenyl moiety가 ENO1의 Arg 253과 cation- π 반응을 했다(도 41). 이러한 데이터는 KB2764가 ENO1에 단단히 결합할 수 있으며, 노화 억제 효과의 잠재적인 타겟임을 시사한다. 어떤 단백질은 세포 내에서 구조 복합체를 형성하여 기능한다. ENO1은 세포 내에서 monomer, dimer, 및 octamer 형태로 존재한다. ENO1은 기능적으로 octamer 형태에서 활성화된다. 따라서 교차결합 후에 ENO1의 KB2764 매개 구조 변화를 확인하기 위해 면역블로팅을 수행하였다. KB2764 매개 노화 섬유아세포에서 ENO1 octamer 구조는 음성 대조군에 비해 유의하게 증가하였으며, ENO1 monomer구조는 음성 대조군에 비해 유의하게 감소한 것으로 나타났다(도 42). 이러한 데이터는 기본 단위 monomer가 기능적인 복합체인 octamer로 조립된다는 것을 시사한다. 따라서, 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 조성물은 ENO1(alpha-enolase)에 결합하여 ENO1을 인산화(phosphorylation)시킬 수 있다.

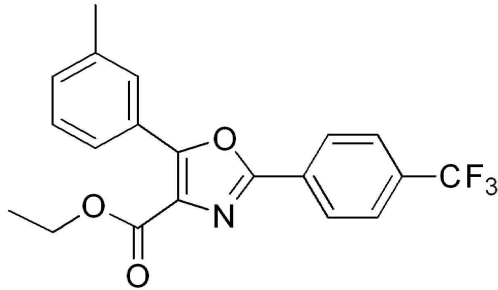
[0060]

본 발명의 일실시예에 따르면, KB2764 처리로 인한 노화 변화는 섬유아세포에서 확인되었다. 본 발명에서는 *in vitro*에서 확인된 노화 변화가 *in vivo*에서도 확인될 것이라고 가정하였다. *C. elegans*의 사용은 관찰의 용이함과 짧은 수명 주기로 인해 노화 재생에 대한 연구에 적절하다. 종래 연구와 마찬가지로 *C. elegans*의 유의한 수명 연장은 중요한 의미를 갖는다. 따라서 KB2764 매개 *C. elegans* 수명 연장이 테스트되었다. 수명 분석을 위해 동기화된(synchronized) *C. elegans*는 DMSO 또는 KB2764 (100 μ M)로 처리되었으며, 생존 군(live populations)은 매일 측정되었다. 측정된 데이터는 Kaplan-Meier survival분석으로 확인되었다. KB2764로 처리된 *C. elegans*의 2일간 생존율 중간값의 증가를 보여주었고, 이는 약 20일 정도의 전체 수명 주기에 비해 유의한 증가를 시사한다(도 43). 추가적인 실험이 KB2764 매개 수명 연장 결과를 재확인하기 위해 진행되었다. 노화 섬유아세포에서처럼, *C. elegans*에서 세포 노화 중에 세포질(cytosol)에 리포푸신(lipofuscin)이 축적된다. *C. elegans*에서 축적된 리포푸신 감소도 노화 재생의 지표로 볼 수 있다. 따라서 *C. elegans*의 리포푸신이 형광 현미경으로 확인되었다. KB2764로 처리된 *C. elegans*는 대조군 *C. elegans*에 비해 몸에 리포푸신이 적게 축적되었다(도 44). 축적된 리포푸신의 감소는 KB2764 매개 *C. elegans* 수명 연장을 재확인시켜주었다. 노화가 진행함에 따라, *C. elegans*의 활동성은 감소한다. 예를 들어, 젊은 *C. elegans*와 노화된 *C. elegans* 사이에는 체회도(body bending) 및 움직임에 있어서 명확한 차이점이 있다. 따라서 *C. elegans*의 활동성을 정량화하기 위해 분당 몸을 구부리는 빈도, 체회도(body bending)를 측정하였다. DMSO 또는 KB2764 (100 μ M)로 노출된 후 0, 7 및 14일째에 동기화된 *C. elegans*의 체회도가 평가되었다. 0일째에는 두 그룹 간의 *C. elegans*의 체회도에 통계적으로 유의한 차이가 관찰되지 않았다(도 45). 반대로, 시간이 경과함에 따라 대조군 *C. elegans*의 활동성이 7일째와 14일째에 현저하게 감소한 것이 관찰되었다(도 45). KB2764로 처리된 *C. elegans*는 시간이 경과함에 따라 활동성이 현저하게 감소하였지만, 대조군보다 활동성이 현저히 높았다(도 45). KB2764에 의해 매개된 높은 활동성의 유지는 *C. elegans* 수명 연장 효과를 지지한다. 종합하면, 이러한 결과는 KB2764 처리가 *C. elegans*의 노화 회복을 촉진한다는 것을 시사한다.

[0062]

본 발명의 다른 일측면에 따르면, 본 발명은 하기 [화학식 1]로 표시되는 옥사졸(oxazole) 유사체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 미토콘드리아 관련 질환의 증상을 예방, 억제 또는 치료하는 약학 조성물을 제공한다.

[0063] [화학식 1]



[0064]

[0066] 본 발명에서, 미토콘드리아 장애 또는 미토콘드리아 기능이상과 연관된 상태는 바람직하게는 OXPHOS결핍을 특징으로 하는 상태일 수 있다. 모든 세포는 에너지를 필요로 한다. 따라서, 에너지의 부족은 모든 세포의 활성화에 영향을 미친다. 원칙적으로, 모든 세포는 OXPHOS 복합체 중 하나 이상의 차선의 양(suboptimal amount)에 의해 영향을 받는다. 그러나, 차선의 실제 양은 세포마다 다르다. 예를 들어, 뇌 및 근육 세포와 같이 비교적 높은 에너지 소모를 갖는 세포는, 전형적으로 잔여 T-세포와 같이 낮은 에너지 소모를 갖는 세포보다 높은 양의 OXPHOS 시스템을 필요로 한다. 그러므로, OXPHOS 결핍에 의해 영향을 받는 세포는, 통상적으로 근육 세포 또는 뇌 세포이지만 여기에 국한되는 것은 아니다. 미토콘드리아 장애는 그들의 임상 양상에서 다중발현성이다(pleiotropic). 다양한 조직은 예컨대 췌장, 심장, 간, 눈, 내이(inner ear), 혈액, 결장(colon) 및 신장에 영향을 받을 수 있다. 또한, 섬유아세포와 같이 비-임상적으로(non-clinically) 영향받은 조직으로부터의 세포는 종종 미토콘드리아 결함을 나타낸다.

[0067] OXPHOS 결핍으로 인해 영향받은 세포는, 본 발명의 KB2764을 세포에 제공함으로써 OXPHOS 결핍을 억제, 치료 또는 예방될 수 있다. 구체적으로, OXPHOS 용량이 정상(즉, 건강한 개체로부터 동일한 종류의 비교 가능한 세포)보다 낮을 경우, 세포는 OXPHOS 결핍에 의해 영향을 받을 수 있다. OXPHOS 결핍인 개체로부터 유도되는 것 이외에, 세포가 OXPHOS 결핍을 갖는 지에 대해 결정하는 몇몇 방법들이 존재하며, 이러한 시험은 개별 OXPHOS 복합체의 산소 소모, ATP 생산 용량 및 효소 활성을 포함하지만 이에 국한되지 않는다(Chretien and Rustin J Inherit Metab Dis. 2003; 26(2-3): 189-98).

[0068] 본 발명의 일실시예에 따르면, 세포에 대한 본 발명의 KB2764의 투여가 OXPHOS 과정을 조절함으로써 대사 잠재력을 증가시킬 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 KB2764은 해당과정을 하향 조절하고 미토콘드리아 막전위를 증가시킴으로써 미토콘드리아 기능 회복을 가능하게 했고, 이로 인해 대사 잠재력을 높일 수 있다.

[0069] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 미토콘드리아 관련 질환은 미토콘드리아 장애에 관련된 질환으로서, 근간대성 간질(Myoclonic epilepsy); 불균일 적색근육 섬유를 갖는 근간대성 간질(Myoclonic Epilepsy Associated with Ragged-Red Fibers)(MERRF), 레버씨 선천성 시신경병증(Leber's Hereditary Optic Neuropathy)(LHON), 신경병증 실조 망막색소변성(neuropathy ataxia and retinitis pigmentosa)(NARP), 미토콘드리아 근병증, 뇌병증, 고젖산혈증, 뇌졸중(Mitochondrial Myopathy, Encephalopathy, Lactacidosis, Stroke)(MELAS), 레이 증후군(Leigh syndrome), 레이-유사 증후군(Leigh-like syndrome), 우성유전 시신경 위축(Dominant Optic atrophy)(DOA), 켄스-세이어 증후군(Kearns-Sayre Syndrome)(KSS), 모계유전 당뇨병 및 난청(Maternally Inherited Diabetes and Deafness)(MIDD), 알퍼스-후텐로처 증후군(Alpers-Huttenlocher syndrome), 실조 신경병증 스펙트럼(Ataxia Neuropathy spectrum), 만성 진행성 외안근마비(Chronic Progressive External Ophthalmoplegia)(CPEO), 피어슨 증후군(Pearson syndrome), 미토콘드리아 신경위장관 뇌병증(Mitochondrial Neuro-Gastro-Intestinal Encephalopathy)(MNGIE), 쉐거즈 증후군(Sengers syndrome), 3-메틸글루타콘 산성뇨, 감각신경성 난청, 뇌병증 및 레이-유사 증후군의 신경-방사선적 발견(MEGDEL), 근병증, 미토콘드리아 근병증, 심근증(cardiomyopathy), 및 뇌근병증(encephalomyopathy), SURF1(복합체 IV 과다 단백질 결핍(complex IV surfeit protein deficiency)으로 인한 COX 결핍 레이 증후군)으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0070] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 미토콘드리아 관련 질환은 미토콘드리아 기능이상과 관련된 질환으로서, 프리드리히 실조(Friedreich's Ataxia)(FRDA), 콩팥 요세관 산증(renal tubular acidosis), 파킨슨병(Parkinson's disease), 알츠하이머병, 근위축 측삭 경화증(amyotrophic lateral sclerosis)(ALS), 헌팅턴병(Huntington's disease), 전반적 발달 장애(developmental pervasive disorder), 청력 소실(hearing loss), 난

청(deafness) 및 당뇨병으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

- [0071] 본 발명의 일실시예에서, 상기 약학 조성물은 통상적인 방법에 따라 주사제, 과립제, 산제, 정제, 환제, 캡슐제, 좌제, 젤, 현탁제, 유제, 점적제 또는 액제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 제형을 사용할 수 있다.
- [0072] 본 발명의 일실시예에서, 상기 약학 조성물은 약학조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제, 붕해제, 감미제, 피복제, 팽창제, 유허제, 활택제, 향미제, 향산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 유허제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0073] 구체적으로 담체, 부형제 및 희석제는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, [0031] 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 사용할 수 있으며, 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 유허제들도 사용할 수 있다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 있으며 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제 등이 포함된다. 비수용성제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.
- [0074] 본 발명의 일실시예에 따르면 상기 약학 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 대상체로 투여할 수 있다.
- [0075] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 바람직한 투여량은 대상체의 상태 및 체중, 질환의 종류 및 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 달라질 수 있으며 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 본 발명의 일실시예에 따르면 이에 제한되는 것은 아니지만 1일 투여량이 0.01 내지 200 mg/kg, 구체적으로는 0.1 내지 200 mg/kg, 보다 구체적으로는 0.1 내지 100 mg/kg 일 수 있다. 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고 수회로 나누어 투여할 수도 있으며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.
- [0076] 본 발명에 있어서, 상기 대상체는 인간을 포함하는 포유동물일 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.
- [0077] 본 발명은 미토콘드리아 장애 또는 미토콘드리아 기능이상과 연관된 상태와 연관된 증상을 치료, 예방 또는 억제하는 데 유용한 물질을 함유하는 제조 물품 및 키트를 제공할 수 있다. 제조 물품은 라벨(label)을 갖는 컨테이너(container)를 포함한다. 적절한 컨테이너는 예컨대 병(bottle), 바이알(vial) 및 시험관(test tube)을 포함한다. 컨테이너는 유리 또는 플라스틱과 같은 다양한 물질로부터 형성될 수 있다. 컨테이너는 미토콘드리아 장애 또는 미토콘드리아 기능이상과 연관된 상태와 연관된 증상을 치료, 예방, 또는 억제하는 데 효과적인 활성 화제를 갖는 조성물을 보유하고 있다. 조성물 중의 활성화제는 본 발명의 화합물들 중 하나 이상이다. 컨테이너 상의 라벨은 바람직하게는 조성물이 미토콘드리아 장애 또는 미토콘드리아 기능이상과 연관된 상태와 연관된 증상을 치료, 예방 또는 억제하는 데 사용된다는 것을 나타내며, 또한 전술된 바와 같이 생체 내 또는 시험관 내용도에 대한 지시사항(direction)을 나타낼 수 있다.
- [0079] 이하 첨부된 도면을 참고하여 본 발명의 실시예를 상세히 설명하기로 한다.

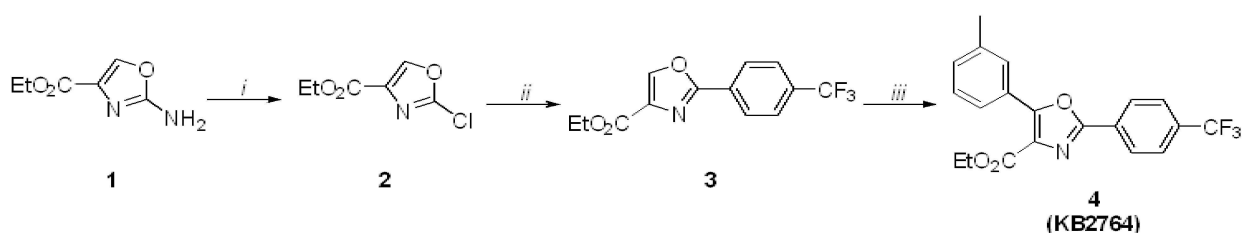
[0081] 실시예1. KB2764 및 비오틴화(biotinylated) KB2764의 합성

[0083] (1) 일반사항

[0084] 모든 화학물질과 용매들은 Sigma-Aldrich, TCI, 그리고 Acros에서 구매되었고, 추가 정제없이 사용되었다. 반응 진행은 미리 코팅된 실리카 겔 플레이트(Silica gel 60F₂₅₄; Merck, 독일 다름슈타트) 위에서 얇은 층 크로마토

그래피(thin-layer chromatography, TLC)로 모니터링되었고, 탐지하기 위해 UV254 광과 KMnO₄ 염색에 의해 시각화되었다. 컬럼 크로마토그래피(Column chromatography)는 실리카 젤(Silica gel 60, 230-400 mesh ASTM; Merck, 독일 다름슈타트)로 수행되었다. 핵자기공명(NMR) 스펙트럼은 Bruker UltraShield 600 MHz Plus (=1H, 600 MHz; ¹³C, 150 MHz) 분광기에서 상온에서 기록되었다. 모든 화학 시프트(chemical shifts)는 tetramethylsilane ($\delta = 0$)으로부터 ppm으로 보고되었고, 샘플이 분석된 용매에 상대적으로 측정되었다(CDCl₃: ¹H NMR 기준 δ 7.26, ¹³C NMR 기준 δ 77.0; MeOH-d₄: ¹H NMR 기준 δ 3.31, ¹³C NMR 기준 δ 49.0). ¹H NMR 시프트 값은 화학 시프트 (δ 해당 통합값(integral), 다중도 (s = singlet, br = broad, d = doublet, t = triplet, q = quartet, m = multiplet, dd = doublet of doublets, td = triplet of doublets, qd = quartet of doublets), 결합상수(coupling constant) (Hz 단위의 J), 그리고 assignments 로 보고되었다. 고해상도 질량 분광법 (HRMS)은 Agilent 6530 Accurate Mass Q-TOF LC/MS 분광기에서 기록되었다.

[0086] (2) KB2764 합성



시약 및 조건 : (i) *t*-BuONO, CuCl₂, acetonitrile, 80 °C 6 h; (ii) *m*-CH₃PhB(OH)₂, Pd(PPh₃)₄, toluene, H₂O, K₂CO₃, 90 °C 16시간; (iii) 3-bromotoluene, Pd(OAc)₂, P(*o*-tol)₃, Cs₂CO₃, toluene, 90 °C 16 시간.

[0090] Ethyl 2-chlorooxazole-4-carboxylate (2)

에틸 2-아미노옥사졸-4-카르복실레이트 (Ethyl 2-aminooxazole-4-carboxylate) (5.00 g, 32.0 mmol)를 아세토니트릴(acetonitrile)(150 mL)에서 *tert*-부틸 니트라이트(*tert*-butyl nitrite)(5.70 mL, 48.0 mmol, 1.5 eq), 구리(II)염화물(6.50 g, 48.0 mmol, 1.5 eq)의 교반된 용액에 포션으로(in portions) 첨가하였다. 그 후 혼합물을 80° C에서 6시간 동안 가열하였다. 용액은 냉각되어 이후 디클로로메탄(dichloromethane) (170 mL), 물(80 mL), 그리고 농축염산(8 mL)으로 구분되었다. 수성층은 추가적으로 디클로로메탄으로 추출되었고, 결합된 유기상(combined organics)은 건조시킨 (MgSO₄)로 씻은 뒤 증발시켰다. 잔류물은 실리카 젤(Hexane/Et₂O = 11:1에서 10:1까지, v/v)에서 컬럼 크로마토그래피로 정제되었고, 에틸 2-클로로옥사졸-4-카르복실레이트(Ethyl 2-chlorooxazole-4-carboxylate) (3.09 g, 49%)를 얻었다. R_f 0.43 (Hexane/Et₂O = 3:1 v/v). ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 8.19 (s, 1H), 4.40 (q, *J* = 7.2 Hz, 2 H), 1.39 (t, *J* = 7.2 Hz, 3 H).

[0093] Ethyl 2-(4-(trifluoromethyl)phenyl)oxazole-4-carboxylate (3)

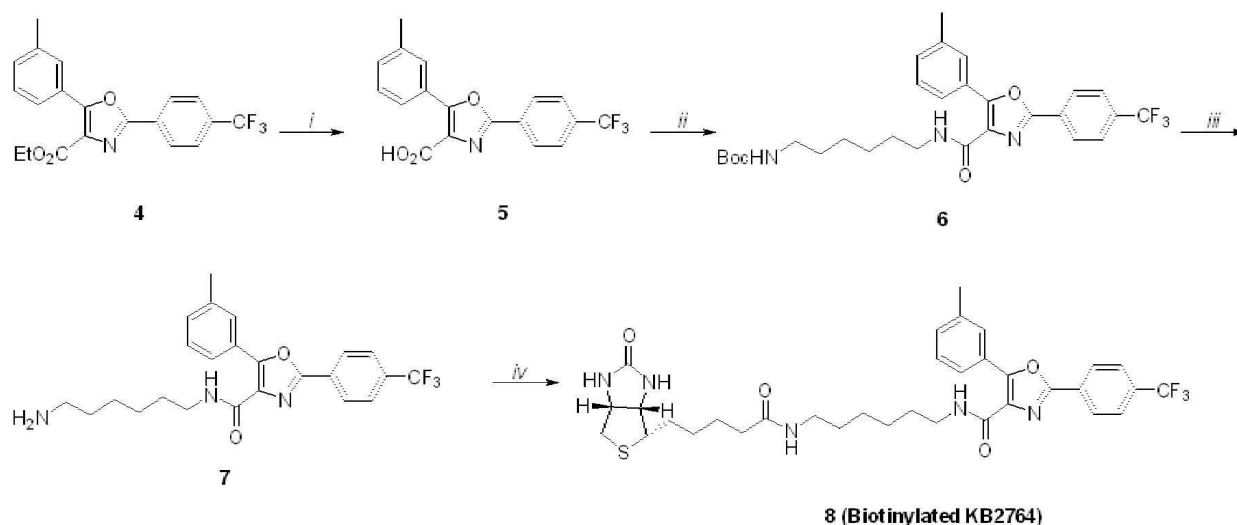
4-(트리플루오로메틸)페닐보로닉산 (4-(trifluoromethyl)phenylboronic acid)(1259 mg, 6.63 mmol, 1.5 eq) 용액에, Pd(PPh₃) (630 mg), 에틸 2-클로로옥사졸-4-카르복실레이트(Ethyl 2-chlorooxazole-4-carboxylate) (776 mg, 4.42 mmol)을 톨루엔 (20 mL)에서 물 (H₂O) (2 mL)의 K₂CO₃와 함께 첨가되었다. 용액은 80° C에서 아르곤 기체 하에서 16시간 동안 교반되었다. 용액은 냉각되어 이후 에틸 아세테이트(ethyl acetate)와 물로 구분되었다. 수성층은 추가적으로 에틸 아세테이트(ethyl acetate) (2 x 30 mL) 으로 추출되었고, 결합된 유기물(combined organics)은 건조시킨 (MgSO₄)로 씻은 뒤 증발시켰다. 잔류물은 실리카 젤(Hexane/Et₂O = 9:1에서 6:1까지, v/v)에서 컬럼 크로마토그래피로 정제되었고, 에틸 2-(4-(트리플루오로메틸)페닐)옥사졸-4-카르복실레이트 (Ethyl 2-(4-(trifluoromethyl)phenyl)oxazole-4-carboxylate)(1.01 g, 80%)를 얻었다. R_f 0.55

(Hexane/Et₂O = 1:1 v/v). ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) : δ 8.35 (s, 1H), 8.25 (d, *J* = 7.8 Hz, 2 H), 7.75 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 4.47 (q, *J* = 7.2 Hz, 2 H), 1.44 (t, *J* = 7.2 Hz, 3 H).

[0096] Ethyl 5-(*m*-tolyl)-2-(4-(trifluoromethyl)phenyl)oxazole-4-carboxylate (4)

[0097] 에틸 2-(4-(트리플루오로메틸)페닐)옥사졸-4-카르복실레이트 (Ethyl 2-(4-(trifluoromethyl)phenyl)oxazole-4-carboxylate) (303 mg, 1.06 mmol), 3-브로모톨루엔(3-bromotoluene) (154 μL, 1.27 mmol, 1.2 eq), 세슘 카보네이트(cesium carbonate) (518 mg, 1.6 mmol, 1.5 eq), 트리(*o*-톨릴)포스핀(tri(*o*-tolyl)phosphine) (65 mg, 0.21 mmol, 0.2 eq), 팔라듐 아세테이트(palladium acetate) (47.6 mg, 0.21 mmol, 0.2 eq)을 넣고, 아르곤 기체 하에서 90° C에서 16시간 동안 교반하였다. 용액은 냉각되어 이후 에틸 아세테이트(ethyl acetate)와 물로 구분되었다. 수성층은 이후 에틸 아세테이트(ethyl acetate) (2 x 30 mL) 로 추출되었고, 결합된 유기물(combined organics)은 건조시킨 (MgSO₄)로 씻은 뒤 증발시켰다. 잔류물은 실리카 젤(Hexane/EtOAc = 9:1 to 6:1, v/v)로 컬럼 크로마토그래피로 정제되었고, 에틸 5-(*m*-톨릴)-2-(4-(트리플루오로메틸)페닐)옥사졸-4-카르복실레이트 (Ethyl 5-(*m*-tolyl)-2-(4-(trifluoromethyl)phenyl)oxazole-4-carboxylate) (348 mg, 88%)을 얻었다. *R*_f 0.67 (Hexane/EtOAc = 2:1, v/v) (¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 8.28 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.90 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.75 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.40 (dd, *J* = 11.5, 4.2 Hz, 1H), 7.32 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 4.46 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.46 (s, 3H), 1.43 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). HRMS *m/z* : calcd for C₂₀H₁₆F₃NO₃ [M+H]⁺ 376.1116; found, 376.1158.

[0099] (3) 비오틴화(biotinylated) KB2764 합성



[0100]

[0101] 시약 및 조건 : (i) 1 M NaOH, EtOH, r.t., 6 h; (ii) *N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-1,6-diaminohexane, HOBt, EDC-HCl, DMF, r.t., 6 시간; (iii) TFA, DCM, r.t., 3 h; (iv) Biotin, HOBt, EDC-HCl, DMF, r.t., 6 시간.

[0103] 5-(*m*-Tolyl)-2-(4-(trifluoromethyl)phenyl)oxazole-4-carboxylic acid (5)

[0104] 에틸 5-(*m*-톨릴)-2-(4-(트리플루오로메틸)페닐)옥사졸-4-카르복실레이트 (Ethyl 5-(*m*-tolyl)-2-(4-(trifluoromethyl)phenyl)oxazole-4-carboxylate) (330 mg, 0.88 mmol) 용액에, 에탄올 (20 mL)에서 1 M NaOH (2.64 mL, 2.64 mmol, 3 eq)를 첨가하고, 아르곤 기체 하에서 실온에서 6시간 동안 교반하였다. 용액은 감압 하에서 증발되었다. 잔류물은 물과 3 N HCl로 산성화하여 pH = 1~2가 되도록 하였다. 고체물은 필터로 여과하여 헥산으로 세척한 후 5-(*m*-톨릴)-2-(4-(트리플루오로메틸)페닐)옥사졸-4-카르복실산 (5-(*m*-Tolyl)-2-(4-(trifluoromethyl)phenyl)oxazole-4-carboxylic acid) (275 mg, 91%)를 얻었다. *R*_f 0.4 (DCM/MeOH = 10:1,

v/v) (275 mg 91%) ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 8.26 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 8.11 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 8.07 (s, 1H), 7.79 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.43 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 7.34 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 2.47 (s, 3H).

[0106] tert-Butyl(6-(5-(m-tolyl)-2-(4-(trifluoromethyl)phenyl)oxazole-4-carboxamido)hexyl)carbamate (6)

[0107] 5-(m-톨릴)-2-(4-(트리플루오로메틸)페닐)옥사졸-4-카르복실산 (5-(m-Tolyl)-2-(4-(trifluoromethyl)phenyl)oxazole-4-carboxylic acid) (100 mg, 0.29 mmol) 용액에, N-(tert-부톡시카보닐)-1,6-디아미노헥산(N-(tert-butoxycarbonyl)-1,6-diaminohexane) (78 μL , 0.35 mmol, 1.2 eq), HOBt (62 mg, 0.46 mmol, 1.6 eq), EDC-HCl (88 mg, 0.46 mmol, 1.6 eq)를 DMF (10 mL)에서 넣고, 아르곤 기체 하에서 실온에서 6시간 동안 교반하였다. 용액은 감압 하에서 증발되었다. 잔류물은 에틸 아세테이트(ethyl acetate)와 물로 구분되었다. 수성층은 이후 에틸 아세테이트(ethyl acetate)로 더 추출되었다. 결합된 유기층(combined organic layer)은 MgSO_4 로 건조시키고 농축되었다. 잔류물은 플래시 크로마토그래피 ((0-20% EtOAc/Hexane, 25 g 실리카 젤 카트리지)로 정제되어, tert-부틸(6-(5-(m-톨릴)-2-(4-(트리플루오로메틸)페닐)옥사졸-4-카르복실아미도)헥틸)카바메이트 (tert-Butyl(6-(5-(m-tolyl)-2-(4-(trifluoromethyl)phenyl)oxazole-4-carboxamido)hexyl)carbamate) (135 mg, 88%)을 얻었다. R_f 0.04 (DCM/MeOH = 10:1, v/v) ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 8.23 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 8.20 - 8.16 (m, 2H), 7.77 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.43 - 7.36 (m, 2H), 7.27 (s, 1H), 4.52 (s, 1H), 3.47 (dd, J = 13.5, 6.9 Hz, 2H), 3.12 (d, J = 6.2 Hz, 2H), 2.46 (s, 3H), 1.70 - 1.64 (m, 2H), 1.57 (s, 2H), 1.51 (dt, J = 14.3, 7.2 Hz, 2H), 1.44 (s, 9H), 1.41 - 1.36 (m, 2H).

[0109] N-(6-Aminohexyl)-5-(m-tolyl)-2-(4-(trifluoromethyl)phenyl)oxazole-4-carboxamide (7)

[0110] tert-부틸(6-(5-(m-톨릴)-2-(4-(트리플루오로메틸)페닐)옥사졸-4-카르복실아미도)헥틸)카바메이트 (tert-Butyl(6-(5-(m-tolyl)-2-(4-(trifluoromethyl)phenyl)oxazole-4-carboxamido)hexyl)carbamate) (122 mg, 0.23 mmol) 용액에, 트리플루오로아세트산(trifluoroacetic acid) (3 mL)을 CH_2Cl_2 (9 mL)에서 첨가되었다. 반응 혼합물은 실온에서 3시간 동안 교반되었다. 반응 혼합물은 감압 하에서 증발되었고, N-(6-아미노헥실)-5-(메타-톨릴)-2-(4-(트리플루오로메틸)페닐)옥사졸-4-카르복시아미드 (N-(6-Aminohexyl)-5-(m-tolyl)-2-(4-(trifluoromethyl)phenyl)oxazole-4-carboxamide) (52 mg, 52%)을 얻었다. R_f 0.03 DCM/MeOH = 10:1, v/v) ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 8.19 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.93 - 7.88 (m, 2H), 7.76 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.65 (s, 1H), 7.37 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 7.29 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 3.47 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 2.98 (s, 2H), 2.42 (s, 3H), 1.67 (s, 4H), 1.42 (d, J = 30.0 Hz, 4H).

[0112] N-(6-(5-((3S,4S,6R)-2-Oxohexahydro-1H-thieno[3,4-d]imidazol-4-yl)pentanamido)hexyl)-5-(m-tolyl)-2-(4-(trifluoromethyl)phenyl)oxazole-4-carboxamide (8)

[0113] N-(6-아미노헥실)-5-(메타-톨릴)-2-(4-(트리플루오로메틸)페닐)옥사졸-4-카르복시아미드 (N-(6-Aminohexyl)-5-(m-tolyl)-2-(4-(trifluoromethyl)phenyl)oxazole-4-carboxamide) (40 mg, 0.11 mmol) 용액에, 비오틴(biotin) (33 mg, 0.13 mmol, 1.2 eq), HOBt (24 mg, 0.17 mmol, 1.6 eq), EDC-HCl (34 mg, 0.17 mmol, 1.6 eq)를 DMF (10 mL)에서 넣고, 아르곤 기체 하에서 실온에서 6시간 동안 교반하였다. 용액은 감압 하에서 증발되었다. 잔류물은 에틸 아세테이트(ethyl acetate)와 물로 구분되었다. 수성층은 이후 에틸 아세테이트(ethyl acetate)로 더 추출되었다. 결합된 유기층(combined organic layer)은 MgSO_4 로 건조시키고 농축되었다. 잔류물은 자동 플래시 크로마토그래피 (0-20% EtOAc/Hexane)로 정제되어, N-(6-(5-((3S,4S,6R)-2-옥소헥사하이드로-1H-티에노[3,4-d]이미다졸-4-일)펜타나미도)헥틸)-5-(메타-톨릴)-2-(4-(트리플루오로메틸)페닐)옥사졸-4-카르복시아미드 (N-(6-(5-((3S,4S,6R)-2-Oxohexahydro-1H-thieno[3,4-d]imidazol-4-yl)pentanamido)hexyl)-5-(m-tolyl)-2-(4-(trifluoromethyl)phenyl)oxazole-4-carboxamide) (40 mg, 54%)을 얻었다. R_f 0.4 (DCM/MeOH = 10:1, v/v) ^1H NMR (600 MHz, MeOD) δ 8.37 (d, J = 8.2 Hz, 10H), 8.13 (s, 5H), 8.08 (d, J = 8.0 Hz, 5H), 7.89 (d, J = 8.3 Hz, 10H), 7.42 (t, J = 7.7 Hz, 5H), 7.33 (d, J = 7.5 Hz, 6H), 4.60 (s, 3H), 4.47 (dd,

$J = 7.8, 4.8 \text{ Hz}, 5\text{H}$), $4.29 \text{ (dd, } J = 7.8, 4.5 \text{ Hz}, 5\text{H})$, $3.44 \text{ (t, } J = 7.1 \text{ Hz}, 1\text{H})$, $3.20 \text{ (d, } J = 5.9 \text{ Hz}, 1\text{H})$, $2.92 \text{ (dd, } J = 12.7, 5.0 \text{ Hz}, 5\text{H})$, $2.70 \text{ (d, } J = 12.7 \text{ Hz}, 5\text{H})$, $2.46 \text{ (s, } 15\text{H})$, $2.20 \text{ (t, } J = 7.3 \text{ Hz}, 10\text{H})$, $1.77 - 1.47 \text{ (m, } 50\text{H})$, $1.43 \text{ (dd, } J = 15.4, 8.0 \text{ Hz}, 30\text{H})$, $1.31 \text{ (s, } 9\text{H})$. HRMS m/z : calcd for $\text{C}_{34}\text{H}_{40}\text{F}_3\text{N}_5\text{O}_4\text{S} [\text{M}+\text{H}]^+$ 672.2792; found, 672.2767.

[0115] **실시예2. 세포 배양**

[0116] 인간 이중 염색체 섬유아세포 (HDF; PCS-201-010; ATCC, Manassas, VA, USA), 인간 배아 신장세포 (HEK293T; CRL-11268; ATCC) 및 Hela 세포 (A1100001; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)가 이 연구에 사용되었다. 세포들은 25mM의 포도당과 10%의 소태아혈청 (SH30919.03; Hyclone, Waltham, MA, USA), 100 U/ml 페니실린 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 스트렙토마이신 (SV30079.01; Hyclone)을 함유한Dulbecco's modified Eagle's medium에서 배양되었다. 세포 배양은 종래 연구들과 동일한 방법으로 수행되었다. 노화된 섬유아세포의 population이 2배가 되는 시간 14일 이상일 때 측정되었다. 세포 생존율(cell viability)은 Cedex HiRes Analyzer (05650216001; Roche, Basel, Switzerland)를 사용하여 평가되었다.

[0118] **실시예3. 화합물 라이브러리 스크리닝**

[0119] 노화된 HDFs는 96-웰 플레이트에 1개의 웰당 2,000개의 세포 밀도로 배양되었다. 라이브러리의 화합물들은 최종 농도가 8 μM 이 되도록 희석되고 4일마다 웰에 첨가되었다. 약물 처리 후 12일 뒤, 세포 증식(cell proliferation)이 측정되었다. 세포 증식 측정은 종래 연구의 방법으로 수행되었다.

[0121] **실시예4. 유세포 분석(FACS)**

[0122] FAC 분석은 세포의 *in vivo* 이미징에 핵심 시설에서 BD LSR II (LSR II; BD Bioscience; San Jose, CA, USA)에 의해 수행되었다. FACS를 이용한 실험방법은 명세서의 다른 부분에서 자세하게 기술되었다.

[0124] **실시예5. HDF에서 ROS, 미토콘드리아 질량(mitochondrial mass), 리포푸신(lipofuscin)의 측정**

[0125] 미토콘드리아 ROS의 양을 측정하기 위해, 세포들은 37°C에서 30분 동안 5 μM 의 MitoSOX (M36008; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)를 포함한 배지에서 인큐베이션되었다. 미토콘드리아 질량을 측정하기 위해, 세포들은 37°C에서 30분 동안 50 nM의 MitoTracker Green (M7514; Life Technologies)를 포함한 배지에서 인큐베이션되었다. HDFs의 리포푸신 측정을 위해서는 세포들을 염색되지 않았다. 세포들은 종래 연구에서 사용된 방법으로 FACS 분석을 위해 준비되었다

[0127] **실시예6. 미토콘드리아 막전위(mitochondrial membrane potential, MMP) 측정**

[0128] 미토콘드리아 막전위를 측정하기 위해서, 세포들은 37°C에서 30분 동안 0.6 $\mu\text{g/ml}$ JC-10 (ab112134; abcam, Waltham, MA, USA)으로 인큐베이션되었다. 염색을 한 후, 세포들은 종래 연구에서처럼 FACS분석을 위해 준비되었다.

[0130] **실시예7. 자가포식 흐름(autophagy flux) 측정**

[0131] 자가포식 흐름은 종래 기술대로 CYTO-ID®자가포식 검출법을 사용하여 측정되었다. 간단히 말해, 세포들은 30 μM 의 chloroquine (CQ; 455240250; Thermo Fisher Scientific)이 포함된 배지에서 인큐베이션되었습니다. 인큐베이션 후 24시간 뒤, 세포들은 CYTO-ID®Green Detection Reagent (CYTO-ID; ENZ-51031-0050; Enzo Lifescience, Farmingdale, NY, USA)와 50 nM의 LysoTracker™Deep Red (LTDR; L12492; Invitrogen, Waltham, MA, USA)로 30분간 염색되고 FACS 분석을 위해 준비되었다. 배경 자가형광(background autofluorescence)을 측정하기 위해, 세포들은 염료가 없는 배지에서 인큐베이션되었다. CYTO-ID로부터의 형광은 LTDR로부터의 형광으로 정규화되었다. 자가포식 흐름은 다음의 공식을 사용하여 계산되었다: $\Delta\text{mean fluorescence intensity}$ (Δ

CYTO-ID = MFI CYTO-ID (+CQ)/ MFI CYTO-ID (-CQ).

[0133] 실시예8. Comet assay

[0134] 트립신처리된 HDF를 1×10^5 cells/ml 농도로 준비한 후, 세포들은 PBS로 세척했다. 50 μ l의 세포와 500 μ l의 녹인 LMAgarose를 혼합하였다. 혼합물을 코메트(comet) 슬라이드에 75 μ l씩 놓고 빛을 차단하여 4℃에서 10분 동안 인큐베이션했다. 경질화된 코메트 슬라이드를 용해(lysis) 용액에 담갔다가, 4℃에서 1시간 동안 인큐베이션했다. 코메트 슬라이드를 용해 용액에서 $1 \times$ TBE 버퍼로 옮겨서 4℃에서 30분 동안 인큐베이션했다. 그 후 코메트 슬라이드를 35V, 45분간의 전기영동 조건으로 전기영동시켰다. 전기영동된 코메트 슬라이드를 상온에서 5분 동안 70% 에탄올로 인큐베이션했다. 고정된 코메트 슬라이드를 37℃에서 15분 동안 건조시켰다. 웰 당 50 μ l씩 SYBR Green 염색용액 (1:1000 로 증류수로 희석)을 FITC 현미경 (484 nm/521 nm)으로 관찰되었다.

[0136] 실시예9. 텔로미어(telomere) 길이 측정

[0137] 텔로미어 길이는 종래 기술과 같이 계능 DNA quantitative PCR(qPCR) 분석에 의해 측정되었다. 텔로미어 qPCR은 아래 표 2에 기재된 프라이머(primer)를 사용해서 수행되었다.

표 2

	프라이머	서열 (5' -3')	Size (bp)
텔로미어	FWD (서열번호 1)	CGGTTTGTGTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGG TTTGGGTT	39 bp
	REV (서열번호 2)	GGCTTGCCTTACCCTTACCCTTACCC TTACCCTTACCCT	39 bp
36B4	FWD (서열번호 3)	CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC	23 bp
	REV (서열번호 4)	CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA	25 bp

[0140] 실시예10. 해마 분석(Seahorse analysis)

[0141] Seahorse XFe96 분석기 (Aglient Technolngy, Santa Clara, CA, USA)가 제조업체의 프로토콜에 따라 사용되었다. 간단히 말해, 1×10^4 세포들이 XFe96 세포 배양 플레이트 (101085-004; Aglient Technolngy)의 각 웰로 분배되고, 37℃온도에서 5% CO₂ 인큐베이터에서 16시간 동안 배양되었다. 그런 다음에, 배지는 Seahorse XF DMEM pH 7.4 (103680-100; Aglient Technolngy)로 교체되었다. 세포의 산화율 (extracellular acidification rate, ECAR)은 Seahorse XF Glycolysis Stress Test kit (103020-100; Aglient Technolngy)를 사용하여 측정되었다. 산소 소비율 (oxygen consumption rate, OCR)은 Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit (103015-100 Aglient Technolngy)를 사용하여 측정되었다. ECAR은 mpH/min으로 보고되었고, OCR은 pmoles/min으로 보고되었다. 센서 카트리지는 Seahorse XFe96 Extracellular Flux Assay Kit (102416-100; Agilent Technology)에서 사용되었다. Seahorse 분석은 종래에 설명된 방법으로 수행되었다.

[0143] 실시예11. IM-MS/MS TOF 분석

[0144] 노화 HDF는 8 μ M의 비오틸화된 KB2764으로 12일동안 처리되었다. 면역침강(Immunoprecipitation) 및 데이터 분석은 종래 방법대로 수행되었다.

[0146] 실시예12. 플라스미드 제조

[0147] 플라스미드 pCMV-Myc-ENO1은 인간 알파-이놀라아제(human alpha-enolase)를 인코딩하는 cDNA (GenBank 접근번호

호: NM_001428.5)를 pCMV-Myc 벡터 (631604; Clontech, Mountain View, CA, USA)에 삽입하여 제조되었다. 플라스미드 pCMV-Myc-PKM은 피루빈산키나제 M(pyruvate kinase M)를 인코딩하는 cDNA (GenBank 접근번호: NM_001206796.3)를 pCMV-Myc 벡터에 삽입하여 제조되었다. His tag-Myc-ENO1 플라스미드는 HiFi DNA Assembly Master Mix (E2621L; New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)를 사용하여 pCMV-Myc-ENO1을 돌연변이화 (mutagenesis)함으로써 준비되었다. pCMV-Myc-ENO1(돌연변이 구조물) 플라스미드는 돌연변이화함으로써 준비되었다. pLKO.1-shENO1 및 pLKO.1-shPKM 플라스미드는 대상 유전자를 pLKO.1 플라스미드에 삽입하여 제조되었다. 플라스미드 제조에 사용된 프라이머는 표 3에 기재되어 있다.

표 3

백터	프라이머	서열 (5' -3')	Size (bp)
pCMV-Myc-ENO1	FWD (서열번호 5)	AGTCCAGTGTGGTGAATGTCTATTCTCAAGATCCATG	38 bp
	REV (서열번호 6)	GCCACTGTGCTGGATTACTTGCCAAGGGGTTTC	35 bp
pCMV-Myc-PKM	FWD (서열번호 7)	AGTCCAGTGTGGTGAATGTGCAAGCCCCATAGTGA	36 bp
	REV (서열번호 8)	GCCACTGTGCTGGATTACGGGCACAGGAACAACA	34 bp
His tag-Myc-ENO1	FWD (서열번호 9)	CATCATCACCATCACCATGGATCCTCGGATCCACTAGT	38 bp
	REV (서열번호 10)	ATGGTGATGGTGATGATGCAGGTCCTCCTCGGAGATCA	38 bp
pCMV-Myc-ENO1(S254A)	FWD (서열번호 11)	GAGTTCTTCAGGTCTGGGAAGTATGACCTGGACTT	35 bp
	REV (서열번호 12)	AGACCTGAAGAACTCGGAGGCCGCTACGTCCATGC	36 bp
pCMV-Myc-ENO1(S272A)	FWD (서열번호 13)	AGCAGGTACATCTCGCCTGACCAGCTGGCTGACCT	35 bp
	REV (서열번호 14)	CGAGATGTACCTGCTGGGGTCATCGGGAGACTTGA	36 bp
pCMV-Myc-ENO1(S353A)	FWD (서열번호 15)	TCCGTGACCGAGTCTCTTCAGGCGTGCAAGCTGGC	35 bp
	REV (서열번호 16)	AGACTCGGTCACGGAGCCAATCTGGTTGACTTTGA	36 bp
pLKO.1-shENO1	FWD (서열번호 17)	CCGGCCACTGTTGAGGTTGATCTCTCTCGAGAGAGATCAACCTCAACAGTGGTTTTTG	58 bp
	REV (서열번호 18)	AATTCAAAAACCACTGTTGAGGTTGATCTCTCTCGAGAGAGATCAACCTCAACAGTGG	58 bp
pLKO.1-shPKM	FWD (서열번호 19)	CCGGCCACTTGCAATTATTGAGGACTCGAGTCTCAAATAATTGCAAGTGGTTTTTG	58 bp
	REV (서열번호 20)	AATTCAAAAACCACTTGCAATTATTGAGGACTCGAGTCTCAAATAATTGCAAGTGG	58 bp

실시예13. 면역침강(Immunoprecipitation, IP)

pCMV-Myc-ENO1, pCMV-Myc-PKM, pCMV-Myc-ENO1(돌연변이 구조물), 그리고 His tag-Myc-ENO1 플라스미드들이 HEK293T 세포 (CRL-11268; ATCC)에 형질주입(transfection)되었다. 형질주입된 세포들은 1 μ M 퓨로마이신 (puromycin) (BML-GR312-0050; Enzo Lifescience)으로 14일 동안 선택되었다. 선택 기간 동안 매 2일마다 배지가 교체되었다. 선택 후, 종래에 설명된 방법으로 면역침강이 수행되었다. 사용된 1차 항체는 anti-Myc tag 항체 (2276s; 1:1,000 희석; cell signaling), anti-p-SQ/TQ 항체 (2851s; 1:1,000 희석; cell signaling), HRP-결합 β 액틴 (sc47778; 1:2,000 희석; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) 및 HRP-결합 anti-rabbit IgG (sc-2004; 1:2,000 희석; Santa Cruz Biotechnology)이었다.

[0153] **실시예14. *In Silico* Docking 분석**

[0154] 리간드 준비 및 최적화: KB2764는 ChemDrawUltra (버전 12.0.2, CambridgeSoft) 및 Maestro (버전 13.4.134, MMshare 버전 6.0.134, Schrodinger)를 사용하여 각각 2D 및 3D 구조로 생성되었다. Maestro 빌더 패널에서 LigPrep 모듈을 사용하여 수소 원자를 추가하고 염들을 제거하며 pH (7 ± 2)에서 이온화하여 리간드의 3D 구조를 생성했다. 단백질 준비: ENO1 구조 (PDB ID: 3B97)는 단백질 데이터베이스 (<https://www.rcsb.org>)에서 얻었다. 단백질 구조는 Maestro 패널의 단백질 준비 워크플로우를 사용하여 준비되었다. 단백질 준비 중에, 결합 차수(bond order)가 구체화되고 수소 원자들이 추가되었다. 물 분자들은 제거되었다. 수용체 그리드 상자는 "Glide의 Receptor Grid Generation" 모듈을 사용하여 생성되었다. KB2764의 ENO1과의 결합 분석은 Maestro 패널의 표준 정밀도 리간드 도킹 프로토콜(Standard Precision ligand docking protocol)을 사용하여 수행되었다.

[0156] **실시예15. 렌티바이러스 생성(Lenti-viral production) 및 감염**

[0157] HEK 293T 세포들은 Lipofectamine 2000 (11668019; Invitrogen)을 사용하여 8 μ g의 shRNA 플라스미드 (pLK0.1-ctrl, pLK0.1-ENO1, 및 pLK0.1-PKM), 4 μ g의 PAX2 플라스미드, 및 4 μ g의 VSV.G 플라스미드로 형질 주입(transfection)되었다. 형질주입된 후 24시간 이후 바이러스 상층액(Viral supernatant)이 수확되었다. 바이러스 상층액에 Polybrene (TR-1003-G; 8 μ g/ml; Millipore, Burlington, Middlesex County, MA, USA)이 첨가되었다. 바이러스 감염은 종래에 설명된 방법대로 노화된 HDFs에 수행되었다.

[0159] **실시예16. 마이크로스케일 열영동(Microscale thermophoresis, MST) 검사**

[0160] 6 $\times$ His-tagged ENO1 단백질은 Capturem™ His-Tagged Purification Maxiprep Kit (635713; Takara, Mountain View, CA, USA)을 사용하여 정제되었다. 200 nM의 6 $\times$ His-tagged ENO1 단백질은 Monolith His-Tag Labeling Kit RED-tris-NTA 2nd Generation (MO-L018; Nano Temper Technologies, Munchen, Germany)를 사용하여 라벨링되었으며, 0.4 mM의 KB2764가 사용되었다. MST(Microscale Thermophoresis) 실험은 종래에 설명된 방법대로 수행되었다.

[0162] **실시예17. PKM 및 ENO1의 교차결합(crosslinking)**

[0163] 노화된 HDFs는 DMSO와 KB2764로 처리된 후 세포 용해 용액 (87787; Thermo Fisher Scientific)을 사용하여 4°C에서 30분 동안 용해되었다. 용해물은 DPBS (21-031-CVC; Corning, NY, USA)로 버퍼 교환되었다. 그런 다음, 5mM 농도의 bis(sulfosuccinimidyl) suberate (BS3; 21580, Thermo Fisher Scientific)를 상온에서 30분 동안 처리하여 교차결합(crosslinking)을 수행했다. 교차결합된 샘플들은 100°C에서 10분 동안 끓여진 후 면역블로팅 (immunoblotting)을 통해 확인되었다. 사용된 1차 항체는 enolase-1 (1: 1,000; 3810T; Cell Signaling Technology), PKM2 (1: 1000; 4053T; Cell Signaling Technology) 및 HRP-결합 β 액틴 (sc47778; 1:2,000 희석; Santa Cruz Biotechnology)이었다. 사용된 2차 항체는 HRP-결합 anti-rabbit IgG (sc-2004; 1:2,000 희석; Santa Cruz Biotechnology)이었다.

[0165] **실시예18. *C. elegans* 배양을 위한 시약 및 배지**

[0166] M9 버퍼는 5.8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3.0 g KH_2PO_4 , 5.0 g NaCl, 0.25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1L D.W (증류수)를 함유했다. M9 버퍼는 0.22 μ m 필터를 통해 여과되었다. 20% 알칼리성 히포클로라이트 용액(alkaline hypochlorite solution)은 3.75 ml NaOH (1M), 3.0 ml 표백제 (Bleach) 및 8.25 ml D.W (증류수)를 혼합함으로써 준비되었다. 네마토드 성장 배지(nematode growth medium, NGM)를 위해, 3 g NaCl, 2.5 g 펩톤, 17 g 아가 (agar) 및 975 ml D.W (증류수)가 혼합되고 멸균(autoclaved)되었다. 병은 55 °C로 냉각되고, 1 ml CaCl_2 (1 M), 1 ml MgSO_4 (1 M), 25 ml KPO_4 (1 M, pH 6.0), 에탄올(5 mg/ml)속 1 ml 콜레스테롤이 혼합되어 플레이트를 형성했다.

[0167] OP50 (#053114; EDVOTEK, Washington, DC, USA)이 배양된 NGM 배지에 OP50을 접종한 후, 37 °C 인큐베이터에서 하룻밤 동안 배양되어 제조되었다.

[0169] **실시예19. *C. elegans* 배양 및 동기화(synchronization)**

[0170] *C. elegans* (WT)은 OP50으로 배양된 NGM 배지에 접종되어 22 °C에서 인큐베이션되었다. *C. elegans*를 2~3일 동안 성장시킨 후, 플레이트 상에 존재하는 알과 벌레(worm)가 3 ml의 M9 버퍼로 준비되었다. 10분 동안 알과 벌레를 침전시킨 후, 상층액을 제거했다. 15 ml의 20% 알칼리성 히포클로라이트 용액(alkaline hypochlorite solution)을 완성하면서 부드럽게 5분간 뒤집었다. 그 후 760 ×g, 2분 동안 원심분리하여 M9 버퍼로 두 번 세척했다. 마지막으로 7 ml의 M9 버퍼를 넣고 부드럽게 흔들어 하룻밤 동안 놓아두었다. 다음 날, L1 단계의 *C. elegans*가 OP50으로 배양된 NGM 배지에서 성장했다. OP50으로 배양된 NGM 배지는 매 2일마다 재배치되었다.

[0172] **실시예20. *C. elegans* 생존성 분석(*C. elegans* 수명)**

[0173] 동기화된 *C. elegans*는 알을 낳지 못하도록 5-플루오로-2'-데옥시우리딘 (5-fluoro-2'-deoxyuridine)(FudR, 50 μM)로 처리되었다. 동기화된 L1 단계 *C. elegans*는 22 °C에서 2~3일 동안 인큐베이션되었다. 성체 *C. elegans*는 DMSO 또는 KB2764 (100 μM)가 포함된 OP50으로 배양된 NGM 배지 플레이트로 옮겨졌다. 생존성 분석은 22 °C에서 수행되었고 매 2일마다 배지는 교체되었다. *C. elegans*의 생존율은 현미경으로 관찰하고 매일 확인되었다. 생존성 분석은 Kaplan-Meier 방법을 사용하여 수행되었다.

[0175] **실시예21. *C. elegans* 리포푸신(lipofuscin) 측정**

[0176] 리포푸신 검출은 DMSO 또는 KB2764 (100 μM)가 포함된 OP50으로 배양된 NGM 배지 플레이트에서 10일째에 수행되었다. 리포푸신의 존재는 X-Cite®120Q (Excelitas Technologies, Waltham, MA, USA)와 Zeiss AxioVert 200 (Zeiss, Oberkochen, Land Baden-Württemberg, Germany)로 장비를 구비하여 관찰되었다. *C. elegans*의 리포푸신은 450-490 nm에서 관찰되었다.

[0178] **실시예22. *C. elegans* 체휘도(body bends) 측정**

[0179] 체휘도 측정은 DMSO 또는 KB2764 (100 μM)가 포함된 OP50으로 배양된 NGM 배지 플레이트에서 10일째에 수행되었다. *C. elegans*의 움직임(wriggling) (왕복을 기준으로)은 1분 동안 현미경을 사용하여 측정되었다.

[0181] **실시예23. 통계 분석**

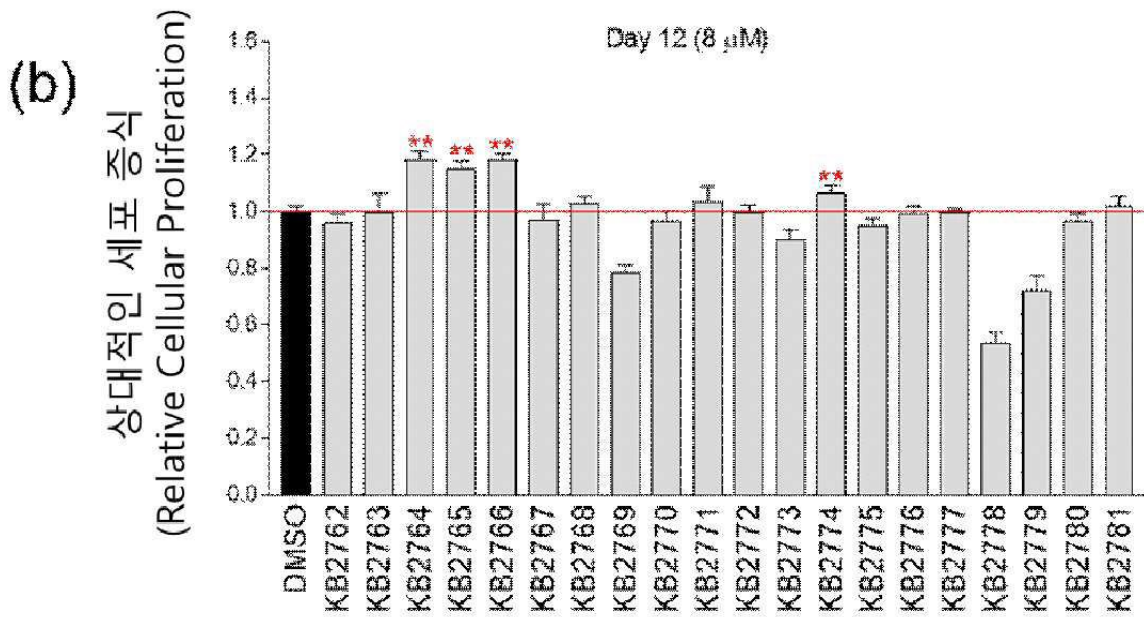
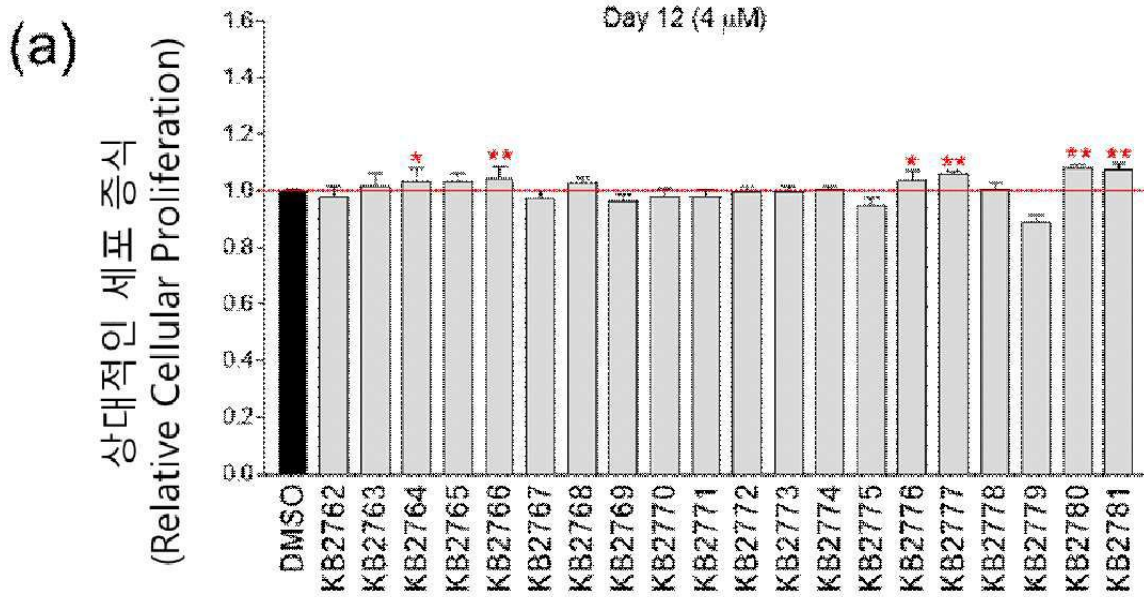
[0182] 통계 분석은 표준 통계 소프트웨어 패키지(SigmaPlot 12.5; Systat Software, San Jose, CA, USA)를 사용하여 수행되었다. 차이가 유의한지 여부를 결정하기 위해 Student's t-test와 Bonferroni's posttest를 사용하였다. 열 기준으로 데이터 분석을 위해 이원배치분산분석 (two-way ANOVA)을 수행하였다. Kaplan-Meier 방법은 GraphPad Prism 7 소프트웨어(GraphPad, San Diego, CA, USA)에서 검증되었다. 생존 곡선 사이의 유의성은 Kaplan-Meier 방법을 통해 평가되었다.

[0184] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

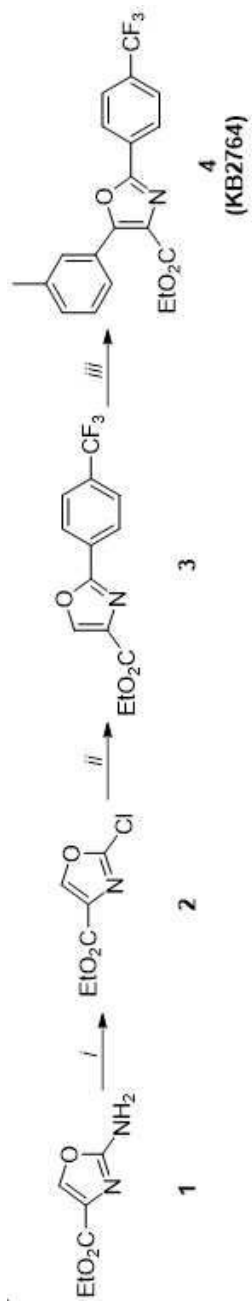
[0185] 본 발명의 범위는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

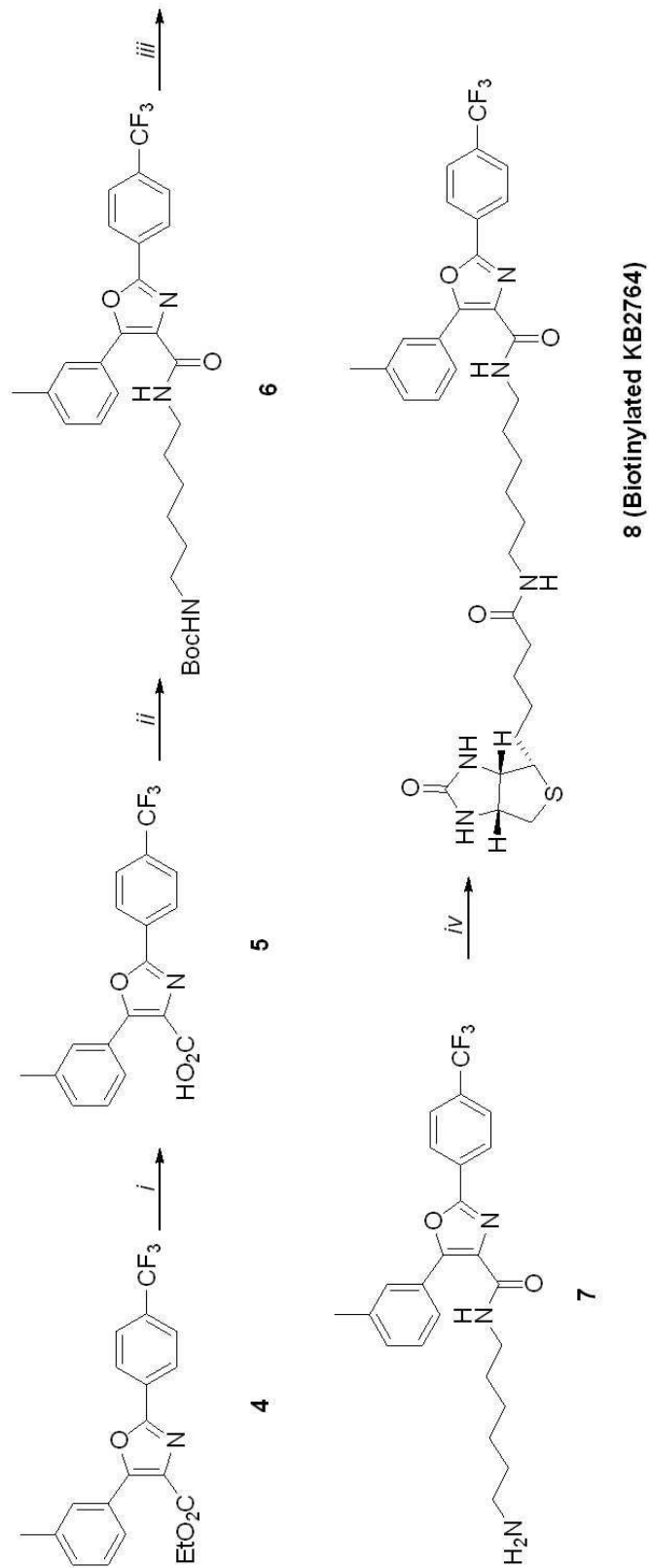
도면1



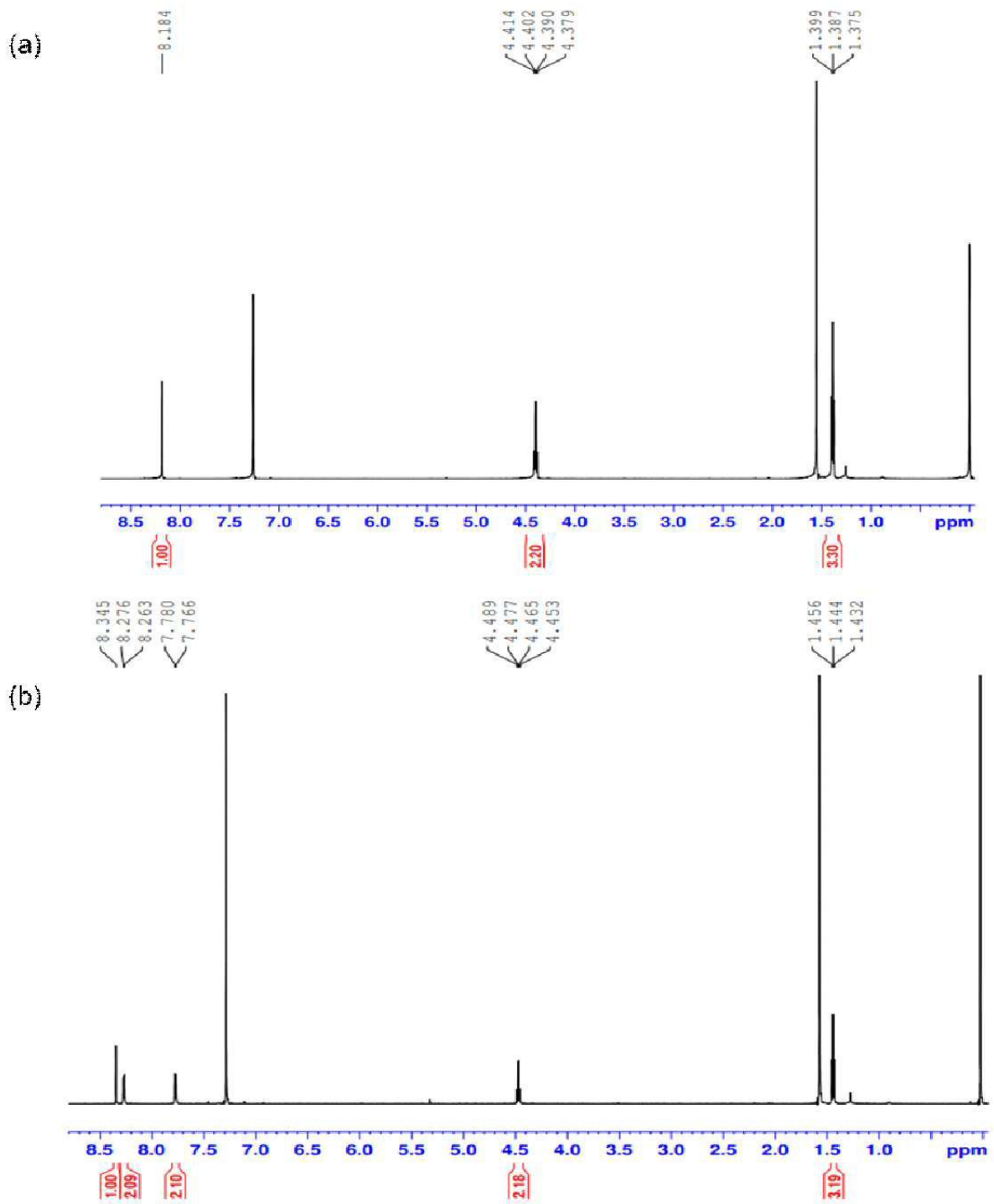
도면2



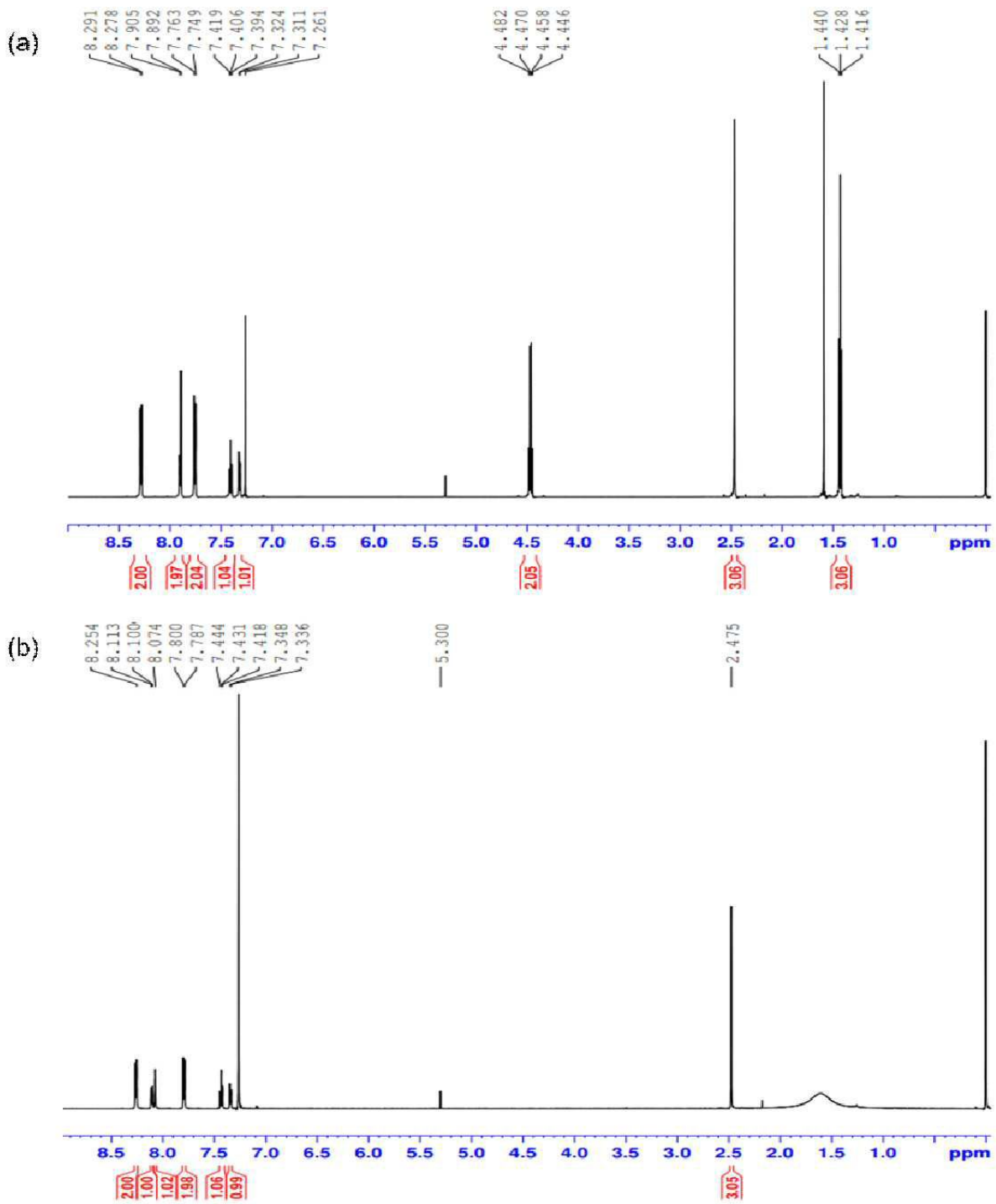
도면3



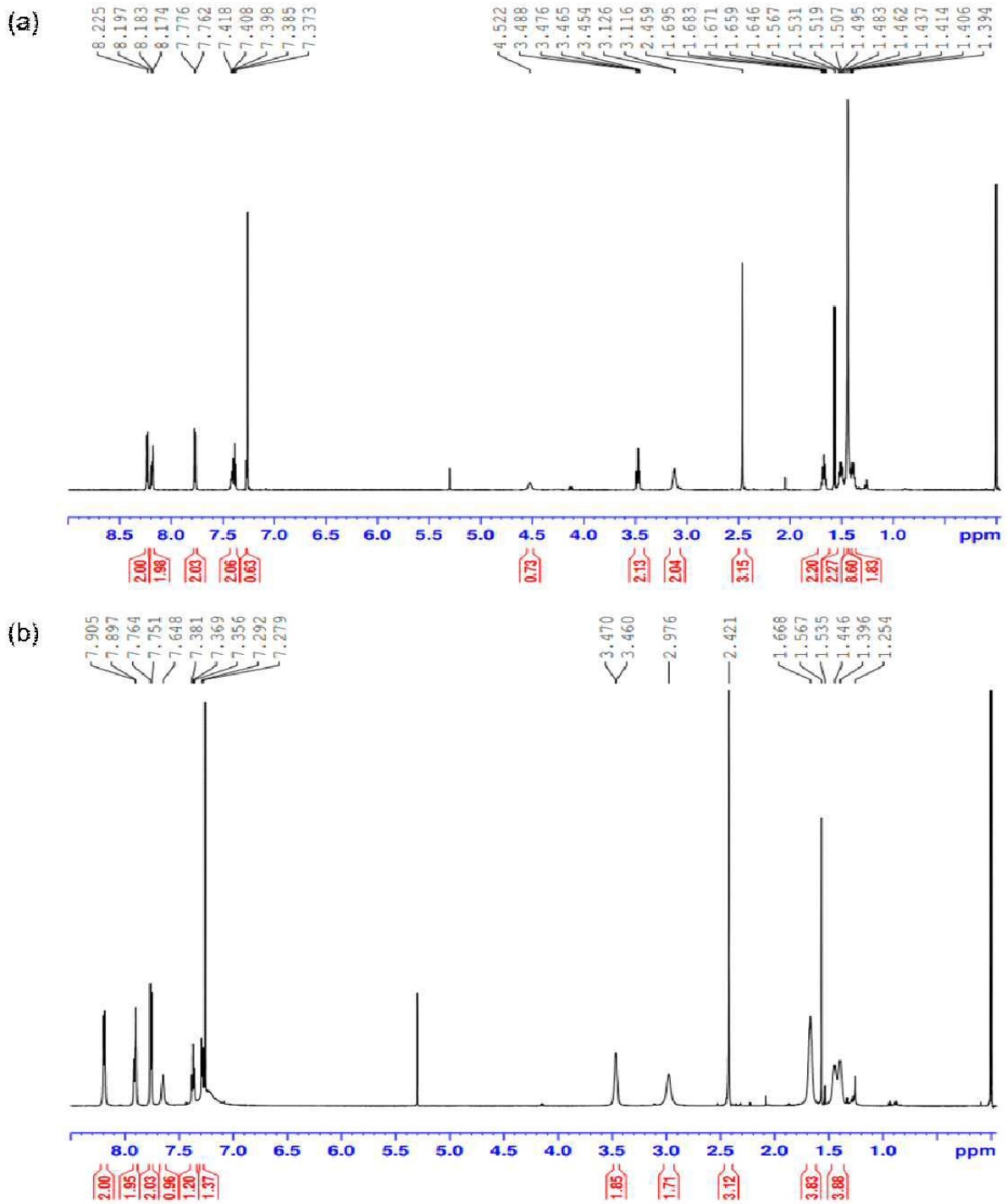
도면4



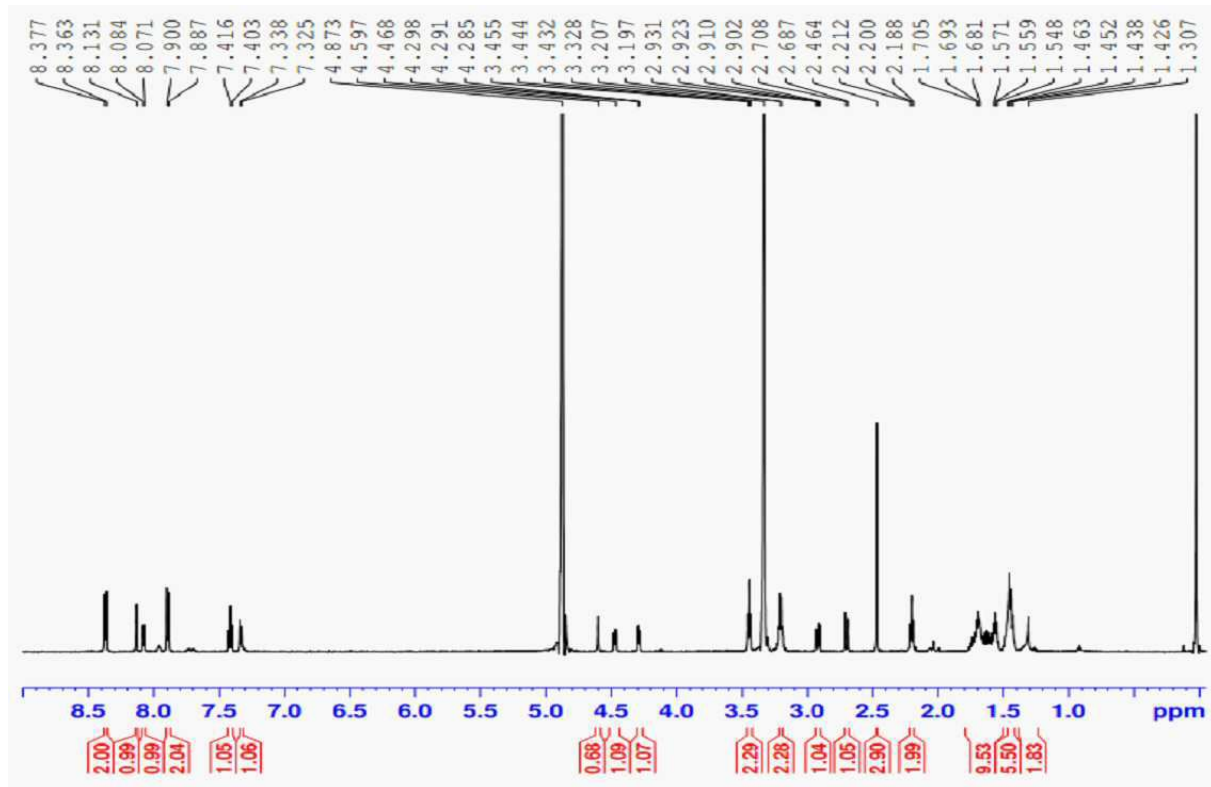
도면5



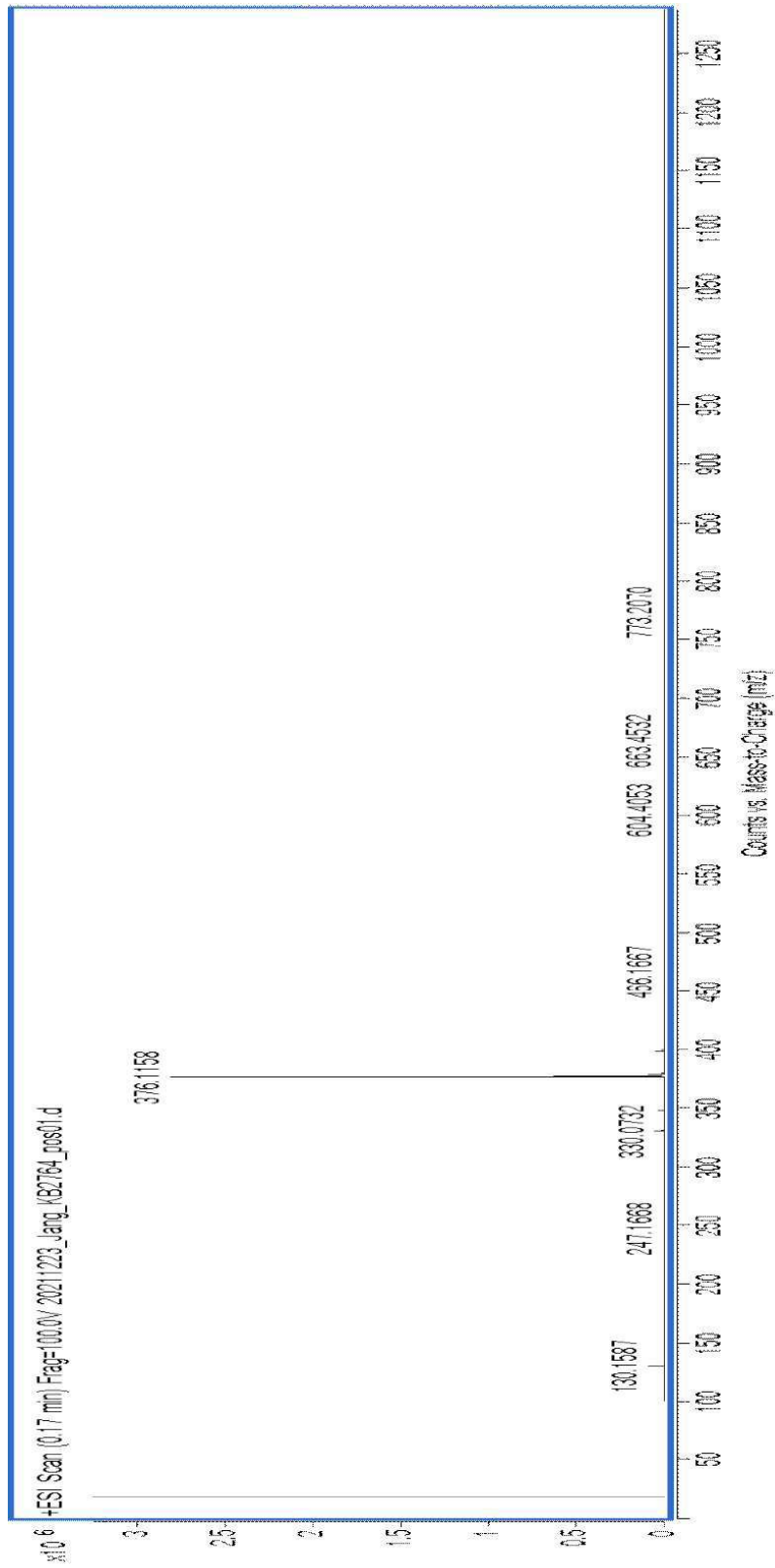
도면6



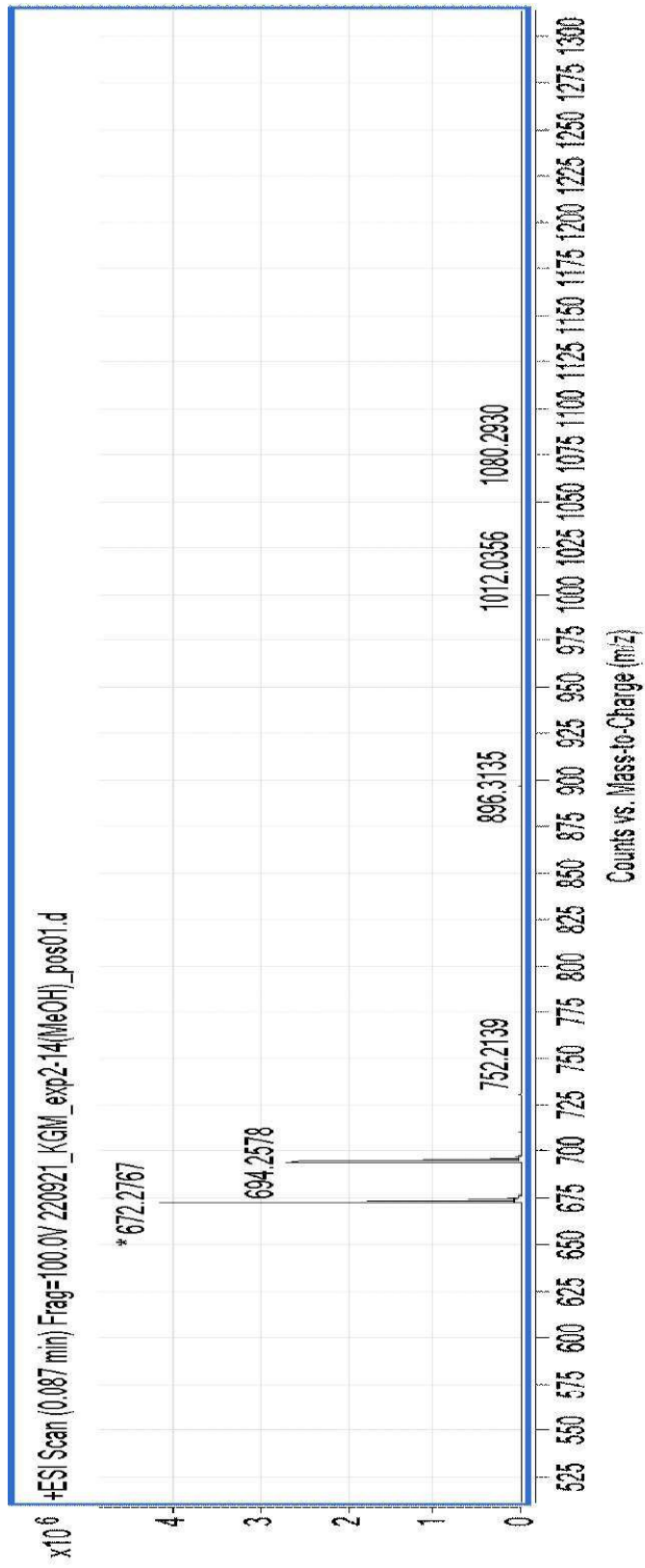
도면7



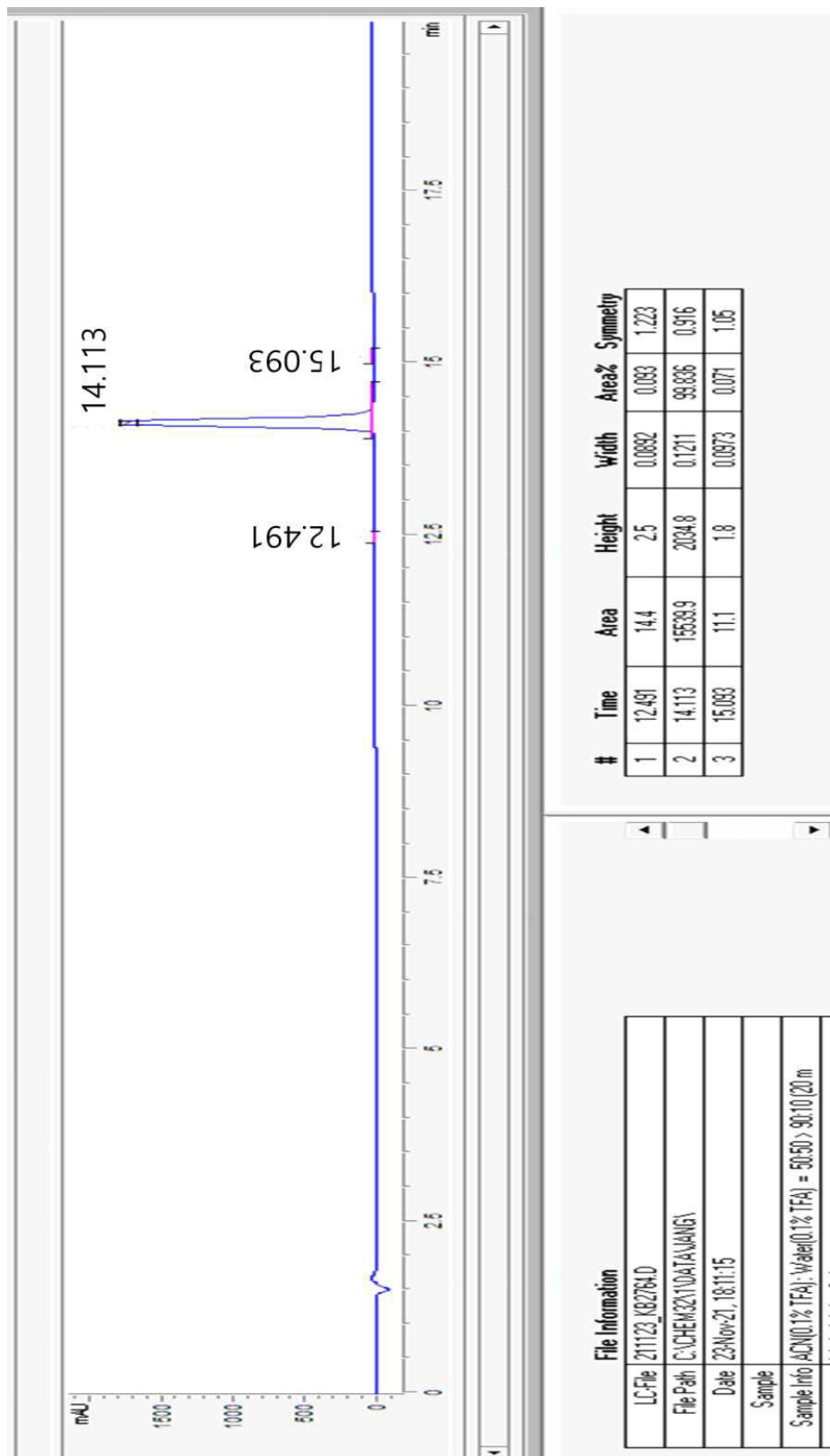
도면8



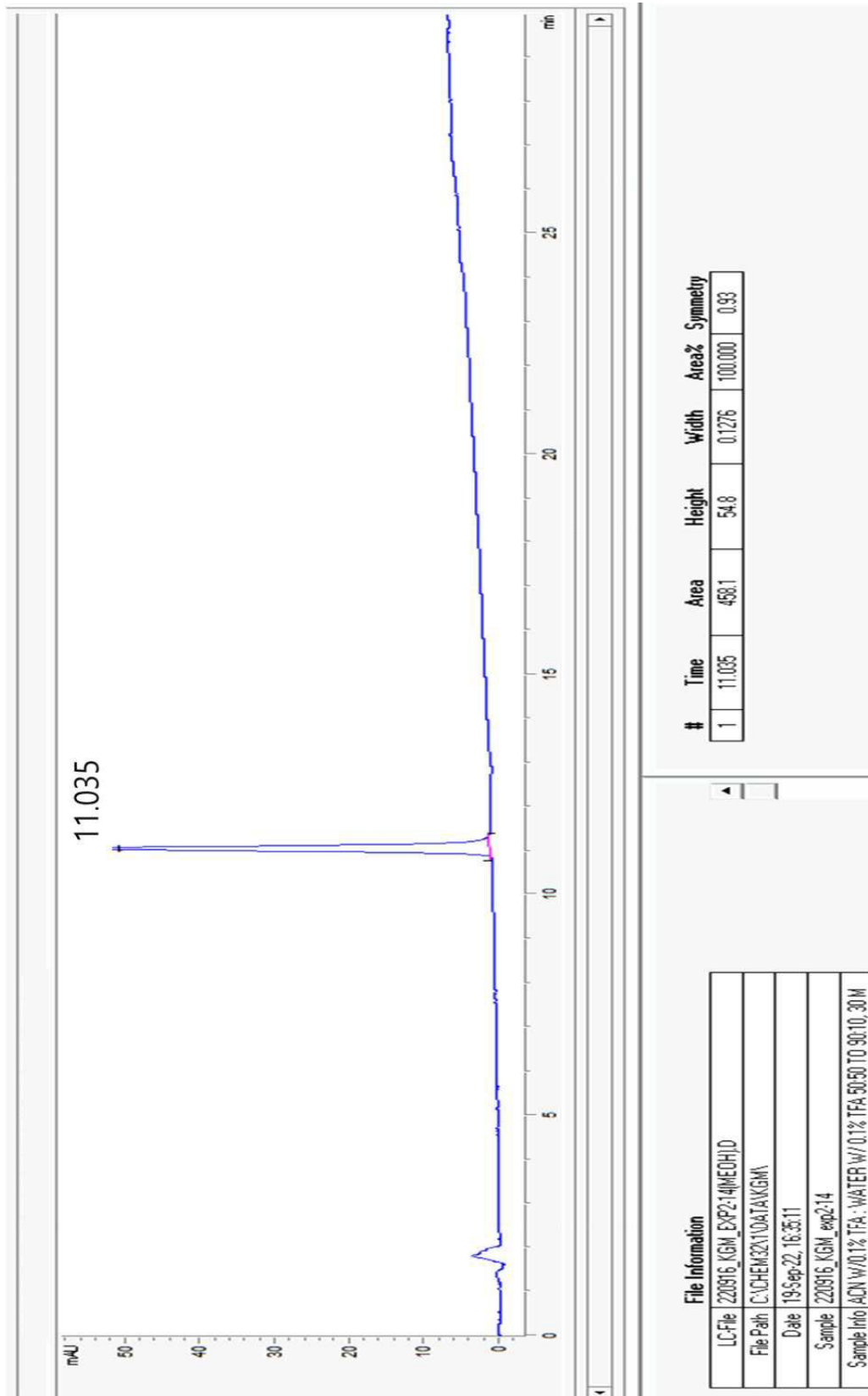
도면9



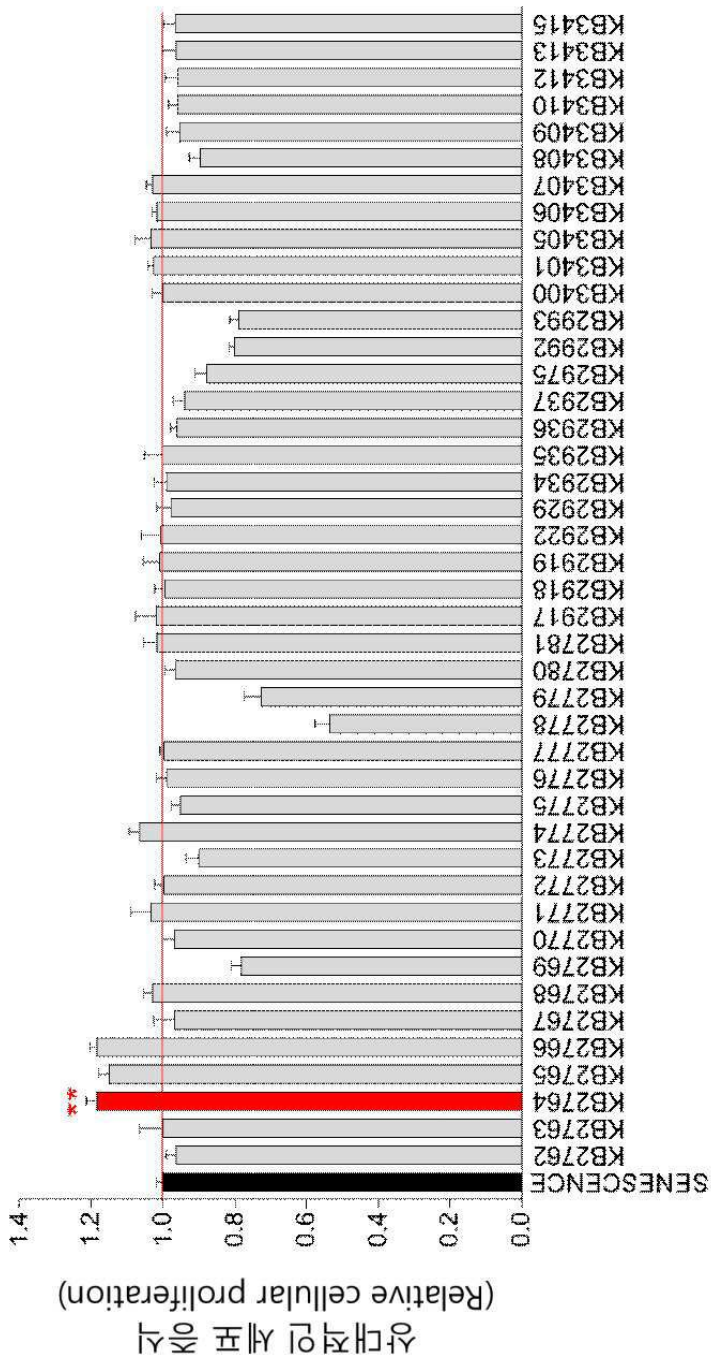
도면10



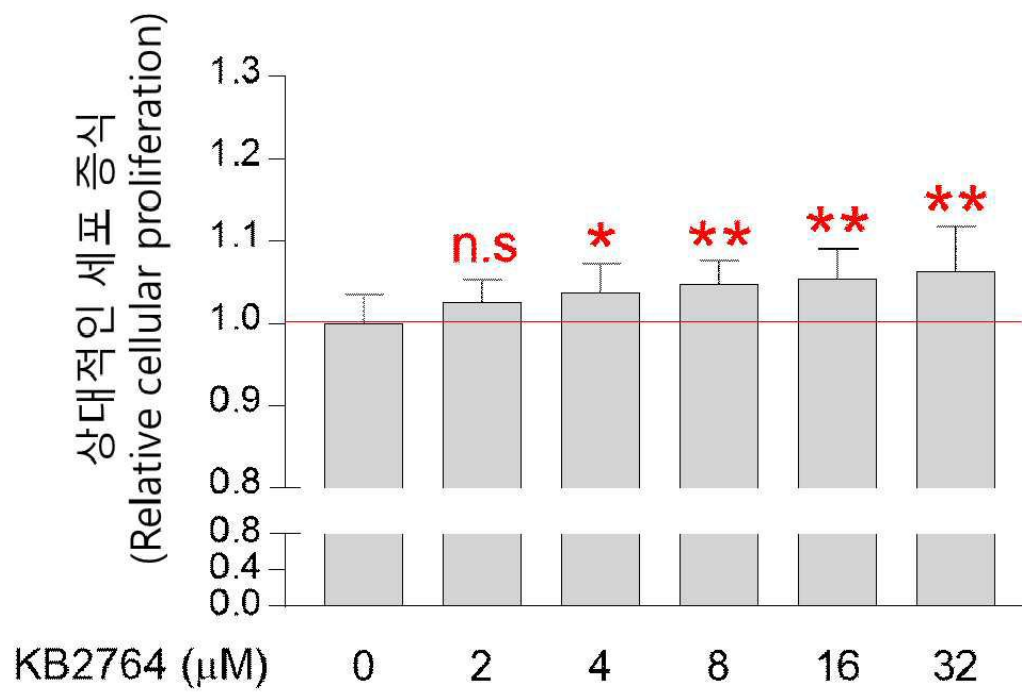
도면11



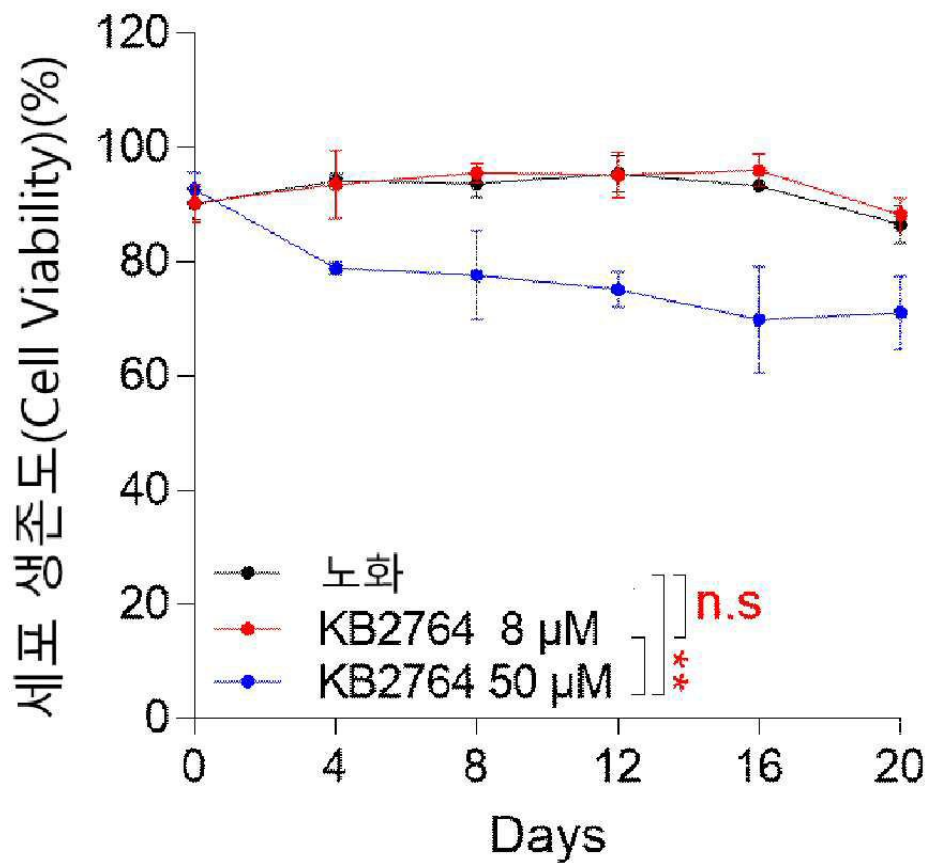
도면12



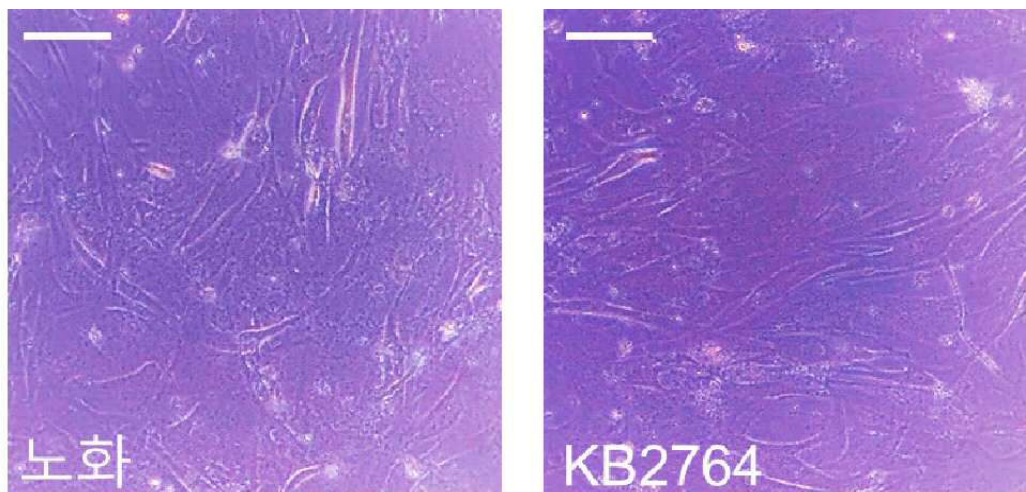
도면13



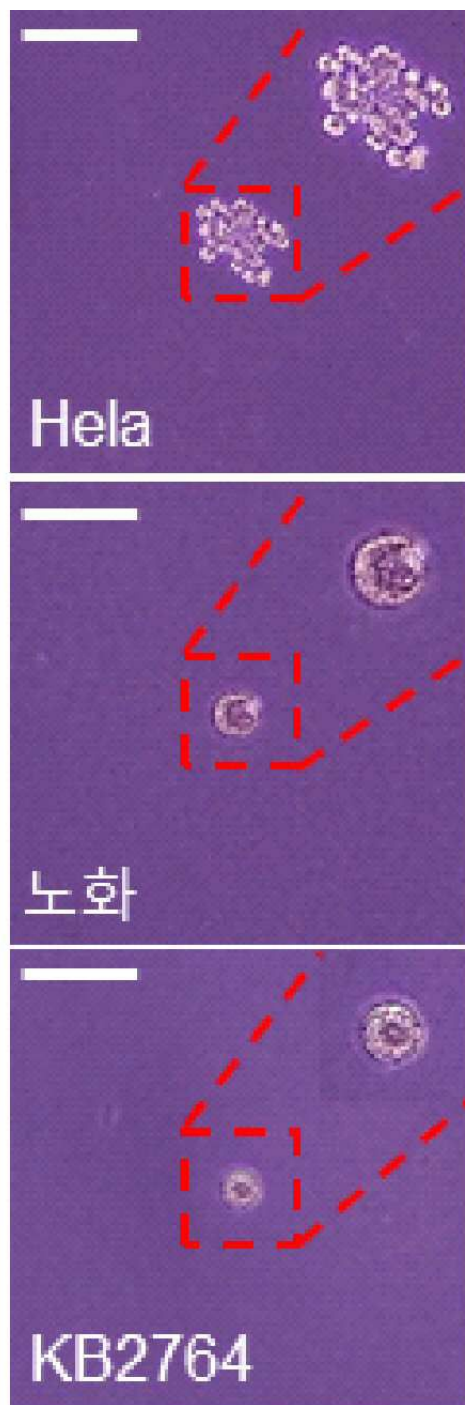
도면14



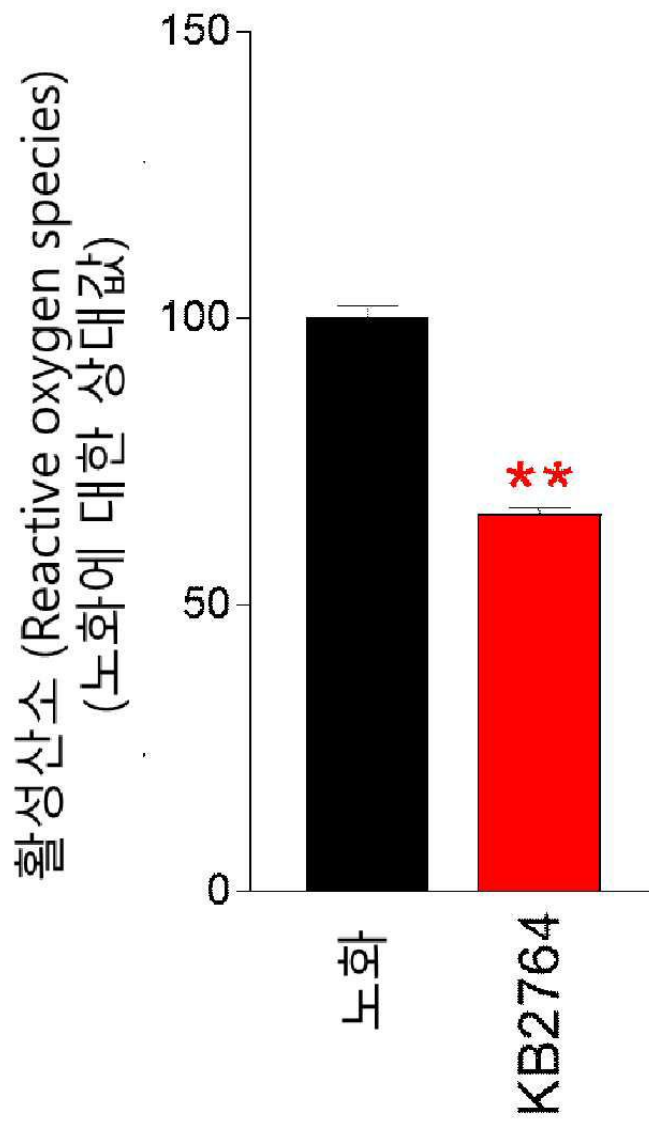
도면15



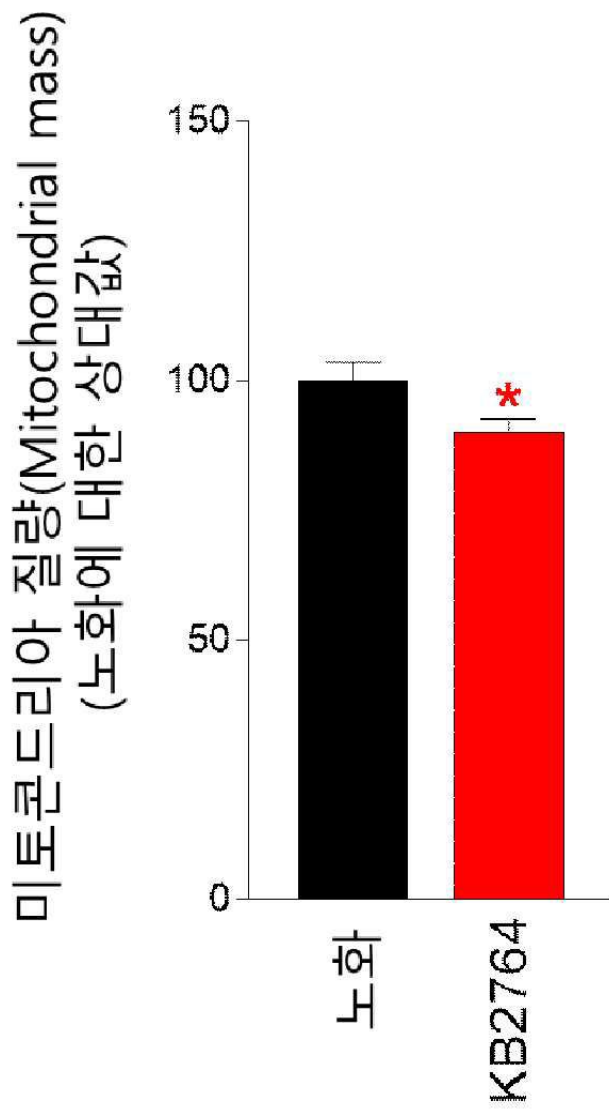
도면16



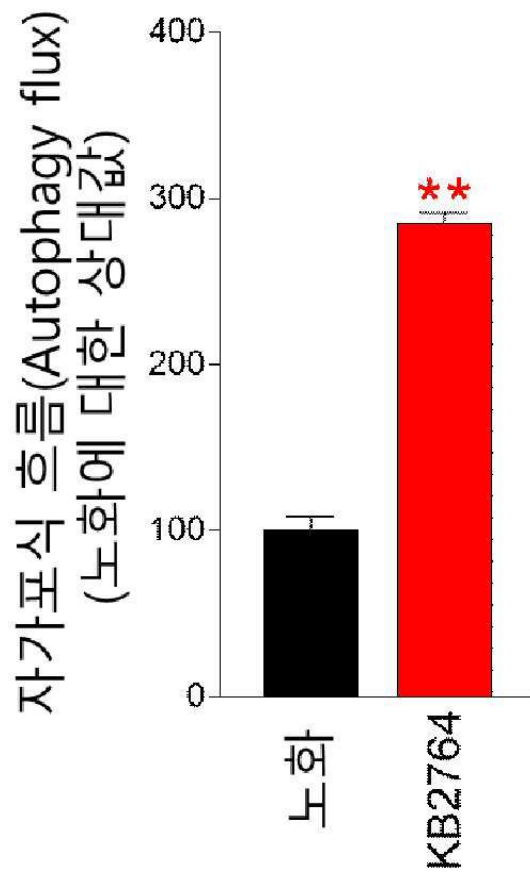
도면17



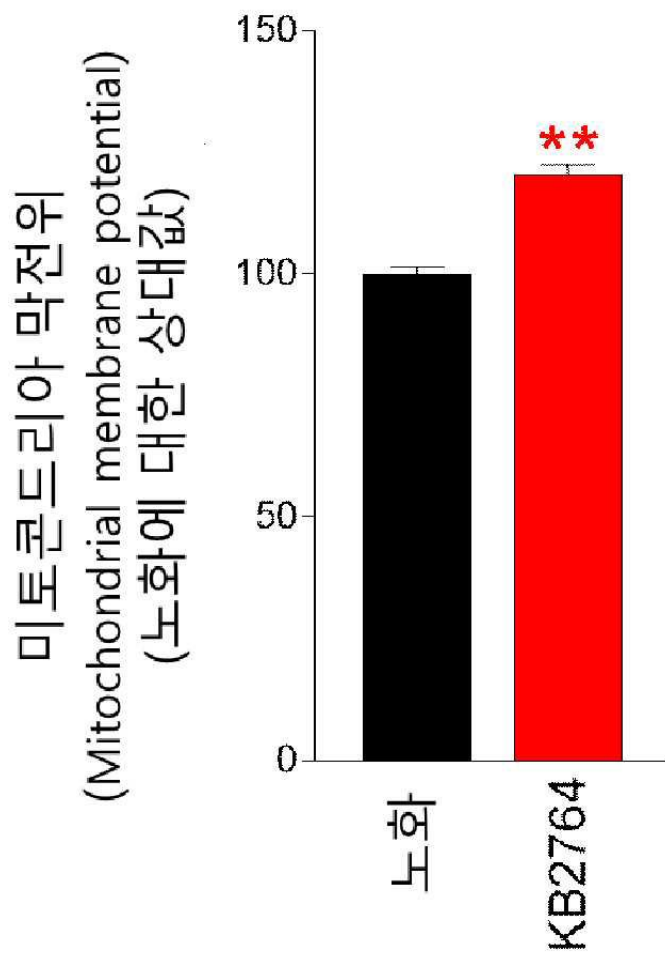
도면18



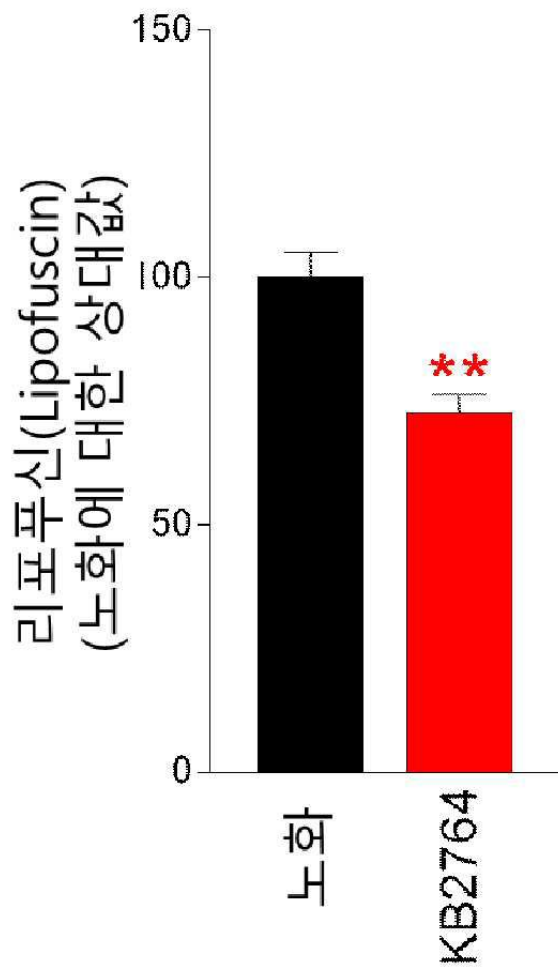
도면19



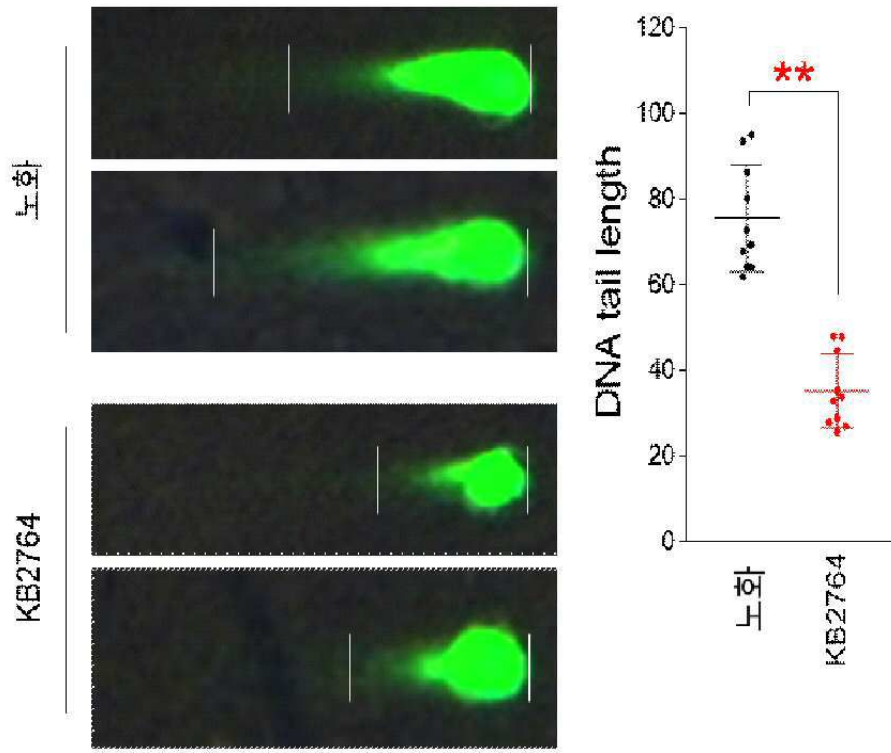
도면20



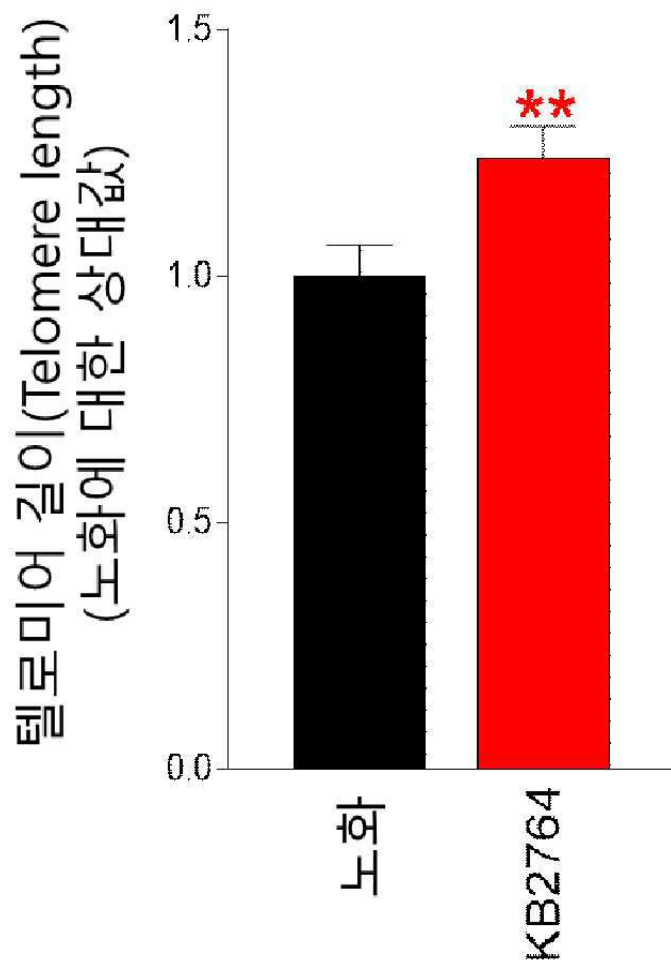
도면21



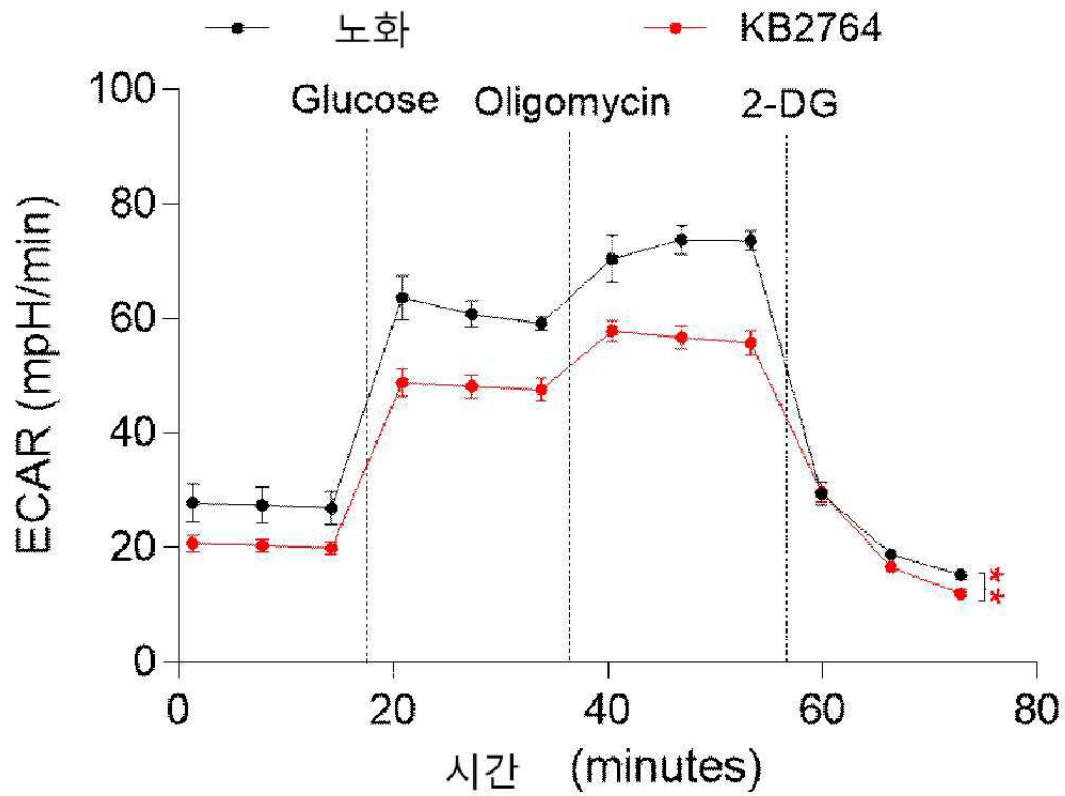
도면22



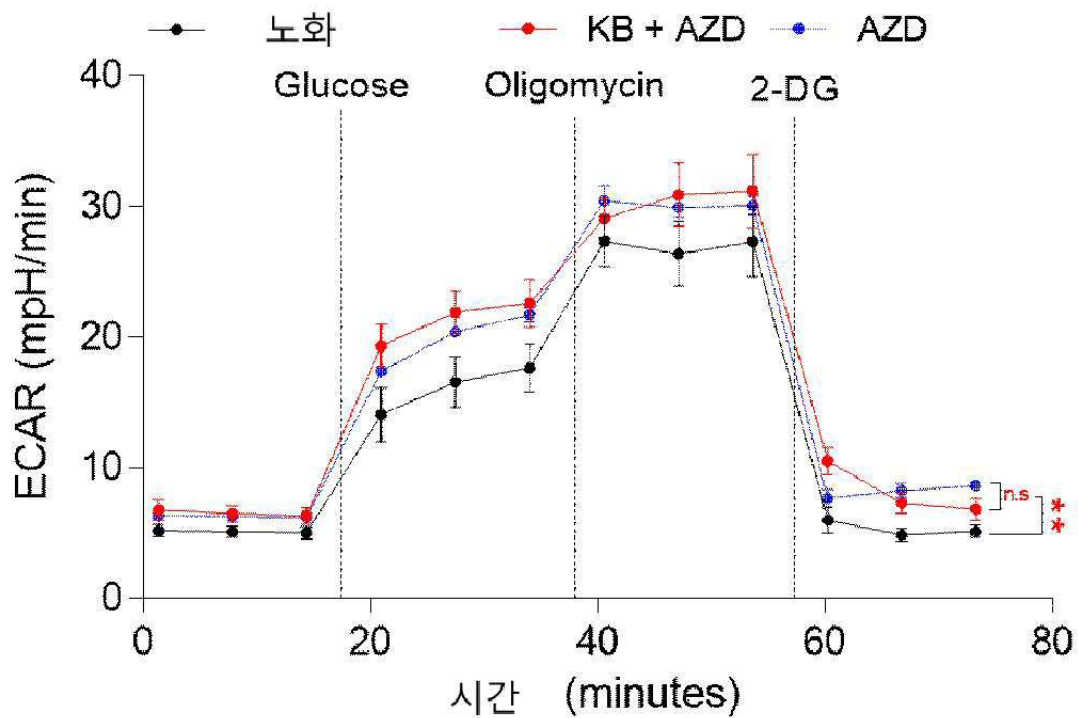
도면23



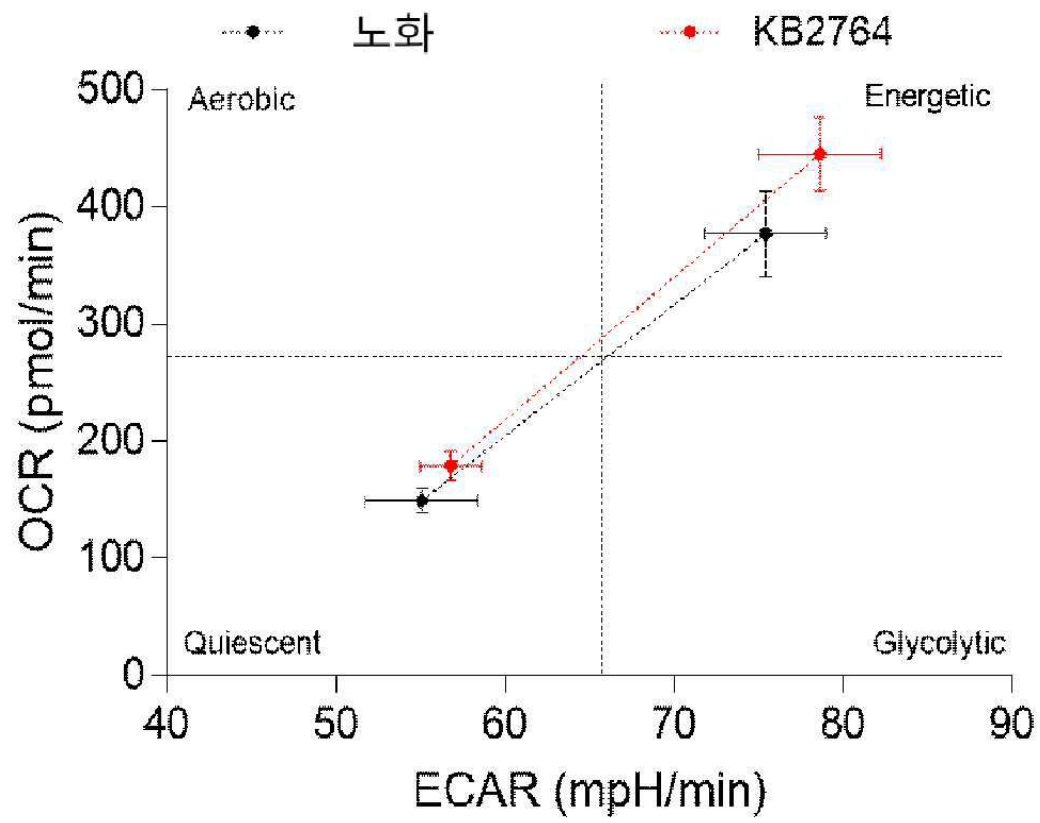
도면24



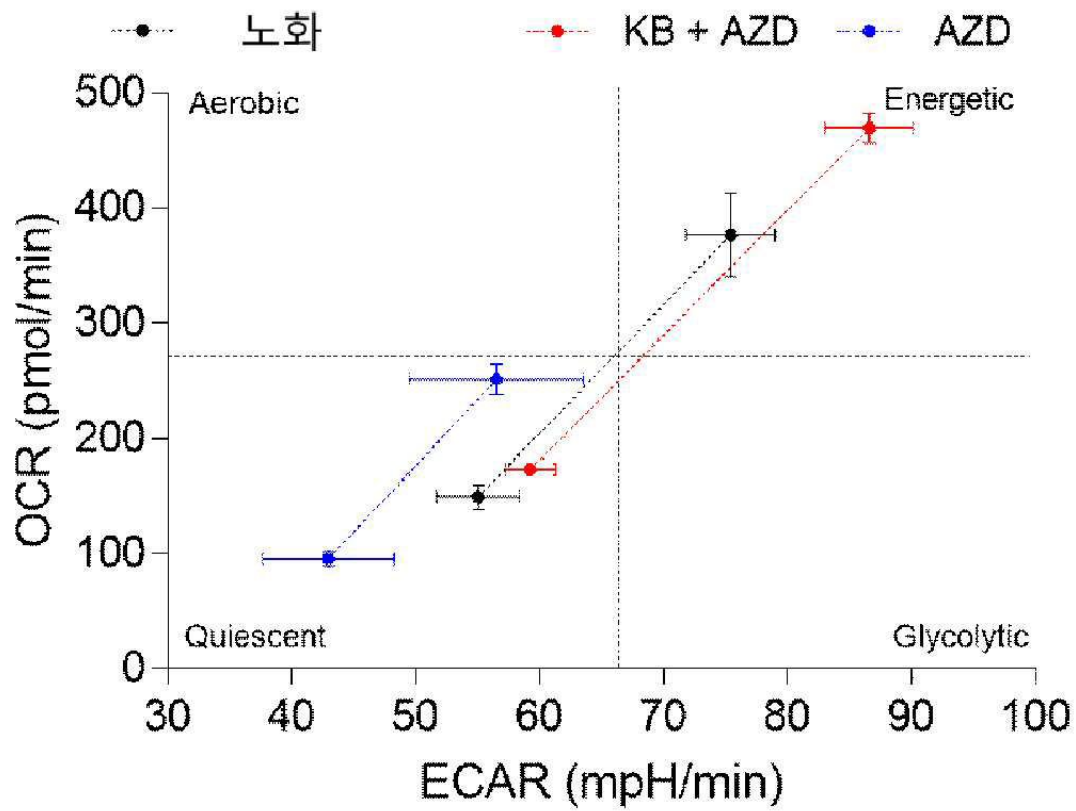
도면25



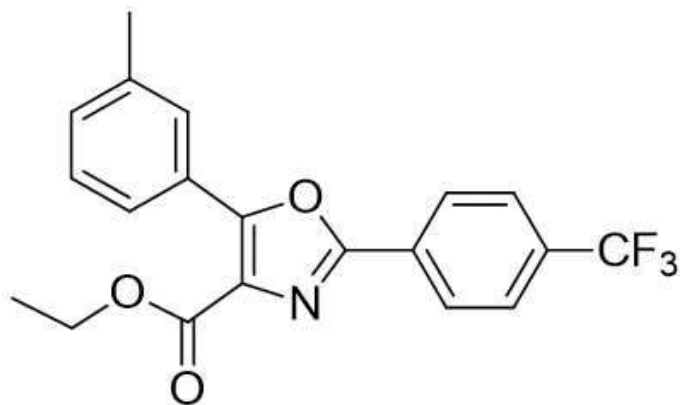
도면26



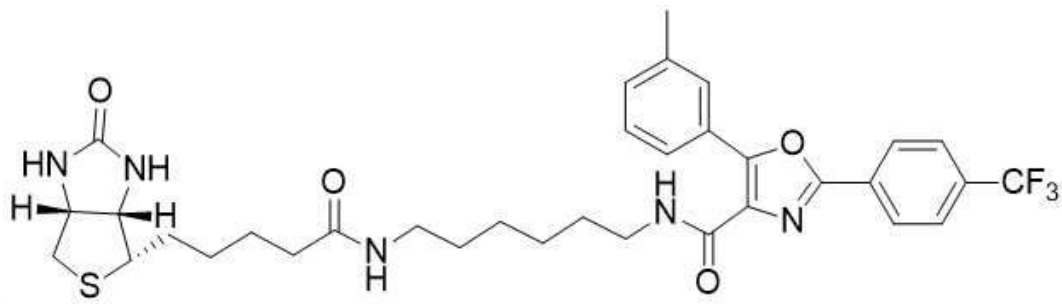
도면27



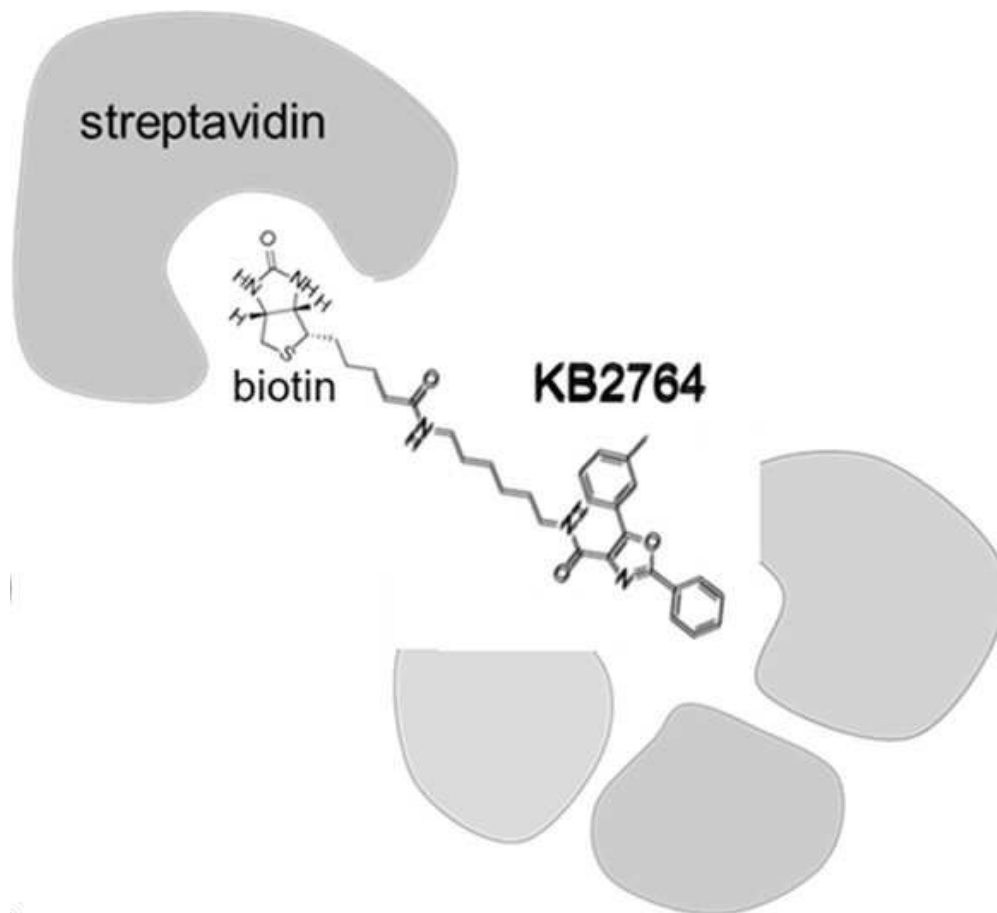
도면28



도면29



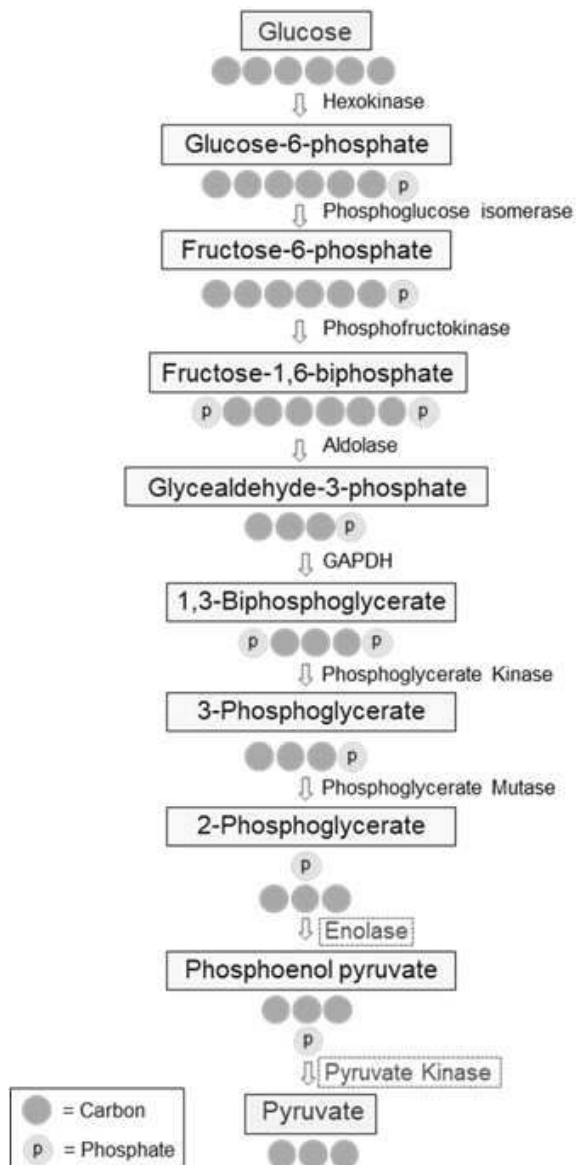
도면30



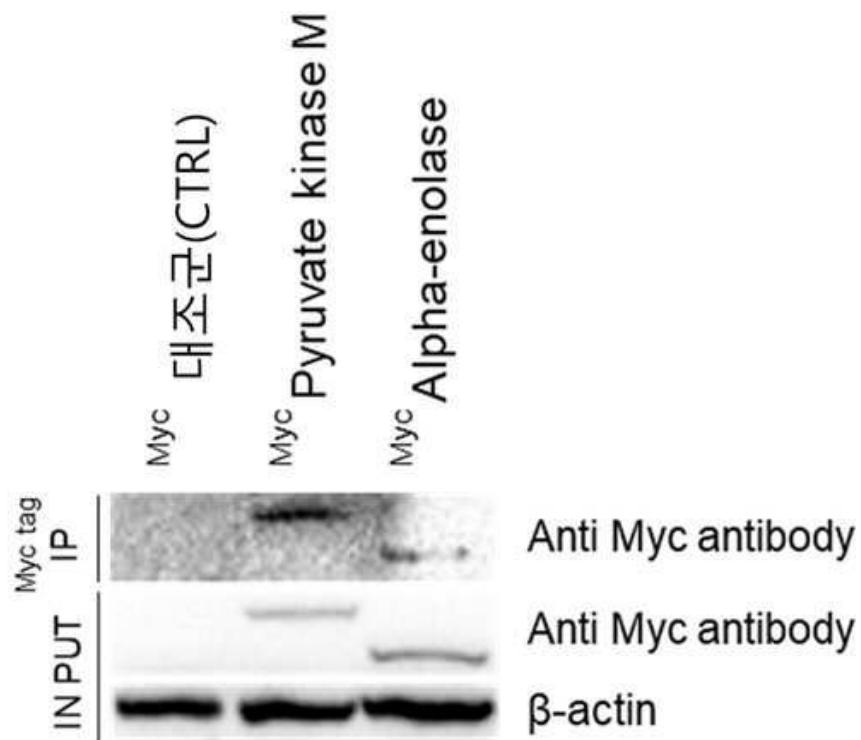
도면31

유전자 이름 (Gene name)	-10logP	Avg. Mass (kDa)
Pyruvate kinase PKM	130.78	57.937
Alpha-enolase	44.72	47.169

도면32



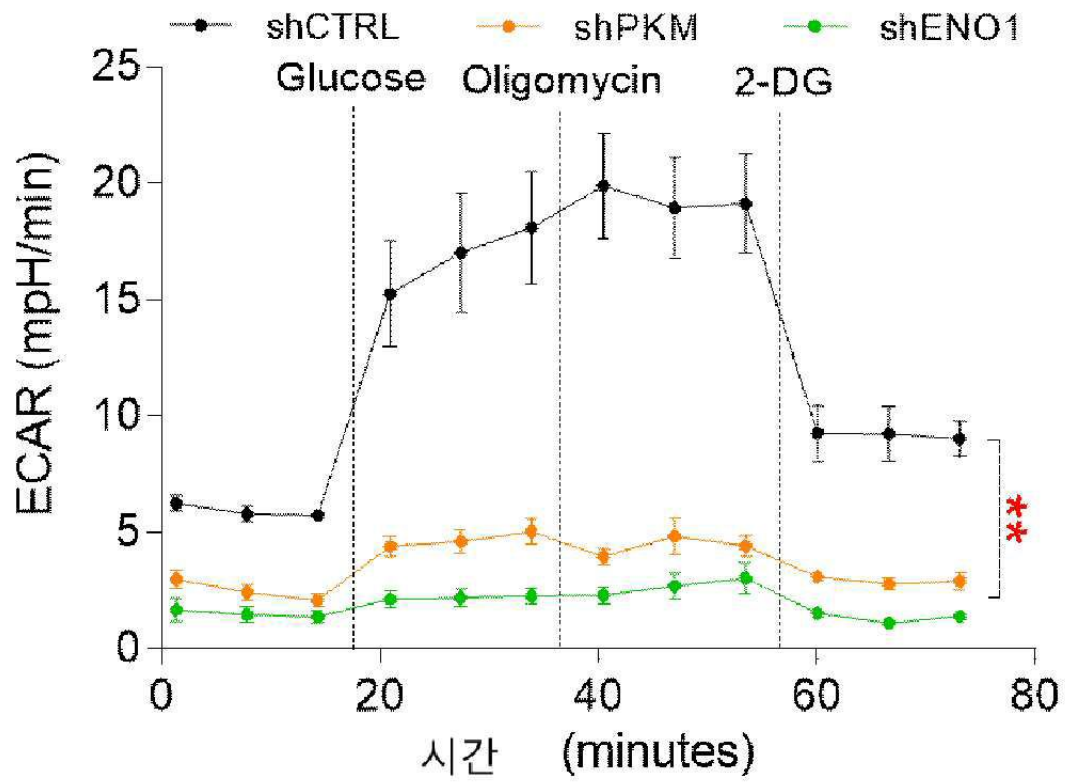
도면33



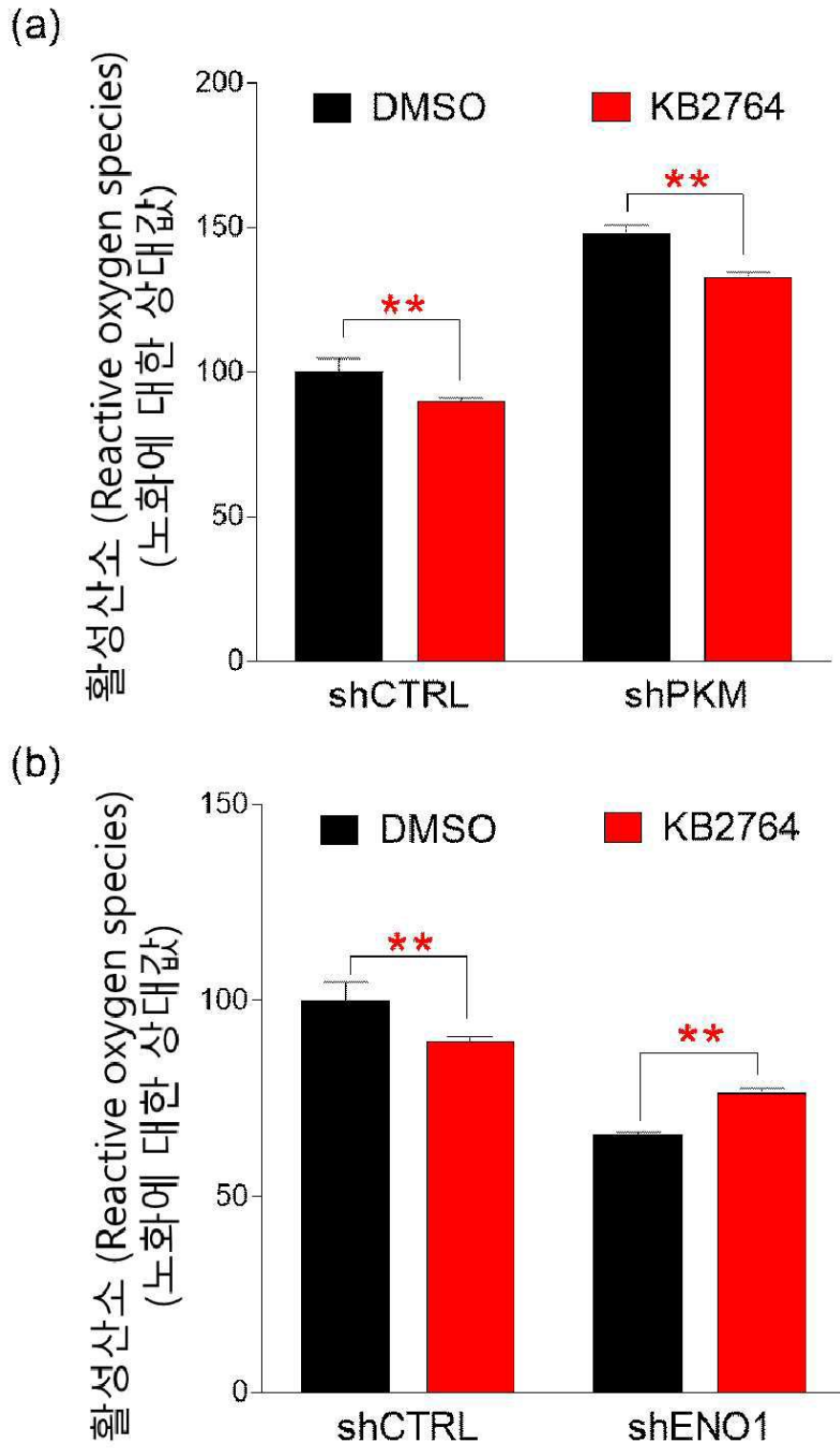
도면34



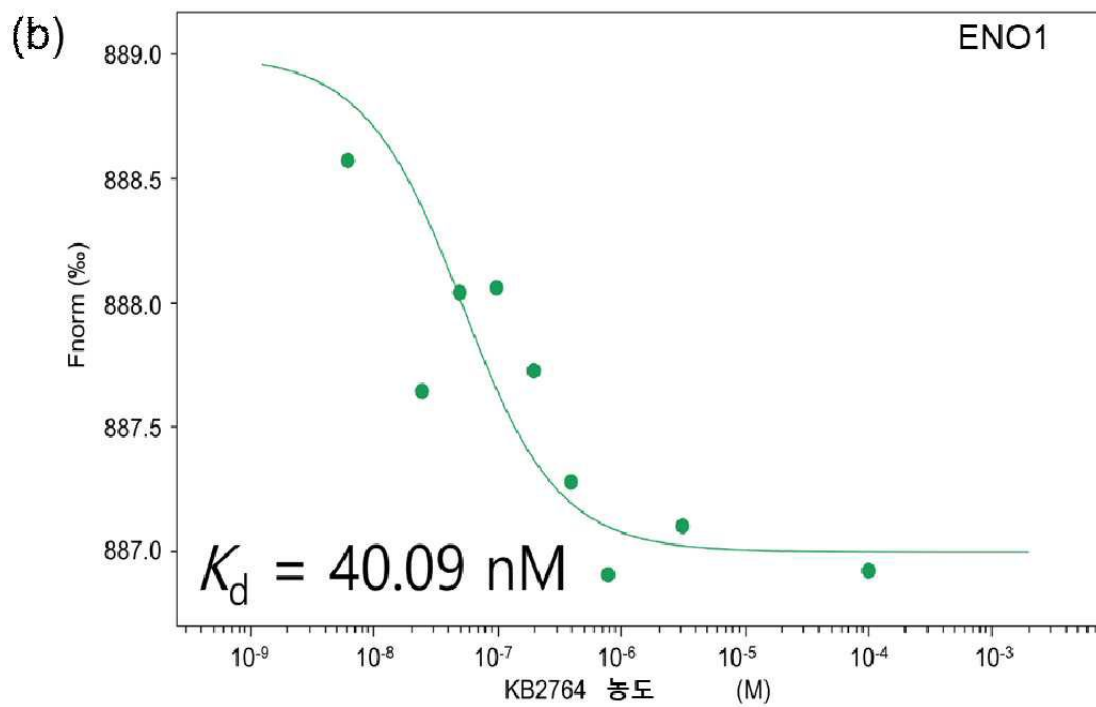
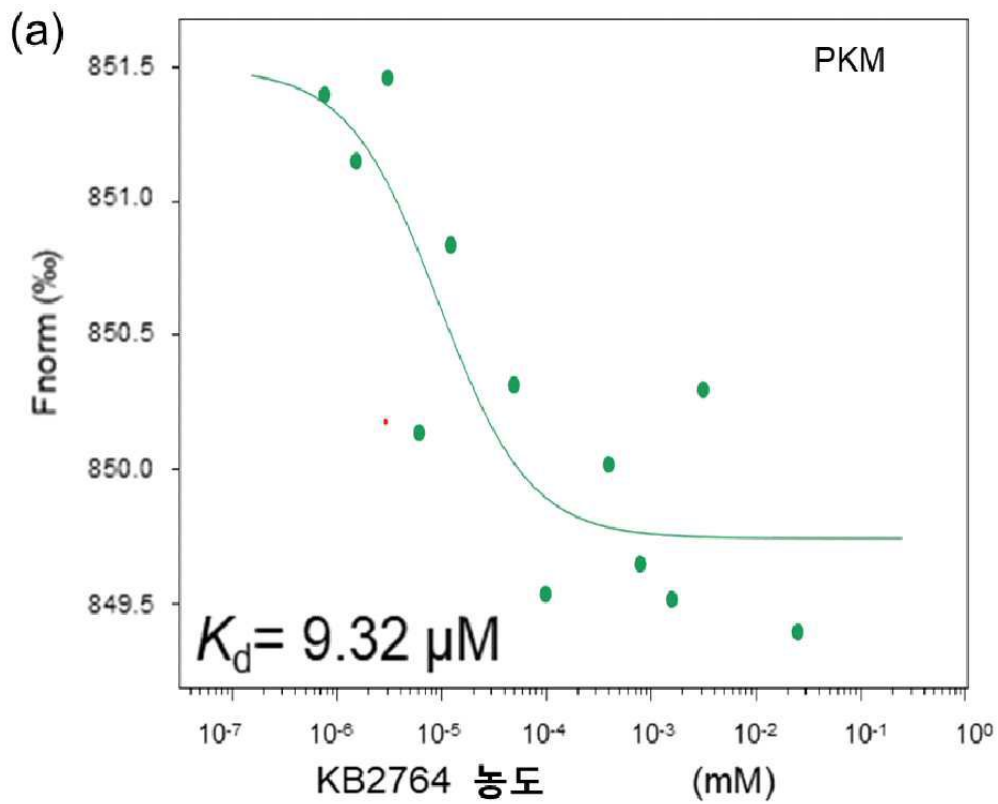
도면35



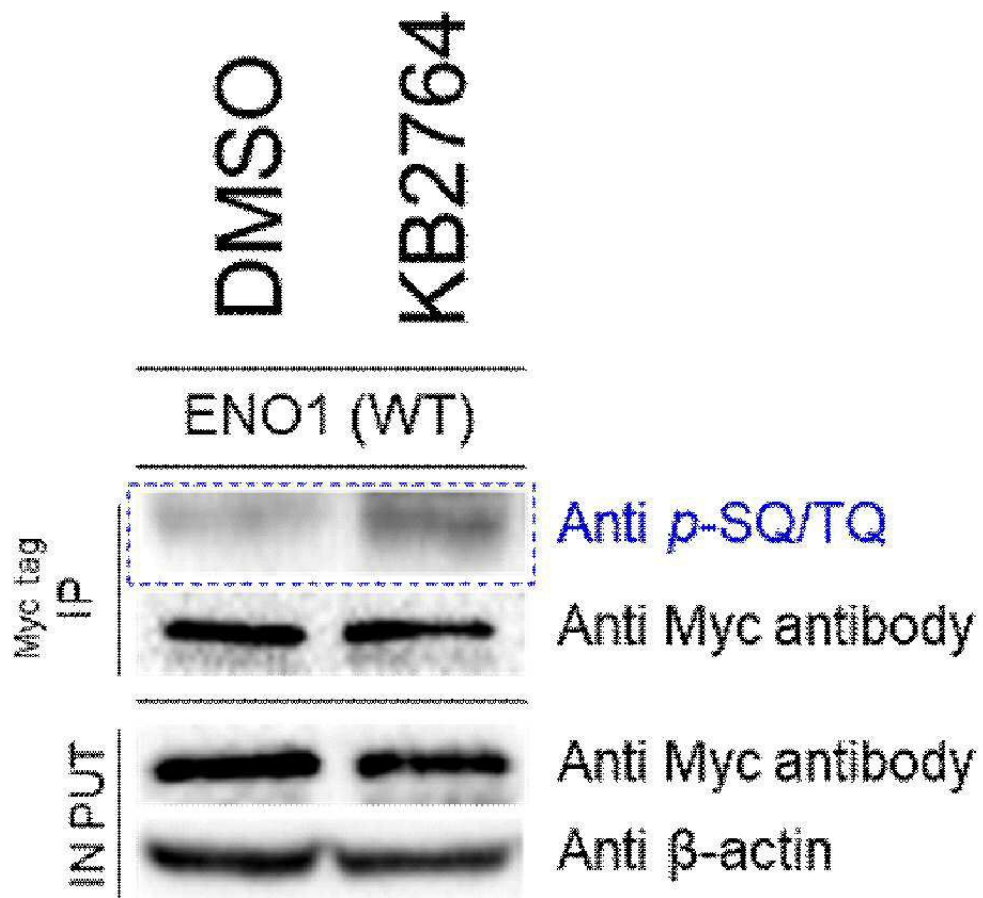
도면36



도면37



도면38



도면39

Alpha-enolase (ENO1)

HUMAN: FFR**S**GKYDLD(251-260)

PONAB: FFR**S**GKYDLD(251-260)

MOUSE: FYR**S**GKYDLD(251-260)

BOVIN: FYR**S**GKYDLD(251-260)

HUMAN: I**S**PDQLADLY(271-280)

PONAB: I**S**PDQLADLY(271-280)

MOUSE: I**T**PDQLADLY(271-280)

BOVIN: I**T**PDELANLY(271-280)

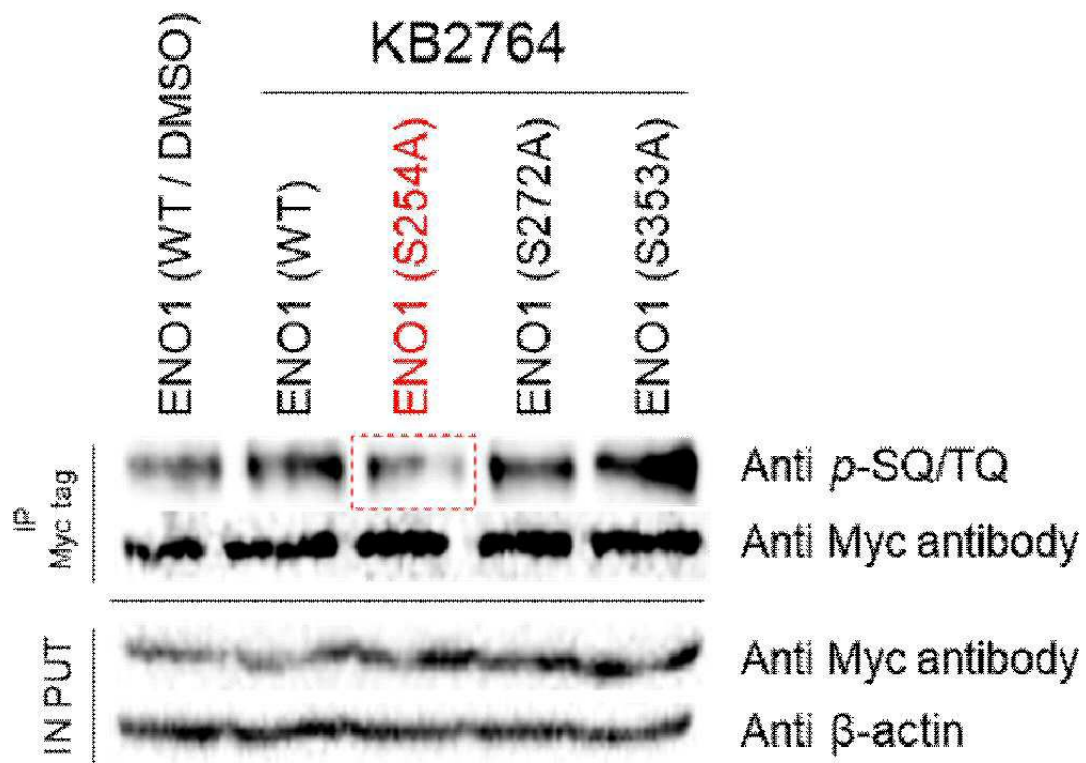
HUMAN: TE**S**LQACKLA(351-360)

PONAB: TE**S**LQACKLA(351-360)

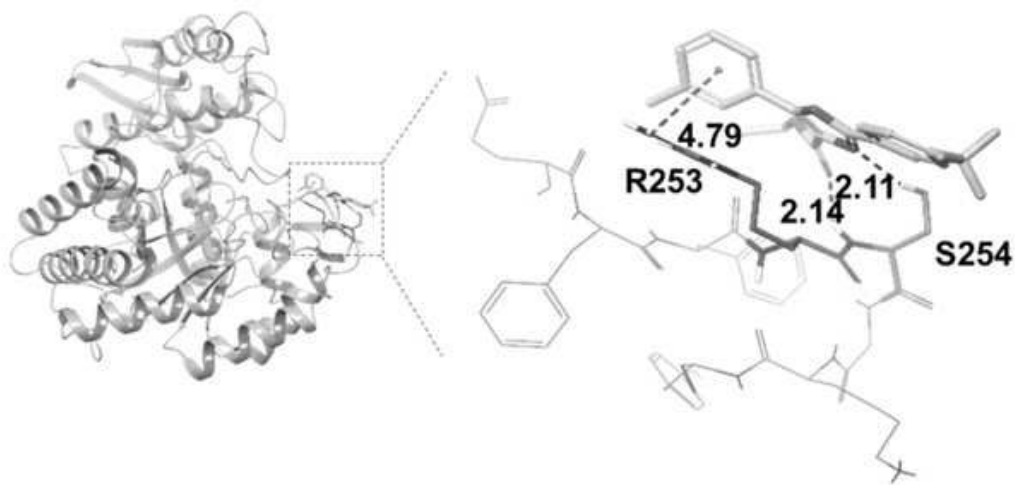
MOUSE: TE**S**LQACKLA(351-360)

BOVIN: TE**S**LQACKLA(351-360)

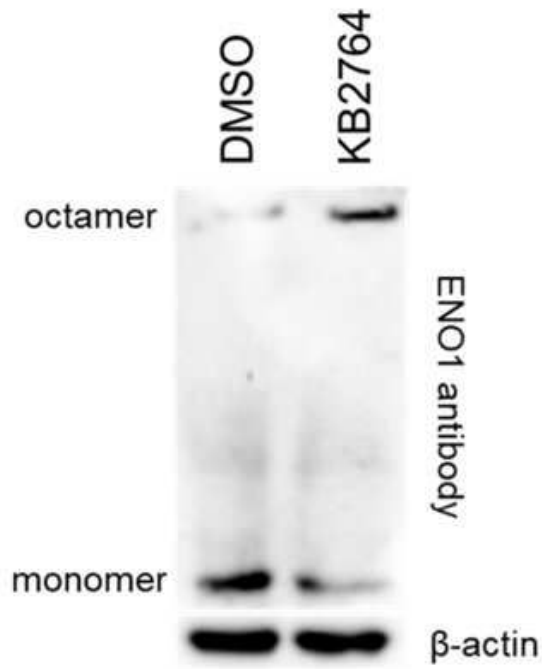
도면40



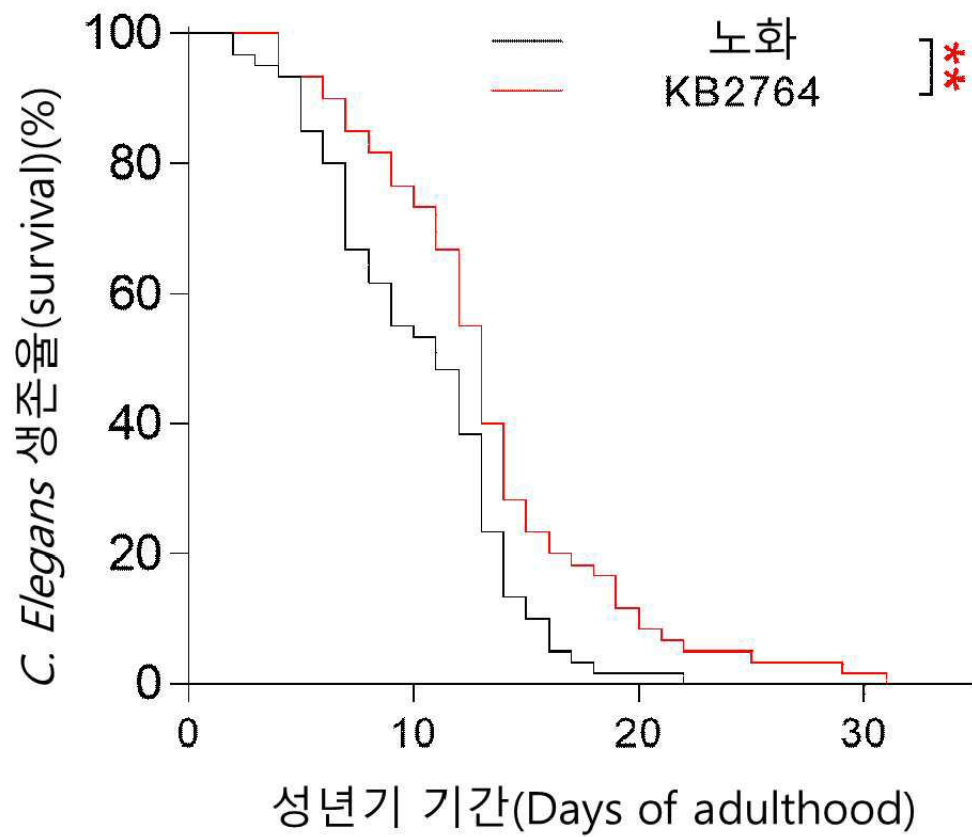
도면41



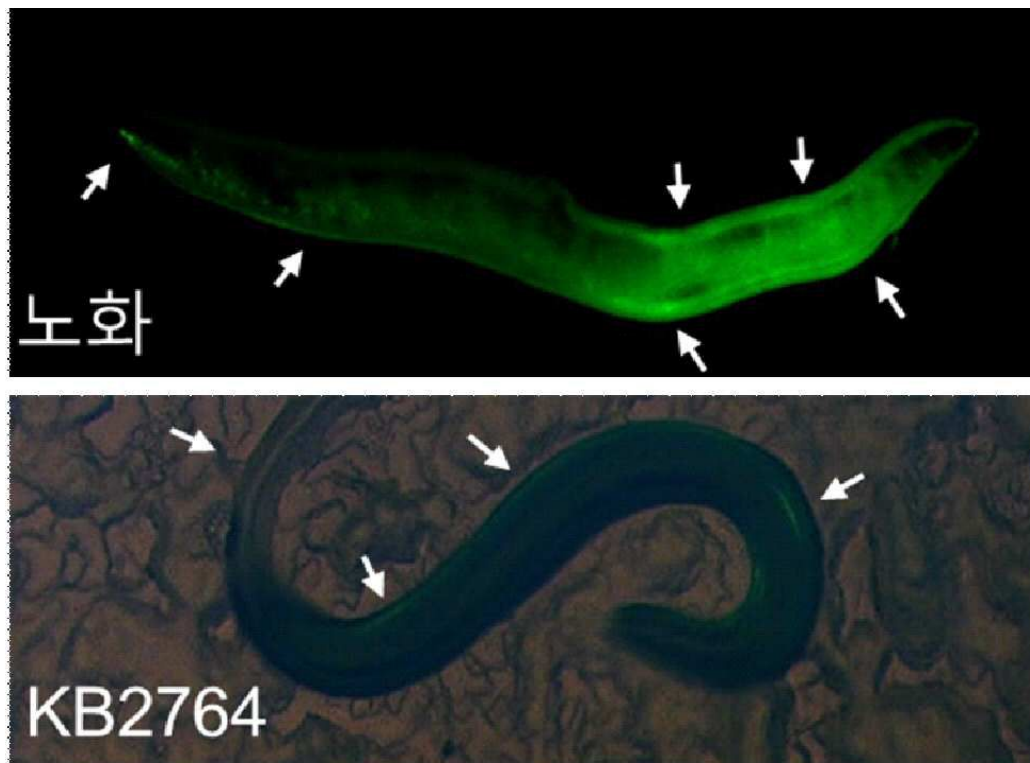
도면42



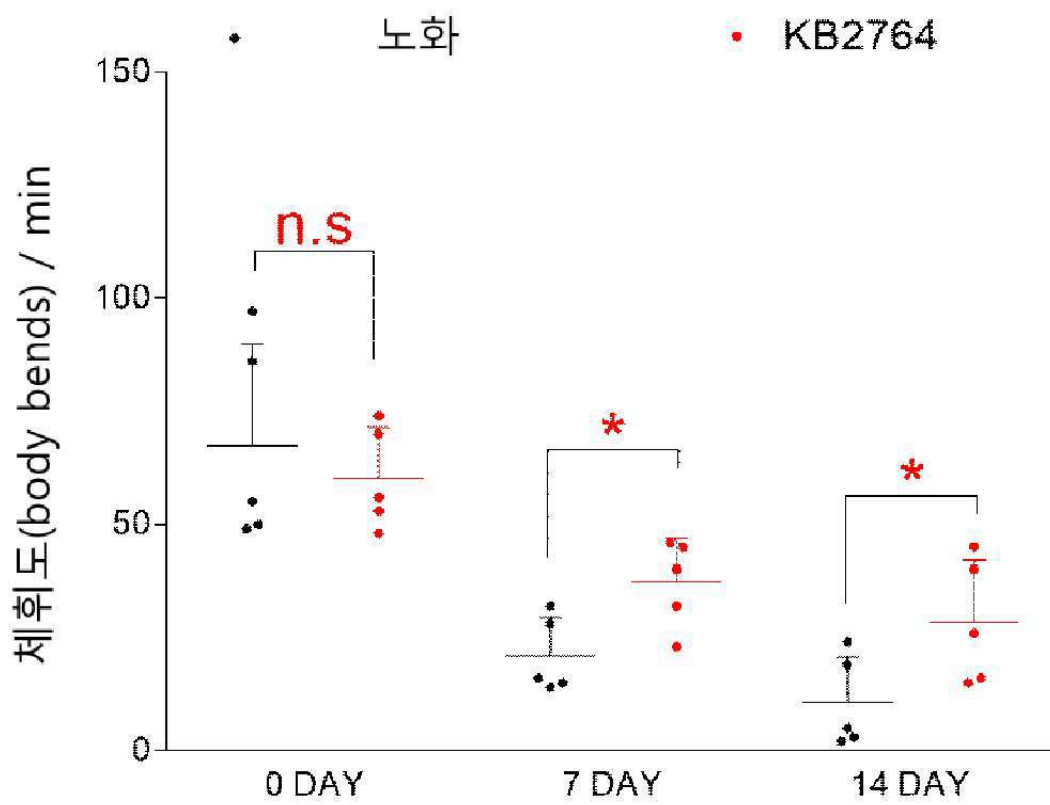
도면43



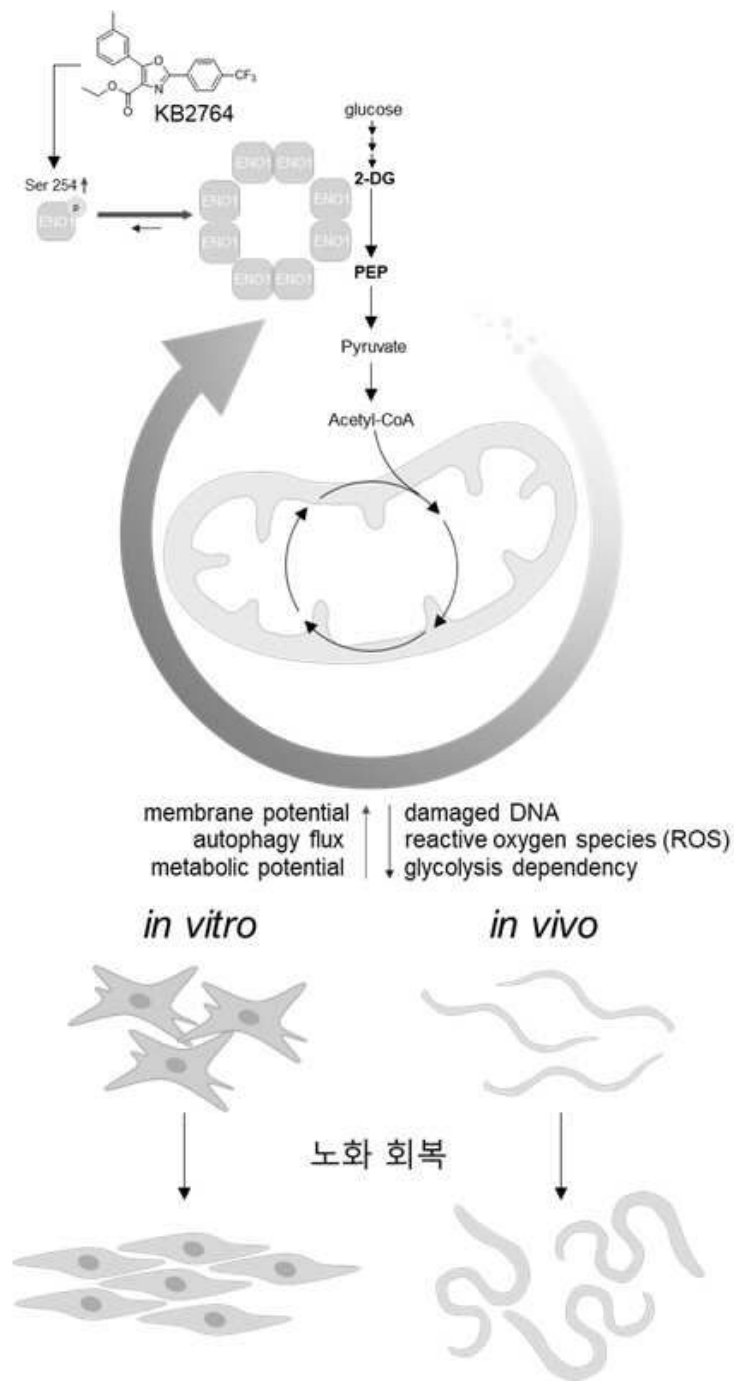
도면44



도면45



도면46



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.