

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2024년 10월 31일 (31.10.2024)



WIPO | PCT



(10) 국제공개번호

WO 2024/225727 A1

(51) 국제특허분류:

A61K 38/44 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

A23L 33/18 (2016.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2024/005477

(22) 국제출원일:

2024년 4월 23일 (23.04.2024)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2023-0055161 2023년 4월 27일 (27.04.2023) KR

(71) 출원인: 이화여자대학교 산학협력단 (EWH A
UNIVERSITY-INDUSTRY COLLABORATION
FOUNDATION) [KR/KR]; 03760 서울특별시 서대문구
이화여대길 52, Seoul (KR).

(72) 발명자: 오구택 (OH, Goo Taeg); 06520 서울특별시
서초구 잠원로 88, 302동 903호, Seoul (KR). 손성근
(SONN, Seong Keun); 01742 서울특별시 노원구 중계로
233, 101동 506호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 특허법인(유한)아이시스 (ISIS IP LAW LLC);
06162 서울특별시 강남구 선릉로 94길 14, 12층, Seoul
(KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의
국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ,
EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR,

HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH,
KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD,
MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO,
NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW,
SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의
역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM,
KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,
TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,
ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM,
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

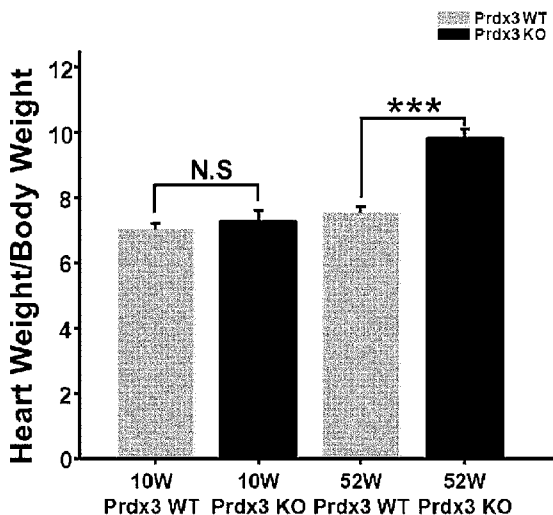
공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: COMPOSITION COMPRISING PRDX3 AS ACTIVE INGREDIENT FOR PREVENTION OR TREATMENT OF MI-
TOCHONDRIA-RELATED DISEASES AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: Prdx3를 유효성분으로 포함하는 미토콘드리아 관련 질환 예방 또는 치료용 조성물 및 이의 용도



(57) Abstract: The present invention relates to a pharmaceutical compo-
sition comprising Prdx3 peptide or an analog thereof as an active ingredi-
ent for the prevention or treatment of mitochondria-related diseases, and
a use thereof. The pharmaceutical composition comprising Prdx3 peptide
or an analog thereof as an active ingredient can be used for the prevention
and treatment of mitochondria-related diseases through the removal of mi-
tophagy and the elimination of alpha-synuclein aggregates.

(57) 요약서: 본 발명은 Prdx3 펩타이드 또는 이의 유사체를
유효성분으로 포함하는, 미토콘드리아 관련 질환의 예방 또는 치료용
약학적 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다. 상기 Prdx3 펩타이드 또는
이의 유사체를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물은 마이토파지
(Mitophagy)의 제거, 알파-시뉴클레인 응집체 제거 등을 통해
미토콘드리아 관련 질환의 예방 및 치료에 이용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: Prdx3를 유효성분으로 포함하는 미토콘드리아 관련 질환 예방 또는 치료용 조성물 및 이의 용도 기술분야

- [1] 본 발명은 Prdx3를 유효성분으로 포함하는 미토콘드리아 관련 질환 예방 또는 치료용 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 심장은 미토콘드리아의 수 및 밀도가 높은 조직이며, 성인 심장 미토콘드리아는 총 심근세포 부피의 대략 30%를 차지하고, 주로 박동 심장의 높은 아데노신 트리포스페이트(ATP) 소비를 보상하기 위해 에너지를 공급한다.
- [3] 심장 미토콘드리아는 반응성 산소종 (ROS)-유도 미토콘드리아 손상에도 불구하고 미토콘드리아 품질 제어 (Mitochondrial quality control, MQC)를 유지하기 위해 미토파지를 연속적으로 겪는다. 따라서, 미토콘드리아는 심장에서 에너지 및 ROS 생성의 주요 부위이고, MQC 기능장애는 확장기 기능장애를 야기할 수 있으며, 심부전과 연관된다.
- [4] MQC는 세포 생리학 및 항상성에 필수적인 과정이며, 미토콘드리아 손상의 예방 및 손상된 미토콘드리아의 제거를 통해 건강한 미토콘드리아 네트워크를 유지하도록 엄격하게 제어된다.
- [5] 미토콘드리아-특이적 퍼옥시다제 퍼옥시레독신 3 (Prdx3)은 미토콘드리아 반응성 산소 종을 제거함으로써 미토콘드리아 기능 장애의 보호 등으로 미토콘드리아 손상 예방에 관여한다. 다만, Prdx3가 미토파지 제거 등으로 손상된 미토콘드리아의 제거에 영향을 미치는지에 대해서는 연구가 필요한 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 일 양상은 Prdx3 펩타이드 또는 이의 유사체를 유효성분으로 포함하는, 미토콘드리아 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [7] 다른 양상은 Prdx3 펩타이드 또는 이의 유사체를 유효성분으로 포함하는, 미토콘드리아 관련 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [8] 또 다른 양상은 Prdx3 펩타이드 또는 이의 유사체를 유효성분으로 포함하는, 미토콘드리아 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학 제제를 제공하는 것이다.
- [9] 또 다른 양상은 Prdx3 펩타이드 또는 이의 유사체를 포함하는 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 미토콘드리아 관련 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [10] 본 발명자들은 Prdx3 펩타이드 또는 이의 유사체를 유효성분으로 이용하여 미토콘드리아 관련 질환의 예방 또는 치료에 이용할 수 있음을 확인하였는바, 이로써 본 발명을 완성하게 되었다.
- [11] 본 발명은 Prdx3 펩타이드 또는 이의 유사체를 유효성분으로 포함하는, 미토콘드리아 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [12] 본 명세서에서 용어 "Prdx3 (Peroxioredoxin 3)"는 과산화물을 해독함으로써 산화 스트레스에 대해 세포를 보호하는데 중요한 역할을 하는 페록시레독신 계열 구성원을 의미한다. 상기 Prdx3는 산화 효소로서 미토콘드리아에 존재할 수 있으며, 구체적으로 심장, 부신, 간 및 뇌 등의 조직에 주로 존재할 수 있다.
- [13] 본 발명에서는 상기 Prdx3가 과산화물 해독 효과에 의하지 않더라도, 미토콘드리아의 활성을 유지하거나 손상을 제거할 수 있음을 확인하였다. 일 구체예에서, 상기 Prdx3는 마이토파지의 제거에 작용할 수 있으며, 이에 따라 미토콘드리아 관련 질환의 예방 또는 치료 효과를 나타낼 수 있다.
- [14] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 Prdx3은 이중 항산화 및 샤페론 기능을 통해 미토콘드리아 품질을 조절할 수 있다.
- [15] 본 명세서에서 "미토콘드리아 품질 관리"는 미토콘드리아를 활성산소로부터 보호하는 작용과 손상된 미토콘드리아를 제거하는 미토파지 작용을 포함할 수 있다.
- [16] 본 명세서에서 용어 "펩타이드"는 아미노산 중합체로서, 천연 아미노산뿐 아니라, 비단백질성 아미노산도 구성요소로 포함할 수 있다.
- [17] 본 명세서에서 용어 "펩타이드 유사체"는 아미노산의 측쇄 또는 알파-아미노산 백본에 대하여 하나 이상의 다른 기능기로 치환된 유사체를 포함할 수 있다. 측쇄 또는 백본 개질화 펩타이드 유사체의 예로는 피롤리딘 고리가 하이드록시기로 치환된 하이드록시프롤린이나, N-메틸 글리신 "베프타이드"를 들 수 있으나, 이로 제한되지 않는다. 펩타이드 유사체의 종류에 대해서는 당업계에 공지되어 있다.
- [18] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 Prdx3 유사체는 Prdx3 우성-열성(dominant-negative, DN) 돌연변이인 것을 특징으로 한다. 상기 Prdx3 우성-열성 돌연변이는 Prdx3의 108번과 229번 cysteine이 serine으로 치환된 형태일 수 있으며, 이러한 돌연변이로 인해 Prdx3의 ROS 제거 기능을 없이도 마이토파지 (mitophagy) 조절이 가능한 특징을 보인다.
- [19] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 Prdx3 펩타이드는 Prdx3 유전자 64 내지 257 위치의 194개의 아미노산으로 이루어진 사슬과, Prdx3 유전자 1 내지 63 위치의 194개의 아미노산으로 이루어진 Transit peptide으로 구성될 수 있다.
- [20] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 Prdx3 펩타이드는 마이토파지(Mitophagy)를 제거하는 것일 수 있다. 일 구체예에서, 상기 Prdx3 펩타이드는 PINK1의 서브미토콘드리아 국소화를 조절할 수 있으며, 미토콘드리아의 손상을 방지할 수 있다.

- [21] 본 명세서에서 용어 "자가포식(autophagy)"은 세포가 영양소 결핍 상황이 되었을 때 자신의 단백질을 분해하거나 불필요한 세포 성분을 스스로 제거해 에너지를 얻는 활동을 지칭하는 것을 의미한다. 예를 들어, 마이토파지(mitophagy)일 수 있다.
- [22] 본 명세서에서 용어 "마이토파지 (Mitophagy)"는 자가포식에 의한 미토콘드리아의 선택적인 분해를 지칭하는 것으로, 임의의 손상이나 스트레스에 의하여 발생하는 미토콘드리아 특이적 반응이다. 이는 미토콘드리아의 전환(turnover)을 촉진하여 세포 분해를 야기하는 역기능 미토콘드리아의 축적을 방지하여 미토콘드리아가 건강한 상태로 유지될 수 있도록 하는 것이 특징이다.
- [23] 즉, 마이토파지가 원활하게 이루어지지 않는 경우 세포 내의 이상 발생으로 미토콘드리아 관련 질환이 발생할 수 있다. 따라서 상기 마이토파지를 조절하는 것은 상기 질환의 예방 또는 치료에 유용하다.
- [24] 본 발명의 조성물은 Prdx3 펩타이드 또는 이의 유사체를 유효성분으로 포함함으로써, 미토콘드리아 내 자가포식 장애로 발생하는 질병의 개선 또는 치료 효과를 가져, 이와 관련된 연구에 기여할 수 있으며, 다양한 약품, 건강기능식품 등으로 활용이 가능하다는 이점이 있다.
- [25] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 Prdx3 펩타이드가 결핍되는 경우 심장 기능 장애를 야기할 수 있으며, 예를 들어, 심근경색(myocardial infarction, MI) 등에 의한 심장 기능 장애를 일으킬 수 있다.
- [26] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 Prdx3 펩타이드는 PINK1 펩타이드와 상호작용할 수 있으며, PINK1 펩타이드의 분해를 통해 마이토파지를 조절할 수 있다.
- [27] 본 명세서에서 용어 "PINK1 (PTEN-induced kinase 1)"은 미토콘드리아 매트릭스에 국재화되고, 이의 N-말단은 순차적인 단백질분해를 통해 PARL 및 MPP에 의해 절단될 수 있다. 미토콘드리아 손상에 반응하여, PINK1은 손상된 미토콘드리아의 OMM 상에 축적되고, 이는 마이토파지(mitophagy)를 매개할 수 있다.
- [28] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 Prdx3 펩타이드가 결핍되는 경우 PINK1의 상향 조절에도 불구하고 감소된 마이토파지(mitophagy)를 초래할 수 있다.
- [29] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 Prdx3는 Oma1의 발현 또는 작용을 억제할 수 있으며, Oma1에 의한 PINK1 분해를 억제하여 안정성을 유지할 수 있다.
- [30] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 Prdx3는 Parkin의 국소화에 영향을 미칠 수 있으며, PINK1-Parkin-매개된 마이토파지를 조절할 수 있다.
- [31] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 Prdx3는 알파-시뉴클레인(alpha-synuclein) 응집체를 제거할 수 있다.
- [32] 본 발명에서 용어 "알파-시뉴클레인(alpha-synuclein)"은 인간의 뇌에서 풍부하게 존재하는 단백질로, 알파-시뉴클레인이 집합되어 불용성 원섬유, 즉 응집체가 형성되면 신경 독소로 작용해 도파민을 감소시켜 파킨슨병을 유발한다.
- [33] 본 발명에서 "미토콘드리아 관련 질환"은 심장질환 (cardiovascular disease), 림프종 (Lymphoma), 사구체신염 (Glomerulonephritis), 골다공증 (Osteoporosis), 운

동신경세포병 (Motor Neuron Disease), 근위축증 (muscular atrophy), 다운 증후군 (Down Syndrome), 암종 (Carcinoma), 피크 병 (Pick Disease), 파킨슨 증후군 (Parkinson Syndrome) 및 알츠하이머 증후군 (Parkinson Syndrome)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있다.

- [34] 본 발명의 일 실시예에서는, Prdx 3는 미토콘드리아를 활성산소로부터 보호하는 작용과 손상된 미토콘드리아를 제거하는 미토파지 작용 모두를 조절하여 미토콘드리아 품질 관리에 작용할 수 있다. 또한, 다른 실시예에서는 Prdx 3가 결핍된 마우스가 생체 대부분 조직에서 손상된 미토콘드리아를 가지고 있음을 확인하여, 생체 내에 미토콘드리아 기능을 연구할 수 있는 중요한 모델 마우스이 될 수 있음을 확인하였다.
- [35] 본 발명에서 사용되는 용어, "예방"이란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 미토콘드리아 관련 질환을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [36] 본 발명에서 사용되는 용어, "치료"란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 미토콘드리아 관련 질환에 대한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [37] 본 발명에 따른 조성물은 미토콘드리아 관련 질환의 예방 또는 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 병용하여 사용할 수 있으며, 바람직하게는 미토콘드리아 관련 질환의 예방 또는 치료를 촉진하는 약물과 병용하여 사용할 수 있다.
- [38] 본 발명에 따른 상기 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 사이클로덱스트린, 텍스트로즈 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 리포솜 등을 포함하지만 이에 한정되지 않으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액 등 다른 통상의 첨가제를 더 포함할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제, 윤활제 등을 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 주입 백과 같은 주입제, 에어로졸 제제와 같은 분무제, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제화에 관해서는 레밍턴의 문헌에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 성분마다 바람직하게 제제화할 수 있다. 본 발명의 약학 제제는 제형에 특별한 제한은 없으나 주사제, 주입제, 분무제형, 액상제형 또는 피부 외용제 등으로 제제화할 수 있다.
- [39] 본 발명의 상기 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여 (예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 안구를 포함한 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.
- [40] 본 발명의 상기 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여할 수 있다. 본 발명에 있어서 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료 또는 진단에 적용 가능한 합리적

인 수혜/위험 비율로 질환을 치료 또는 진단하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 질환 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명에 따른 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

- [41] 구체적으로 본 발명의 조성물의 유효량은 환자의 연령, 성별, 상태, 체중, 체내에 활성 성분의 흡수도, 불활성률 및 배설속도, 질병종류, 병용되는 약물에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 1 kg 당 0.001 내지 150 mg, 바람직하게는 0.01 내지 100 mg을 매일 또는 격일 투여하거나, 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 비만의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [42] 본 명세서에서 상기 병용 투여는 병행 투여와 교차하여 사용할 수 있으며, 병용 투여 형태는 펩타이드 또는 펩타이드 유사체와 기타 화합물을 동시 투여하거나, 또는 별도 투여하는 형태를 모두 포함할 수 있다.
- [43]
- [44] 또한, 본 발명은 Prdx3 펩타이드 또는 이의 유사체를 유효성분으로 포함하는, 미토콘드리아 관련 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [45] 상기 용어 "개선"이란 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들어, 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미할 수 있다. 이 때, 상기 건강기능식품은 뇌혈관 질환의 예방 또는 개선을 위하여 해당 질병의 발병 단계 이전 또는 발병 후, 치료를 위한 약제와 동시에 또는 별개로서 사용될 수 있다.
- [46] 상기 건강기능식품에서, 유효성분은 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방 또는 개선용)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조 시에 상기 건강기능식품은 원료에 대하여 구체적으로 약 15 중량% 이하, 보다 구체적으로 약 10 중량% 이하의 양으로 첨가될 수 있다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있다.
- [47] 상기 건강기능식품은 담체, 희석제, 부형제 및 첨가제 중 하나 이상을 더 포함하여 정제, 환제, 산제, 과립제, 분말제, 캡슐제 및 액제 제형으로 이루어진 군에서 선택된 하나로 제형될 수 있다. 일 양상에 따른 화합물을 첨가할 수 있는 식품

으로는, 각종 식품류, 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽제, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강기능성 식품류 등이 있다.

[48] 상기 담체, 부형제, 희석제 및 첨가제의 구체적인 예로는 락토즈, 텍스트로즈, 슈크로즈, 솔비톨, 만니톨, 에리스리톨, 전분, 아카시아 고무, 인산칼슘, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 미세결정성 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 메틸셀룰로즈, 물, 설탕시럽, 메틸셀룰로즈, 메틸 하이드록시 벤조에이트, 프로필하이드록시 벤조에이트, 활석, 스테아트산 마그네슘 및 미네랄 오일로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다.

[49] 상기 건강기능식품은 상기 유효성분을 함유하는 것 외에 특별한 제한없이 다른 성분들을 필수 성분으로서 함유할 수 있다. 예를 들어, 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당 알코올일 수 있다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제 (타우마틴, 스테비아 추출물 (예를 들어, 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등)) 및 합성 향미제 (사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 당업자의 선택에 의해 적절하게 결정될 수 있다.

[50] 상기 외에도, 일 양상에 따른 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제 (치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있으며, 이러한 첨가제의 비율 또한 당업자에 의해 적절히 선택될 수 있다.

[51] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 Prdx3 펩타이드 또는 이의 유사체는 미토콘드리아에서의 자가포식 (Autophagy), 세포자살 (apoptosis) 등에 작용하여 미토콘드리아 관련 질환의 예방 또는 개선 효과를 나타낼 수 있다.

[52]

[53] 또한, 본 발명은 Prdx3 펩타이드 또는 이의 유사체를 유효성분으로 포함하는, 미토콘드리아 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학 제제를 제공한다.

[54] 본 발명의 일 구현예로, 상기 약학 제제는 주사제형, 주입제형, 분무제형 또는 액상제형인 것일 수 있다.

[55]

[56] 또한, 본 발명은 Prdx3 펩타이드 또는 이의 유사체를 포함하는 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 미토콘드리아 관련 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

- [57] 본 발명에서 "개체"란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐(mouse), 쥐(rat), 개, 고양이, 말 및 소 등의 포유류를 의미한다.
- [58]
- [59] 또한, 본 발명은 Prdx3 펩타이드 또는 이의 유사체의 미토콘드리아 관련 질환의 예방 또는 치료 용도를 제공한다.
- [60] 또한, 본 발명은 Prdx3 펩타이드 또는 이의 유사체를 유효성분으로 포함하는 조성물의 미토콘드리아 관련 질환의 예방 또는 치료 용도를 제공한다.
- [61] 또한, 본 발명은 미토콘드리아 관련 질환의 예방 또는 치료를 위한 약제의 제조에 사용하기 위한 Prdx3 펩타이드 또는 이의 유사체의 용도를 제공한다.
- [62] 또한, 본 발명은 미토콘드리아 관련 질환의 예방 또는 치료를 위한 약제의 제조에 사용하기 위한 Prdx3 펩타이드 또는 이의 유사체 및 대식세포를 유효성분으로 포함하는 조성물의 용도를 제공한다.
- [63] 본원에 기재된 상기 각 특징들은 조합되어 사용될 수 있으며, 상기 각 특징들이 특허청구범위의 서로 다른 종속항에 기재된다는 사실은 이들이 조합되어 사용될 수 없음을 나타내는 것은 아니다.
- [64]
- [65] 또한, 본 발명은 Prdx3 유전자의 5'-UTR 엑손 1 (exon 1) 내지 엑손 4이 제거된, Prdx3 유전자 제거 마우스 모델을 제공한다.
- [66] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 마우스 모델은 파킨슨병 마우스 모델인 것을 특징으로 하는, 마우스 모델일 수 있다.
- [67] 또한, 본 발명은 Prdx3 유전자의 5'-UTR 엑손 1 (exon 1) 내지 엑손 4 제거하는 단계;를 포함하는, Prdx3 유전자 제거 마우스 모델의 제조 방법을 제공한다. 본 발명의 일 구체예에서, 상기 Prdx3 유전자 엑손 1 내지 6은 서열번호 7 내지 12로 표시되는 서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [68] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 Prdx3 유전자의 5'-UTR 엑손 1 (exon 1) 내지 엑손 4 제거는 상동 재조합 (homologous recombination)에 의한 것일 수 있다.
- [69] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 제거하는 단계는 Prdx3 유전자의 5'-UTR 엑손 1 (exon 1) 내지 엑손 4 부분을 포함하는 염기서열을 네오마이신 (neomycin) 유전자를 포함하는 콘스트럭트(construct)로 치환하여 수행되는 것일 수 있다.
- [70] 본 발명에서 상기 콘스트럭트는 외래 유전자인 네오마이신 (neomycin)의 5'-UTR에 Prdx3 유전자의 엑손 1의 5'-UTR의 인트론 (intron) 일부분을 넣고, 3'-UTR에 Prdx3 유전자의 엑손 4의 3'-UTR의 인트론 부분을 재조합한 것일 수 있다.
- [71] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 콘스트럭트 치환은 전기충격 방법에 의한 것일 수 있다.

발명의 효과

- [72] 본 발명의 Prdx3 펩타이드 또는 이의 유사체를 포함하는 약학적 조성물은 Prdx3 펩타이드 또는 이의 유사체에 의해 마이토파지 (Mitophagy)의 제거 및 알파-시누클레인 응집체를 제거를 통해 미토콘드리아 관련 질환(파킨슨 병 등)의 예방 및 치료에 이용할 수 있다.
- [73] 단, 본 발명의 효과는 상기 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

- [74] 도 1은 Peroxiredoxin 3(Prdx3) 결핍이 거대하고 손상된 미토콘드리아와 함께 심장 비대를 유발함을 확인한 도이다. 도 1a는 10주(n = 5/그룹) 및 52주령(n = 6/그룹)에서 Prdx3 야생형(Prdx3 WT) 및 Prdx3 결핍(Prdx3 KO) 마우스 사이의 심장 중량/체중 비율을 나타낸다. 도 1b 내지 1d는 10주령 Prdx3 WT(n = 6), 52주령 Prdx3 WT(n = 10), 10주령 Prdx3 KO(n = 6) 및 52주령 Prdx3 결핍 마우스(n = 6)에서 심초음파에 의한 심장 기능 분석 결과이다. 스트로크 볼륨(SV)(1b), 심박출량(CO)(1c) 및 박출률(EF)(1d)은 Simpson의 단일평면 디스크 접근 방식을 사용하여 좌심실(LV) 장축 뷰에서 측정하였다. 도 1e는 Prdx3 WT 및 Prdx3 KO 심장의 헤마톡실린 및 에오신 염색 결과이다 (스케일 바, 1mm). 도 1f 및 1g는 LV 근육 색전의 밀젠 (Wheat genn) 응집소 염색을 통해 세포 경계를 시각화하고 LV 섬유증을 정량화한 결과이다 (스케일 바, 20 μ m). 도 1h 및 1i는 LV 근육 색전의 Masson의 삼색 염색 및 심장 섬유증의 정량화 결과이다 (스케일 바, 50 μ m). 도 1j 및 1k는 Prdx3 WT 및 Prdx3 KO 마우스의 심장에서 대표적인 전자 현미경 사진 및 손상된 미토콘드리아(빨간색 화살표)의 정량화 결과이다 (10주 된 Prdx WT 및 Prdx3 KO 마우스의 눈금 막대, 0.5(박스 영역) 또는 1 μ m. 52주령 Prdx WT 및 Prdx KO 마우스의 스케일 바, 1(박스 영역) 또는 2 μ m *P < 0.05, **P < 0.01 및 ***P < 0.001).
- [75] 도 2는 퍼옥시레독신 3(Prdx3) 야생형(Prdx3 WT) 및 Prdx3 결핍(Prdx3 KO) 마우스의 경흉부 심초음파 결과를 나타낸 도이다. 도 2a는 10주령 Prdx3 WT(n = 6), 52주령 Prdx3 WT(n = 10), 10주령 Prdx3 KO(n = 6) 및 52주령-늙은 Prdx3 KO 마우스(n = 6)의 통합된 심초음파 결과를 나타낸다. EF (ejection fraction, 박출률), SV (stroke volume, 박출량), FS (fractional shortening, 부분 단축), CO (cardiac output, 심박출량). 도 2b는 10주령 Prdx3 WT, 52주령 Prdx3 WT, 10주령 Prdx3 KO 및 52주령 Prdx3 KO 마우스의 심장 이미지이다 (스케일 바, 1mm).
- [76] 도 3은 Peroxiredoxin 3(Prdx3) 결핍은 심근경색(MI) 후 좌심실(LV) 리모델링 및 심부전을 가속화함을 확인한 도이다. 도 3a는 MI 15일 후 Prdx3 야생형(Prdx3 WT, n = 7) 및 Prdx3 결핍(Prdx KO, n = 8) 마우스에서 심초음파를 사용한 심장 기능 분석 결과이다. 도 3b는 좌심실 확장기말 용적(EDV) 및 도 3c는 수축기말 부피(ESV)는 뇌졸중 부피(SV)(도 3d) 및 박출률(EF)(도 3e)에 대한 Simpson의 단일평면 디스크 접근 방식을 사용하여 LV 장축 보기에서 측정하였다. 도 3f는 MI 15

일 후 Prdx3 WT 및 Prdx KO 마우스에서 Masson의 삼색소 염색 심장의 직렬 섹션을 나타낸 도이다 (섬유증의 백분율은 전체 좌심실 면적에 대한 상대적으로 계산하였다). 도 3g는 ML 빨간색 화살표가 손상된 미토콘드리아를 나타내는 1일 후 야생형 및 Prdx KO 마우스의 심장의 대표적인 전자 현미경 사진이다 (스케일 바, 0.5(박스 영역) 또는 2 μ m). 도 3h는 MI 1일 후 Prdx3 WT(n = 5) 및 Prdx KO 마우스(n = 5)의 경색 영역의 TUNEL 분석 결과이다 (스케일 바, 10(박스 영역) 또는 50 μ m *P < 0.05 및 **P < 0.01).

[77] 도 4는 심근경색증(MI) 후 퍼옥시레독신 3(Prdx3) 야생형(Prdx3 WT) 및 Prdx3 결핍(Prdx3 KO) 마우스의 경흉부 심초음파 결과를 나타낸 도이다. 도 4a는 Prdx3 WT(n = 7) 및 Prdx3 KO 마우스(n = 8)의 풀링된 심초음파 데이터이다. 도 4b는 좌심실 기능을 VevoStrain 소프트웨어를 사용하여 평가한 결과이다.

[78] 도 5는 증가하는 미토콘드리아 손상이 퍼옥시레독신(Prdx3) 결핍에 의한 활성 산소종(ROS) 축적에 기인함을 확인한 도이다. 도 5a 및 5b는 Prdx3 야생형(Prdx3 WT) 및 Prdx3 결핍(Prdx3 KO) 마우스 배아 섬유아세포(MEF)의 박스 영역의 대표적인 저배율 및 고배율 이미지이다. MEF를 24시간 동안 미토카탈라아제 아데노바이러스로 감염시키고 Tom20(녹색) + 100nM MitoTracker(빨간색)(도 5a) 또는 150nM MitoTracker(녹색) + 5 μ M MitoSOX(빨간색)(도 5b)에 대한 항체로 25분 동안 면역염색하였다 (스케일 바, 2 μ m (박스 영역) 또는 10 μ m). 도 5c 및 5d는 Prdx3 WT 및 Prdx3 KO MEF(n = 25-33 세포)에서 탈분극된(손상된) 미토콘드리아(도 5c) 또는 미토콘드리아 ROS 수준(도 5d)을 정량화한 결과이다. 도 5e는 카탈라아제, Prdx3 및 Tom20 항체를 사용하여 미토-카탈라아제 아데노바이러스로 24시간 동안 감염된 Prdx3 WT 및 Prdx3 KO MEF의 전체 세포 용해물의 면역블롯팅 결과이다 (**P < 0.01). 데이터 A 내지 E는 3개의 독립적인 실험을 나타낸다.

[79] 도 6은 Peroxiredoxin(Prdx3) 결핍이 미토콘드리아 손상을 증가시킴을 확인한 도이다. 도 6A 및 6B는 10주령 Prdx3 야생형(Prdx3 WT), 52주령 Prdx3 WT, 10주령의 Prdx3-결핍(Prdx3 KO) 및 52주령 Prdx3 KO 마우스의 간, 골격근(가자미근) 및 뇌(치상회 영역) 조직의 대표적인 전자 현미경 사진을 나타낸 도이다. 빨간색 화살표는 손상된 미토콘드리아를 나타낸다 (스케일 바, 10주령 마우스의 경우 0.5 μ m (박스 영역) 또는 1 μ m, 52주령 마우스의 경우 1 μ m (박스 영역) 또는 2 μ m).

[80] 도 7은 Prdx3 결핍은 심장 미토콘드리아 기능 장애를 일으킴을 확인한 도이다. 도 7a는 야생형(Prdx3 WT) 및 Prdx3 결핍(Prdx3 KO) 심근세포의 ATP 생산을 비교한 도이다. 도 7b는 야생형(Prdx3 WT) 및 Prdx3 결핍(Prdx3 KO) 심근세포의 산소 소비율(OCR, pMoles/min)의 대표적인 추적한 결과를 나타낸 도이다. 화살촉은 올리고마이신(Oligo, 1.5 μ M), FCCP(1 μ M) 및 Rot & AA(로테논 및 안티마이신 A, 각각 0.5 μ M)를 1 x 10⁴개 세포에 주입한 시점을 나타낸다. 도 7c는 1 x 10⁴ 세포당 기초 호흡의 OCR 값, 도 7d는 ATP 연결 호흡의 OCR 값, 도 7e는 양성자 누출의 OCR 값, 도 7f는 최대 호흡의 OCR 값 및 도 7g는 예비 호흡 용량의 OCR 값을

나타낸다 (* $P < 0.05$ 및 ** $P < 0.01$). 테이터(7a 내지 7g)는 세 가지 독립적인 실험을 나타낸다.

- [81] 도 8은 Peroxiredoxin 3(Prdx3) 결핍이 심장의 미토파지를 감소시킴을 확인한 도이다. 도 8a 및 8b는 10주령 Prdx3 야생형(Prdx3 WT, $n = 9$), 52주령 Prdx3 WT($n = 6$), 10주령 Pink1 결핍(Pink1 KO, $n = 7$), 52주령 Pink KO($n = 6$), 10주령 Prdx3 결핍(Prdx3 KO, $n = 8$), 52주령 Prdx3 KO($n = 6$) 미토콘드리아 표적 Keima(mt)-Keima 마우스의 심장에 있는 미토파지의 대표적인 이미지(도 8a) 및 이를 정량화한 그래프이다 (도 8b) (스케일 바, 10 μ m). 도 8c 및 8d는 심근 경색(MI) 유도 1일 후 Prdx3 WT($n = 5$) 및 Prdx3 KO mt-Keima 마우스($n = 7$)의 경색된 심장에서 미토파지의 대표적인 이미지(도 8c) 및 정량화 그래프이다 (도 8d) (스케일 바, 10 μ m *** $P < 0.001$).
- [82] 도 9는 생체 내에서 퍼옥시레독신(Prdx3)이 없으면 미토파지가 감소함을 확인한 도이다. 도 9a 내지 9c는 야생형($n = 9$), Pink1-결핍(KO) 미토콘드리아 표적 Keima(mt)-Keima($n = 7$) 및 Prdx3 결핍(KO) mt-Keima 마우스($n = 8$)의 간(도 9a), 골격근(가자미근)(도 9b) 및 뇌 조직(치상회 영역)(도 9c)에서 미토파지의 대표적인 이미지 및 정량화 그래프를 나타낸다 (스케일 바, 20 μ m(간 및 골격근) 또는 50 μ m(뇌)). 도 9d는 Prdx3 야생형(Prdx3 WT, $n = 6$), Prdx3 결핍(Prdx3 KO, $n = 5$), Prdx3 WT($n = 6$) 및 Prdx3 KO mt-Keima 마우스($n = 6$)에서 심근 경색(MI) 유도 4 시간 후의 경색된 심장의 대표적인 이미지 및 미토파지의 정량화 그래프이다 (스케일 바, 10 μ m). 도 9e는 백색 RNAi 또는 Prx3 RNAi(da-GAL4>mt-Keima; 백색 RNAi, da-GAL4>mt-Keima; Prx3 RNAi)를 발현하는 성체 지방체 및 mt-Keima-Kei의 날개 디스크에서 미토파지의 수준을 보여주는 대표적인 공초점 이미지이다. 미토파지의 수준은 여러 조직 샘플(예: [흰색 RNAi], $n = 8$; 성인 지방체 [흰색 RNAi], $n = 8$; 유충 [Prx3 RNAi], $n = 9$; 성인 지방체 [Prx3 RNAi], $n = 5$)을 사용하여 정량화했다 (스케일 바, 20 또는 50 μ m. ** $P < 0.01$).
- [83] 도 10은 Peroxiredoxin 3(Prdx3)가 PINK1-Parkin 매개 미토파지에 필요함을 확인한 도이다. 도 10a 및 10b는 4시간 동안 DMSO, 20 μ M MG132 또는 10 μ M 카르보닐 시안화물 m-클로로페닐히드라존(CCCP)로 처리된 Prdx3 야생형(Prdx3 Wf) 및 Prdx3 결핍(Prdx3 KO) 마우스 배아 섬유아세포(MEF)의 미토콘드리아 분획에서 PJNK1 발현의 웨스턴 블롯 분석 결과 (도 10a) 및 정량화 결과이다 (도 10b). 상기 미토콘드리아 분획은 PINK1 및 Tom20 항체로 면역블롯팅하였다. 도 10c는 Tom20 항체(빨간색)를 사용하여 PINK1-GFP로 감염시킨 Prdx3 WT 및 Prdx3 KO MEF의 면역염색 결과이다. 그래프는 점선에서 측정된 Tom20 및 PINK1-GFP의 형광 강도를 나타낸다 (스케일 바, 1 μ m(박스 영역) 또는 10 μ m).
- [84] 도 10d 및 10e는 4시간 동안 10 μ M CCCP 또는 2.5 μ M 올리고마이신 및 250nM 안티마이신 A(OA)로 처리된 Prdx3 Wf 및 Prdx3 KO MEF의 미토콘드리아 분획에서 Pink1 발현의 웨스턴 블롯 분석 결과(도 10d) 및 정량화 그래프이다 (도 10e). 상기 미토콘드리아 분획은 PJNK1 및 Tom20 항체로 면역블롯팅하였다. 해시는 비특

정 밴드를 나타낸다. 도 10f 내지 10i는 Prdx3 WT 및 Prdx3 KO MEF에서 PINK1-GFP(10f 및 10g) 및 Parkin-GFP 수준(10h 및 10i)의 면역염색 결과 및 정량화 그래프이다. MEF를 24시간 동안 mito-catalase adenovirus로 감염시키고, PINK1-GFP 또는 Parkin-GFP로 형질감염시킨 다음, DMSO 또는 10 μ M CCCP로 4시간 동안 처리한 후, Tom20 항체(적색)로 면역염색하였다 (스케일 바, 10 μ m *P < 0.05 및 **P < 0.01). 데이터(10a 내지 10i)는 세 가지 독립적인 실험을 나타냅니다.

- [85] 도 11은 Peroxiredoxin 3(PRDX3)가 외부 미토콘드리아 막(OMM)에서 기질 및 PINK1-Parkin 매개 마이토파지로 PINK1의 모집을 조절함을 나타낸 도이다. 도 11a는 4시간 동안 DMSO, 20 μ M MD132 또는 10 μ M 카보닐로 시안화물 m-클로로페닐히드라존(CCCP) 처리된 Prdx3 야생형(Prdx3 WT) 및 Prdx3 결핍(Prdx3 KO) 마우스 배아 섬유아세포(MEF)의 세포 용해물에서 Pink1 수준을 웨스턴 블롯 분석 및 정량화한 결과이다. 상기 세포 용해물을 PINK1 및 튜불린에 대한 항체로 면역블롯팅하였다 (*P < 0.05 및 **P < 0.01). 도 11b는 Tom20 항체(빨간색)를 사용하여 대조군 또는 PRDX3 siRNA로 형질감염된 HeLa 세포의 면역염색한 결과이다. 그래프는 점선에서 측정된 Tom 및 PINK1-GFP의 형광 강도를 나타낸다. 도 11c는 Prdx3 WT 및 Prdx3 KO MEF의 면역염색은 PINK1-GFP 또는 Parkin-GFP로 형질감염되고 Tom20 항체(빨간색)를 사용하여 DMSO 또는 2.5 μ M 올리고마이신/250 nM 안티마이신(OA)으로 처리하였다 (스케일 바, 10 μ m). 도 11d는 PINK1-GFP 또는 Parkin-GFP로 형질감염되고 Tom20 항체(빨간색)로 4시간 동안 DMSO 또는 10 μ M CCCP로 처리된 PRDX3 siRNA 또는 대조군 siRNA 처리된 HeLa 세포의 면역염색 결과이다 (스케일 바, 10 μ m, 박스영역 스케일 바, 1 μ m).

- [86] 도 12는 퍼옥시레독신 3(Prdx3)가 PINK1과 상호작용함을 확인한 도이다. 도 12a는 내인성 PINK1과 PRDX3 사이의 상호작용을 확인한 도이다. 293T 세포의 전체 세포 용해물(WCL)을 대조군 면역글로불린 G(IgG) 및 항-Prdx3 항체로 면역침전시킨 다음 항-PINK1 항체로 블롯팅하였다. 도 12b는 PINK1-GFP, PRDX3-Myc, L53V PRDX3-Myc 및 PRDX3-Myc 우성-열성(DN; Cys108Ser, Cys229Ser)을 발현하는 구성체의 다양한 조합으로 공동 형질감염된 293T 세포의 WCL을 항-Myc 비드 및 GFP-특이적 항체를 사용한 후속 면역블롯팅한 결과이다. 해시는 IgG를 나타낸다. 도 12c는 PINK1-GFP, A93V PINK1-GFP 및 PRDX3-Myc를 발현하는 구조체의 다양한 조합으로 공동 형질감염된 293T 세포의 WCL을 항-Myc 비드 및 GFP-특이적 항체를 사용한 후속 면역블롯팅 결과이다. 해시는 IgG를 나타낸다. 도 12d는 PINK1-GFP를 발현하는 구조체로 형질감염된 293T 세포의 WCL은 GST-¹⁻⁴⁰PRDX3, GST-¹⁻⁴⁰PRDX3 L53V 또는 GST-¹⁻⁴⁰PRDX3 DN 접합 비드를 사용한 면역침강반응 (immunoprecipitation) 및 PINK1 또는 GFP 특이적 항체를 사용한 후속 면역블롯팅에 사용하였다. 해시는 비특정 밴드를 나타낸다. 도 12e는 PINK1-GFP 또는 A93V PINK1-GFP를 발현하는 구축물로 형질감염된 293T 세포의 WCL을 GST-¹⁻⁴⁰PRDX3를 사용한 면역침전 및 PINK1- 또는 GFP-특

이적 항체를 사용한 후속 면역블롯팅에 사용하였다. 해시는 비특정 밴드를 나타낸다. 도 12f는 Myc-His, 63-256 PRDX3-Myc-His 또는 1-256 PRDX3-Myc-His 발현 벡터로 형질감염된 293T 세포의 WCL은 PRDX3 및 튜불린 항체를 사용한 면역블롯팅에 사용하였다. 도 12g는 1-256 PRDX3-Myc-His(f의 빨간색 상자)의 질량 분광 분석 및 조기 서열(PRDX3 미토콘드리아 표적화 서열의 잔기 1-36) 및 성숙한 PRDX3의 예측된 MPP 절단 부위를 나타낸다. 데이터(12a 내지 12e)는 3개의 독립적인 실험을 나타냅니다.

- [87] 도 13는 퍼옥시레독신 3(PRDX3)과의 결합에 필수적인 PINK1 도메인 매핑을 나타낸 도이다. 도 13a에서 전장 (full-length) PINK1 및 잘린 PINK1 및 전장 PRDX3의 도메인 경계는 각각 왼쪽과 오른쪽에 표시하였다. PINK1 도메인은 미토콘드리아 표적 서열(MTS), 막횡단 도메인(TMD) 및 키나제 도메인으로 구성된다. PRDX3은 MTS를 포함하는 PINK1(1-94)의 N-말단과 상호 작용한다. 도 13b는 287-581 PINK1-GFP, 1-286 PINK1-GFP, 1-156 PINK1-GFP, 1-110 PINK1-GFP, 1-94 PINK1-GFP를 발현하는 구조체의 다양한 조합으로 공동 형질감염된 293T 세포의 WCL 및 PRDX3-Myc는 항-GFP 비드를 사용한 면역침전 및 Myc 특이적 항체를 사용한 후속 면역블롯팅 결과를 나타낸 도이다. 해시는 IgG를 나타낸다. 도 13c는 63-256 PRDX3-Myc, 37-256 PRDX3-Myc, PRDX3-Myc 및 1-110 PINK1-GFP를 발현하는 구조체의 다양한 조합으로 공동 형질감염된 293T 세포의 WCL을 항-GFP 비드 및 Myc-특이 항체를 사용한 후속 면역블롯팅 결과를 나타낸 도이다. 해시는 IgG를 나타낸다. 데이터(13b 및 13c)는 3개의 독립적인 실험을 나타낸다.

- [88] 도 14는 퍼옥시레독신 3(Prdx3)가 PINK1의 안정성을 조절함을 확인한 도이다. 도 14a 및 14b는 4시간 동안 DMSO 또는 10 μ M 카르보닐 시안화물 m-클로로페닐 히드라존(CCCP)으로 처리된 마우스 배아 섬유아세포(MEF)의 미토콘드리아 분획에서 Pink1 및 Prdx3 발현의 웨스턴 블롯 분석 결과(도 14a) 및 정량화 결과이다(14b). 미토콘드리아 분획을 PJNK1, Prdx3 및 Cox4 항체로 면역블롯팅하였다. 도 14c는 pDsRed2-Mito(MTX, mauix)로 형질감염되고 4시간 동안 DMSO 또는 10 μ M CCCP로 처리된 HeLa 세포에서 Tom20(녹색) 및/또는 PRDX3 항체(빨간색)를 사용한 면역염색 결과이다 (스케일 바, 2(박스 영역) 또는 10 μ m). 도 14d는 PINK1-GFP로 감염되고 4시간 동안 10 μ M CCCP로 처리된 HeLa 세포에서 Tom20(녹색) 및/또는 PRDX3 항체(빨간색)를 사용한 면역염색 결과이다 (스케일 바, 2(박스 영역) 또는 10 μ m). 도 14e 및 14f는 Omal siRNA로 감염되고 10 μ M CCCP로 4시간 동안 처리된 Prdx3 야생형(Prdx3 WT) 및 Prdx3 결핍(Prdx3 KO) MEF의 미토콘드리아 분획에서 Pink1의 웨스턴 블롯 분석 결과(도 14e) 및 정량화 결과이다 (도 14f). 상기 미토콘드리아 분획을 PJNK1, Omal, Prdx3 및 Cox4 항체로 면역블롯팅하였다. 도 14g 및 14h는 OmalsiRNA 및 PINK1-GFP와 함께 감염된 Prdx3 WT 및 Prdx3 KOMEF에서 Tom20 항체를 사용한 면역염색 결과 (도 14g) 및 PINK1-GFP의 정량

화 결과이다 (도 14h) (스케일 바, 10 μm * $P < 0.05$ 및 ** $P < 0.01$). 데이터(14a 내지 14h)는 3개의 독립적인 실험을 나타낸다.

[89] 도 15는 Peroxiredoxin 3(PRDX3)가 PINK1의 안정성을 조절함을 확인한 도로서, 대조군, PRDX3 siRNA 또는 PRDX3 및 OMA1 siRNA로 형질감염된 HeLa 세포의 Tom20 항체(빨간색)를 사용한 면역염색 결과이다 (스케일 바, 10 μm).

[90] 도 16은 외부 미토콘드리아 막(outer mitochondrial membrane, OMM)에서 PINK1의 발현은 퍼옥시레독신 3(Prdx3)이 없을 때 손상된 미토콘드리아로 Parkin을 모집함을 확인한 도이다. 도 16a는 N-Mid49 + PINK1¹¹¹⁻⁵⁸¹-GFP 구조의 모델을 나타낸다. 도 16b는 N-Mid49 + PINK1¹¹¹⁻⁵⁸¹-GFP로 형질감염되고 Tom20 항체(빨간색)로 면역염색된 Prdx3 결핍(Prdx KO) 마우스 배아 섬유아세포(MEF)의 박스 영역의 대표적인 저배율 및 고배율 이미지이다 (스케일 바, 2 μm (박스 영역) 또는 10 μm). 도 16c는 RFP-Parkin 및 N-Mid49 + PINK1¹¹¹⁻⁵⁸¹-GFP로 형질감염되고 DMSO 또는 10 μM 카르보닐 시안화물 m-클로로페닐히드라존(CCCP)으로 4시간 동안 처리된 Prdx3 야생형(Prdx3 WT) 및 Prdx3 KO MEF의 대표적인 이미지이다 (스케일 바, 10 μm). 도 16d는 대조군 및 PRDX3 siRNA로 형질감염시킨 후, RFP-Parkin 및 N-Mid49 + PINK1¹¹¹⁻⁵⁸¹-GFP로 형질감염시키고 DMSO 또는 10 μM CCCP로 4시간 동안 처리한 HeLa 세포의 대표적인 이미지이다 (스케일 바, 10 μm). 도 16e는 N-Mid49 + PINK1¹¹¹⁻⁵⁸¹-GFP로 형질감염시키고 4시간 동안 10 μM CCCP로 처리된 Prdx3 WT 및 Prdx3 KO MEF의 미토콘드리아 분획의 웨스턴 블롯 분석 결과이다. 미토콘드리아 분획은 GFP, Prdx3 및 Cox4에 대한 항체로 면역블롯팅하였다. 도 16f는 N-Mid49 + PINK1¹¹¹⁻⁵⁸¹-GFP로 형질감염된 Prdx3 KO MEF에서 MitoTracker 염색(빨간색) 또는 Tom20 항체(파란색)를 사용한 면역염색 결과이다. 도 16g는 N-Mid49 + PINK1¹¹¹⁻⁵⁸¹-GFP로 형질감염시키고 24시간 동안 10 μM CCCP로 처리된 Prdx3 WT 및 Prdx3 KO MEF에서 MitoTracker 염색(빨간색) 또는 Tom20 항체(파란색)를 사용한 면역염색 결과이다 (스케일 바, 10 μm).

[91] 도 17은 Peroxiredoxin 3(Prdx3)는 심근세포에서 미토콘드리아 품질 관리(mitochondrial quality control, MQC) 과정의 핵심 조절자임을 확인한 도이다. 도 17a는 DMSO 또는 10 μM 카르보닐 시안화물 m-클로로페닐히드라존(CCCP)으로 4시간 동안 처리한 Prdx3 야생형(Prdx3 WT) 및 Prdx3 결핍(Prdx3 KO) 마우스에서 심근세포의 Tom20(빨간색) 및 파킨(녹색) 면역염색 결과이다 (스케일 바, 2 μm (박스 영역) 또는 10 μm). 도 17b 및 17c는 Prdx3 WT 및 Prdx3 KO 미토콘드리아 표적 Keima(mt-Keima) 마우스의 심근세포에서 마이토파지의 대표적인 이미지 (도 17b) 및 정량화 결과이다 (도 17c). 심근세포를 24시간 동안 Prdx3 아테노바이러스 또는 Prdx3 우성-열성(dominant-negative, DN) 아테노바이러스로 감염시키고 4시간 동안 10 μM CCCP로 감염시켰다 (스케일 바, 10 μm). 도 17d 및 17e는 Prdx3 WT 및 Prdx3 KO mt-Keima 마우스의 심근세포에서 손상된 미토콘드리아(빨간색 화살표)의 대표적인 전자 현미경 사진 (도 17d) 및 정량화 결과이다 (도 17e).

심근세포를 24시간 동안 Prdx3 또는 Prdx3 DN 아데노바이러스로 감염시켰다. 화살표는 근섬유를 나타내고 열린 화살표는 근질의 Z선을 나타낸다 (스케일 바, 1 μm (박스 영역) 또는 2 μm , * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 및 *** $P < 0.001$).

- [92] 도 18은 새로운 심근세포의 분리 결과를 나타낸 도로서, myomesin(심근세포 마커, 녹색) 및 MitoTracker(빨간색)에 대한 항체를 사용한 심근세포의 면역염색 결과이다 (스케일 바, 10 μm).
- [93] 도 19는 Prdx3 컨벤셔널 (Conventional) 녹아웃(KnockOut, KO) 마우스에서 제거된 유전자 부분을 나타낸 도이다.
- [94] 도 20은 Prdx3 컨벤셔널 녹아웃 마우스를 PCR을 통해 확인한 도이다.
- [95] 도 21은 5개월령의 마우스의 도파민 신경이 존재하는 뇌의 흑색질(substantia nigra)을 분석한 결과이다.
- [96] 도 22는 Prdx3 knockout mouse의 뇌의 흑색질에서 미토콘드리아 기능이 떨어져 있음을 확인한 도이다.
- [97] 도 23은 Prdx3 knockout mouse의 흑색질의 도파민 신경에서 파킨슨병에서 나타나는 alpha-synuclein aggregation과 lipid droplet을 확인한 도이다.
- [98] 도 24는 Prdx3 knockout mouse의 흑색질의 도파민 신경에서 파킨슨병의 특징인 lipid droplet과 neuromelanin이 많이 증가되어 있음을 확인한 도이다.
- [99] 도 25는 SH-SY5Y neuron 배양세포에서 Prdx3 발현을 억제하면 도파민 양이 감소하고 adenovirus-Prdx3를 처리하면 다시 도파민 양이 회복됨을 확인한 도이다.
- [100] 도 26은 SH-SY5Y neuron 배양세포에 sodium arsenite를 처리하여 활성산소 스트레스를 준 상태에서 Prdx3 발현을 억제하면 alpha-synuclein aggregation이 증가하고, Prdx3 발현을 회복시키면 alpha-synuclein aggregation이 감소함을 확인한 도이다.
- [101] 도 27은 파킨슨병 발병에 직접적으로 관여하는 alpha-synuclein Pre-formed Fibrils (PFFs)를 처리하여 alpha-synuclein aggregation(초록색)이 형성된 마우스 뉴런에, adenovirus-Prdx3를 처리하여 Prdx3 발현을 증가시키면 alpha-synuclein aggregation(초록색)이 없어짐을 세포면역염색을 통해서 확인한 도이다.
- [102] 도 28은 파킨슨병 발병에 직접적으로 관여하는 alpha-synuclein Pre-formed Fibrils (PFFs)를 처리하여 alpha-synuclein aggregation이 형성된 마우스 뉴런에 대해서, 웨스턴 블롯팅 실험을 통해서 adenovirus-Prdx3를 처리하여 Prdx3 발현을 증가시키면 alpha-synuclein aggregation을 나타내는 불용해성의 alpha-synuclein이 감소함을 확인한 도이다.

[103]

발명의 실시를 위한 형태

- [104] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[105]

[106] **실험예 1: 재료 및 방법**[107] **1.1. 동물 모델**

[108] Prdx3-결핍 미토콘드리아-표적화된 Keima (mt-Keima) 마우스를 생성하기 위해, Prdx3-결핍 마우스를 mt-Keima 마우스와 교배시켰다. Pink1-결핍 mt-Keima 마우스를 생성하기 위해, Pink1결핍 마우스 (이 마우스는 연세대 이한웅 교수에 의해 제공되었다)를 Mt-Keima 마우스와 교배시켰다. 마우스를 C57BL/6J 배경(Jackson Laboratory)에서 7회 이상 역교배하였다. 모든 동물 관리 및 실험 절차는 이화여자대학교의 Institutional Animal Care and Use Committee에 의해 승인된 프로토콜에 따라 수행되었다.

[109]

[110] **1.2. 초파리 (*Drosophila*) 균주**

[111] Mt-Keima 트랜스제닉 드로소필라 (UAS-mt-Keima)를 이전에 생성하였다. 백색 RNAi (백색GD14981) 라인을 비엔나 드로소필라 리소스 센터로부터 구입하였다. da-GAL4 및 Prx3 RNAi (Prx3HMJ22845) 라인을 블룸िंग턴 스톡 센터 (Bloomington Stock Center) (Indiana University, Bloomington, IN, USA)로부터 구입하였다.

[112]

[113] **1.3. 포유동물 세포 배양물**

[114] 1차 마우스 배아 섬유아세포 (MEF)를 배아 13.5일에 야생형 및 Prdx3-결핍 배아로부터 분리하였다. 1차 MEF, HeLa 세포 및 293T 세포를 10% FBS(Invitrogen), 100 U/ml 페니실린, 및 100 µg/ml의 스트렙토마이신(Invirogen)이 보충된 돌베코 (Dulbecco)의 변형된 이글(Eagle) 배지(DMEM, 인비트로젠)에서 유지시켰다. 근세포를 제조사의 설명서에 따라 Pierce™ Primary Cardiomyocyte 분리 키트를 사용하여 출생후 3일에 야생형 및 Prdx3-결핍 마우스로부터 분리하였다. 분리된 세포를 분석 전에 7일 동안 배양하여 적절한 세포 형태를 확인하였다. Prdx3의 발현을 회복시키기 위해, PrdX3-결핍 심근세포를 Prdx3 아데노바이러스 또는 우성-열성 Prdx3(PrdX-DN) 아데노바이러스(Sirion)로 감염시켰다.

[115]

[116] **1.4. 플라스미드 및 RNAi 올리고뉴클레오타이드**

[117] Prdx3-Myc 플라스미드는 전장 (full-length) PRDX3 (NCBI 등록 번호 NM_006793.5)의 PCR 증폭 및 pcDNA.3.1/MyC-His (-) A 플라스미드 (Invitrogen)의 EcoRI-XhoI 부위로의 생성물의 클로닝을 통해 생성되었다. PINK1-GFP를 코딩하는 구조체는 전장 PINK1 (NCBI 등록 번호 NM_032409.3)의 PCR 증폭 및 생성물의 pEGFP-N3 플라스미드의 EcoRI-BamHI 부위로의 서브클로닝 (Clontech)을 통해 생성하였다. Mid49-GFP를 코딩하는 구조체를 전장 Mid49 (이소형 1; NCBI 등록 번호 NM_139162.3)의 PCR 증폭 및 생성물의 pEGFP-N3 플라스미드의 EcoRI-BamHI 부위로의 클로닝 (Clontech)을 통해 생성하였다. Mid49의 N-말

단 서열(아미노산 1-126, N-Mid49) 또는 PINK1의 아미노산 111-581(PINK1¹¹¹⁻⁵⁸¹)을 암호화하는 구조체는 각각 전장 Mid49 또는 PINK1의 PCR 증폭을 통해 생성되었다. N-Mid49 및 PINK1¹¹¹⁻⁵⁸¹의 융합 작제물을 생성하기 위해, Mid49¹⁻¹²⁶을 pEGFP-N3 플라스미드의 XhoI-EcoRI 부위에 서브클로닝하고 (Clontech), 이어서 PINK1¹¹¹⁻⁵⁸¹을 N-mid49 pEGFP-N 3 플라스미드의 EcoRI-BamHI 부위에 서브클로닝하였다. (PRDX3^{L53V} 및 PRDX3^{DN}을 발현하기 위한) PRDx3 및 (PINK1^{A93V}를 발현시키기 위한) PINK1에서의 점 돌연변이는 제조자의 프로토콜 (Thermo Fisher Scientific)에 따른 융합 부위-지정 돌연변이유발 키트를 사용하여 생성하였다. PRKN-GFP를 코딩하는 구조체를 전장 PRKN (이소폼 1; NCBI 등록 번호 NM_004562.3)의 PCR 증폭 및 생성물의 pERFP-C1 플라스미드의 EcoRI-BamHI 부위로의 서브클로닝 (Clontech)을 통해 생성하였다. pDsRed2-Mito(Clontech)를 미토콘드리아 매트릭스 염색에 사용하였다. GST- Δ^{1-40} PRDX3을 코딩하는 구조체는 생성물을 pGEM-4T-1 플라스미드 (GE Healthcare)의 EcoRI-XhoI 부위에 클로닝함으로써 생성하였다. siRNA를 GenePharma에 의해 합성하였다. 인간 siPRDX3 표적 서열은 5'-AAG CCA AGT CCA GCT GCT TCC-3' (서열번호 1), 인간 siOMA1의 표적 서열 5'-GAA GTG CTT TGT CAT CTA ATT-3'이며 (서열번호 2), 마우스 siOma1의 타겟 서열 5'-GGA TAC AGT CAA AGT TGC AGG-3' (서열번호 3)이다. 대조군으로서, Silencer Negative Control siRNA (GenePharma)를 사용하였다.

[118]

[119] **1.5. 형질주입 (transfection) 및 약물 치료**

[120]

미토-카탈라제를 과발현시키기 위해, Prdx3-결핍 MEFs 또는 PRDX3-고갈된 HeLa 세포를 미토 카탈라제 아데노바이러스로 감염시키고, 10% FBS가 보충된 DMEM에서 24시간 동안 배양하였다. 세포 (2×10^5 세포/웰)를 형질감염 전 18시간 동안 6-웰 플레이트에 접종하였다. 플라스미드 형질감염을 3 μ l의 리포펙타민 2000을 함유하는 OPTI-MEM 배지(Invitrogen)에서 4시간 동안 또는 NEONTM 형질감염 시스템(invitrogen)에서 수행하였다. 이어서, 세포를 대략 0.5×10^5 세포/ml의 밀도로 커버-글래스 기저부(SPL)와 함께 현미경 접시 상에 시딩하였다. RNAi 형질감염의 경우, 세포를 6-웰 플레이트 상에 30 내지 40% 컨플루언시(confluency)(또는 등가 밀도)로 시딩하였다. 그 후, 4 μ l의 리포펙타민 2000 (Invitrogen) 또는 5 μ l의 RNAiMAX (invitrogen) 및 40 nM RNAi 올리고뉴클레오타이드를 각각의 웰에 첨가하였다. 세포를 3 μ l의 리포펙타민 2000 및 적절한 플라스미드 DNA로 24시간 후에 재-형질감염시켰다. 미토콘드리아 염색을 위해, 세포를 고정 전에 20분 동안 DMEM에서 막 전위-의존성 축적을 나타내는 살아있는 미토콘드리아-표지 형광 염료인 100nM MitoTracker Red CMXRos (Invitrogen)로 처리하였다. 미토콘드리아의 살아 있는 영상화를 위해, 세포를 150 nM MitoTracker Green (Invitrogen) 및 5 μ M MitoSOX (invitrogen) (살아 있는 세포

에서 미토콘드리아 초산화물 지표)로 DMEM 중에서 20분 동안 처리하였다. 카보닐 시아나이드 클로로페닐하이드라존(CCCP Sigma), 올리고마이신(Sigma), 안티마이신(antimycin) A(Sigma), 또는 MG132(Sigma) 처리에 대해, 세포를 폴리-L-리신-코팅된 커버슬립(cover slip)(0.1 mg/ml, 시그마) 상에 접종하고, 혈청-함유 배지에서 10 μ M CCCP와 함께 4 내지 24시간 동안, 2.5 μ M 올리고마이신 및(plus) 250 nM 안티마이신 A(OA)와 함께, 또는 20 μ M MG131과 함께 4시간 동안 인큐베이션하였다. DMSO를 비히클 (vehicle) 대조군으로서 사용하였다.

[121]

[122] **1.6. 전자 현미경**

[123] 세포 투과 전자 현미경 (TEM)을 위한 샘플을 제조하기 위해, 심장, 간, 골격근, 및 뇌 조직을 10주령 야생형 및 Prdx3-결핍 마우스로부터 분리하였다. 이어서, 샘플을 0.1 M PBS (pH 7.4) 중에서 2% 글루타르알데히드 파라포름알데히드로 2시간 동안 고정시키고, 0.1 M PBS (pH 7.4, 1 mM) 중에서 30분 동안 3회 세척하였다. 이어서, 조직을 0.1 M PBS (pH 7.4)에 용해된 1% OsO₄로 2시간 동안 후고정시키고, 등급화된 에탄올 시리즈 (50, 60, 70, 80, 90, 95, 및 100%)에서 탈수시키고, 프로필렌 옥사이드와 함께 인큐베이션하였다. 표본을 Poly/Bed 812 키트 (Polysciences, USA)를 사용하여 매립하였다. 60°C의 순수 프레스 수지에 전자 현미경 오븐(TD-700, DOSAKA, 일본)에서 24시간 포매한 후, 두께 300nm의 절편을 먼저 절단하고, 톨루이딘 블루로 염색하여, 광 현미경(Olympus BX40, Japan)으로 관찰하였다. 이어서, 80-nm-두께 절편을 7% 우라닐 아세테이트 및 납 시트레이트로 이중-염색하여 대조 염색 (20분)을 수행하였다. 이어서, 상기 절편을 레이카 울트라컷 UCT 울트라미크로톰 (레이카 마이크로시스템즈, 오스트리아)을 사용하여 절단하였다. 모든 샘플을 80 kV의 가속 전압에서 TEM(JEM-1011, JEOL, 일본)을 사용하여 관찰하였다.

[124]

[125] **1.7. 마이토파지(mitophagy) 수준의 측정**

[126] 마이토파지 수준을 전술한 바와 같이 공초점 현미경을 통해 pH-의존성 형광 프로브 mt-Keima를 사용하여 조사하였다. mt-Keima 형광 신호를 분석하기 위해, plan-Apochromat 10x/0.45 M27, Plan-Asopchromat 20x/0.8 M27 및 c-Aspchromat 40x/1.20W Korr 렌즈가 장착된 제이스 LSM 800 공초점 현미경(Carl Zeiss)을 사용하여 mt -Kema 마우스 및 드로소필라 조직 샘플을 검사하였다. 2개의 순차적인 여기 레이저(488 및 555 nm) 및 595 내지 700 nm 방출 대역폭을 사용하여 Mt-Keima 형광을 영상화하였다. mt-Keima 공초점 이미지에 기초한 마이토파지의 정량화는 전술한 바와 같이 픽셀 단위로 Zeiss Zen 소프트웨어를 사용하여 수행되었다. 마이토파지 수준 (마이토파지의 %)은 높은 적색/녹색 비를 갖는 픽셀의 수를 픽셀의 총 수로 나눈 것으로 정의하였다. 심장에서 마이토파지 수준을 정량화하기 위해, 적어도 5개의 조직 샘플을 정량화에 사용하고, 평균값을 계산하였다. 모든 공초점 현미경 분석에서, 모든 이미징 파라미터는 일정하게 유지되고, 이득

레벨만이 임의의 픽셀의 포화를 피하기 위해 조정되었다. 결과는 평균 $\pm$ SD로서 제시된다.

[127]

[128] **1.8. 미토콘드리아 분리**

[129] 미토콘드리아를 제조자의 프로토콜(Thermo Fisher Scientific, Inc.)에 따라 배양된 세포를 위한 미토콘드리아 분리 키트를 사용하여 MEF, 293T 세포, 및 HeLa 세포 용해물로부터 분리하였다.

[130]

[131] **1.9. ATP 수준 측정 및 호흡 측정**

[132] ATP 분석을 위한 심근세포의 ATP 수준 측정, 미토콘드리아 분리 키트(Thermo Fisher Scientific, Inc.)를 사용하여 심근세포 용해물로부터 미토콘드리아를 분리하였다. 상대 ATP 수준은 측정된 ATP 농도를 20 μ g 미토콘드리아로 나누어 계산하였다. ATP 농도는 앞서 설명한 ENLITEN® ATP Assay System Bioluminescence Detection Kit for ATP Measurement(Promega, USA)에 의해 측정하였다. 심근세포의 산소 소모율(OCR)은 앞서 설명한 XFp Analyzer(Agilent, USA)로 측정하였다.

[133]

[134] **1.10. 면역침전 및 웨스턴 블롯팅**

[135] 면역침전 실험을 위해, 비-형질감염 및 형질감염된 세포를 전체-세포 추출 완충액 (10 mM HEPES [pH 7.9], 400 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 5% 글리세롤, 1 mM DTT, 및 프로테아제 억제제)에서 용해시켰다. 비-처리된 세포 용해물 또는 항-PRDX3 (1 μ g)을 용해물에 첨가한 후, TEG 반응 완충액 (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, 10% 글리세롤, 1mM DTT, 및 150 mM NaCl) 중 항-Myc-태깅된 아가로스 (MBL) 또는 단백질 A-아가로스 (엡스테이트 바이오테크)를 첨가하고, 혼합물을 4°C에서 3시간 동안 또는 밤새 교반하였다. 면역침전물을 TEG 세척 완충액(0.1% Triton X-100을 함유하는 TEG 반응 완충액)에서 세척하였다. 웨스턴 블롯팅을 위해, 세포를 전체-세포 추출 완충액에서 용해시키거나, 단백질 추출 완충액 (20 mM HEPES [pH 7.9], 300 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.1% NP40, 100 mM KCl, 및 프로테아제 억제제)에서 MICRA D-8 균질화기 (ART Moderne Labortechnik)를 사용하여 균질화시켰다. 총 단백질을 소듐 도데실 설페이트-폴리아크릴아미드 겔 상에서 분별하고 니트로셀룰로오스 막(Amersham Biosciences)으로 옮겼다. 하기 단백질에 대한 일차 항체를 사용하였다: PRDX3 (1:100, AbFrontier, LF PA0044), 카탈라제 (1:100), 랩프론티어(Labfrontier), BC 100494), PRKN 1:100, 산타 크루즈 바이오테크놀로지, sc-32282), GFP (1:1100, 산티아 크루제 바이오테크놀로지(Santa Cruz Biotechnology), sc-9976), TOM20 (1:100100, Santa Crruz 바이오테크널로지 sc-11415), 튜불린 (1:300, 시그마 (Sigma), T6199), OMA1 1:1000, 프로테인테크, 17116-1-AP), PRkN 1:1100, 아브캠 (Abcam), ab77924), Myc (1:1200, 아버캠, ab32), COX4 (1:1008, 아바캠, a b33985), 미오메신 (1:1000, DSHB, B4-S), 및 PINK1 (1:150, NOVUS, BC 10494). 2차 항체는

플루오레세인-접합된 항-토끼 IgG, 항-마우스 IgG, 항-염소 IgG(Invitrogen) 및 항-토끼, 항-마우스, 및 항-염소 HRP-접합 항체(Zymed Laboratories)였다. 단백질-항체 복합체를 ECL 플러스 시스템(Amersham Biosciences)을 사용하여 검출하였다.

[136]

[137] 1.11. 흉곽 심초음파 검사 및 MI 수술

[138] 야생형 및 Prdx3-결핍 마우스 (10 및 49 내지 55주령)에서 25 내지 55-MHz 선형 어레이 트랜스듀서를 갖는 Vevo2100 시스템 (VisualSonics)을 사용하여 흉부 심초음파를 수행하였다. 1.5 내지 2% 이소플루란으로 마취를 유도한 후, 마우스를 마취에 의해 심박수를 생리적 범위(>450 bpm)로 유지하면서 심초음파 검사하고, 심초파 검사 동안 호메오써믹 패드를 사용하여 체온을 37°C에서 유지하였다. 방출 분획(EF), 분획 단축(FS), SV, 심박출량(CO), 말단-이완 부피, 및 말단-수축 부피와 같은 좌심실(LV) 변수를 제조자에 의해 제공된 심슨(Simpson)의 단일평면 방법(monoplane method)의 디스크 접근 및 VevoStrain 소프트웨어를 사용하여 장축 시야를 통해 분석하였다. 야생형 및 Prdx3-결핍 마우스 (10 내지 12주령)를 이소플루란 마취 하에 심장 수술에 적용하였다. 좌측 전방 하강 관상 동맥은 7-0 실크 봉합사를 사용하여 영구적으로 폐색되었다. 25 내지 55-MHz 선형 어레이 트랜스듀서를 갖는 Vevo2100 시스템(VisualSonics)을 사용하여 수술 후 15일에 골절 심초음파를 수행하였다. 마취를 수행하고 1.5 내지 2% 이소플루란의 흡입을 통해 유지하였고, 심초음파 검사 동안 체온을 모니터링하였다. EF, SV, 확장기말용적 (end-diastolic volume), 및 수축기말용적 (end-systolic volume)과 같은 LV 변수 (LV variable)들은 제조자에 의해 제공된 VevoStrain 소프트웨어를 사용하여 디스크 접근의 장축 뷰 심슨(Simpson)의 단일평면 방법을 통해 분석되었다.

[139]

[140] 1.12. 심장 섬유증 분석 (Cardiac fibrosis analysis)

[141] Masson의 트리크롬-염색 심장의 일련의 절편을 사용하여 좌심실 (left ventricular, LV) 섬유증을 평가하였다. 파라핀-매립된 LV 샘플을 6 µm-두께 슬라이스로 분할하고, 제조사의 지침에 따라 매손의 트리크롬 염색 키트 (BBC 생화학적)를 사용하여 염색하였다. 조직 절편을 Vectra Polaris 자동화 정량 병리학 영상화 시스템 (PerkinElmer)을 사용하여 스캐닝하고, LV 면적에 대한 섬유증의 백분율을 Form Advanced Imaging Analysis Software (PerkinElmer)를 사용하여 측정하였다.

[142]

[143] 1.13. 라이브 이미징 및 공초점 현미경

[144] 세포의 라이브 이미징은 스피닝 디스크 공초점 시스템(spinning disc confocal system; A1C; Nikon)을 사용하여 수행되었다. 살아있는 세포의 경우, 영상화를 LCI 챔버 (카펠리드 TC; LCI)에서 37°C 및 5% CO₂에서 수행하고, x60 개구수 (NA) 1.4 오일 대물 렌즈를 사용하여 영상을 촬영하였다. 고정 셀에 대해, 이미징은 레이저-스캐닝 공초점 현미경(LSM880; Carl Zeiss) 및 구조화된 조명 현미

경(ELYRA S.1; Carl Zeiss)을 사용하여 수행되었다. X63 오일 대물 렌즈(NA 1.4)로 영상을 촬영하였다. Carl Zeiss Elements, Photoshop (Adobe), IMARIS (Bitplane AG), 또는 ImageJ (US National Institutes of Health) 소프트웨어를 사용하여 영상을 분석하였다. 스케일 바는 Carl Zeiss Elements 및 ImageJ를 사용하여 생성하였다.

[145]

[146] **1.14. 손상된 미토콘드리아 및 미토콘드리아 ROS 분석**

[147] 탈분극된 (손상된) 미토콘드리아를 측정하기 위해, 연속적인 z-평면 상의 미토콘드리아-연관된 MitoTracker Red CMXRos (Invitrogen) 이미지만을 ImageJ 소프트웨어를 사용하여 정량화하였다. 미토콘드리아 ROS를 분석하기 위해, 연속적인 z-평면 상의 미토콘드리아-연관 MitoSOX (Invitrogen) 이미지만을 ImageJ 소프트웨어를 사용하여 정량화하였다. 시그마플롯 (시스타트 소프트웨어, 인코포레이티드)을 사용하여 통계 분석을 수행하였다. 데이터는 적어도 3개의 실험의 평균 $\pm$ SEM으로서 제시된다.

[148]

[149] **1.15. 면역형광 및 조직학**

[150] 배양된 세포를 PBS 중 4% 포름알데히드 중에 20분 동안 실온 (RT)에서 고정시키고, PBS로 세척하고, 0.1% 트리톤 X-100으로 15분 동안 투과시켰다. 세포를 PBS로 세척하고, 1시간 동안 PBS 중 3% BSA로 차단하고, RT에서 대략 1 내지 3 시간 동안 PBS 중 1차 항체와 인큐베이션하였다. PBS로 세척한 후, 세포를 RT에서 1시간 동안 2차 항체와 함께 인큐베이션하였다. 이어서, 세포를 10 μ M의 4,6-디아미디노-2-페닐인돌로 염색하고, Vectashield(VECTOR)로 장착하였다. 심장의 파라핀-매립된 구획 (6 μ m 두께)을 10% 완충된 포름알데히드에 고정시키고 TUNEL 검정 및 면역형광 분석에 사용하였다.

[151]

[152] **1.16. 질량 분석**

[153] 겔 PRDX3 밴드를 탈염하고 트립신으로 소화시키고, 생성된 펩티드를 추출하고, nanoAcquityTM UPLC/ESI/q-TOF MS/MS (SYNAPTTM G2Si HDMSTM, Waters Co., UK)를 사용하여 펩티드를 분석하였다.

[154]

[155] **1.17. TUNEL 분석**

[156] MI 24시간 후 심근 경색된 심장에서의 아포토시스는 제조자의 프로토콜에 따라 TACS 2 TdT 플루오레세인 계내 아포토시스 검출 키트 (트레비젠)를 사용하여 평가하였다.

[157]

[158] **1.18. 통계적 분석**

[159] 2개의 실험 그룹 사이의 차이를 Student's t-test 또는 Mann-Whitney's U test를 사용하여 분석하였다. 3개 또는 그 이상의 그룹을 비교하기 위해, 일원 ANOVA와 일원수 보정을 사용하였다. P<0.05는 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

[160] **실험예 2: 결과**[161] **2.1. Prdx3 결핍에 의한 심장 비대 및 기능장애를 유도**

[162] 미토콘드리아는 실질적으로 심혈관 항상성에 기여하고, MQC를 통한 이들의 미세-조정은 심혈관 세포 생존 및 생리학적 심장 기능의 유지에 중요하다. MQC의 파괴는 심장 결함과 밀접하게 연관된다.

[163] 심근 MQC에서 Prdx3의 역할을 결정하기 위해, 심장 표현형을 10주 및 52주의 야생형 및 PrdX3-결핍 마우스에서 조사하였다. Prdx3-결핍 마우스는 심장 체중 대 체중 비율의 유의한 증가, 52주령에서 CO 감소, 및 EF의 변화 없이 10주 및 52주 연령 모두에서 SV 감소를 포함하는 심장 비대를 나타내었다 (도 1a 내지 1d 및 도 2a). 이러한 결과는 미토콘드리아 기능이상이 확장기 기능이상에 의해 야기된 심부전과 관련되어 SV 및 CO를 감소시킨다는 이전의 보고와 일치하였다. 따라서, Prdx3 결핍에 의한 LV 리모델링 및 심장 비대의 유도는 미토콘드리아 기능이상이 인간 HFpEF를 연상시키는 심부전의 중요한 위험 인자임을 나타낸다.

[164] 또한, Prdx3-결핍 마우스는 10주령의 야생형 마우스와 유사한 심장 크기를 가졌으나, 심장 비대를 나타내었으며, 이는 52주령에서 심근세포 크기 및 LV 섬유증이 상당히 증가하였다 (도 1e 내지 1i, 도 2b). 그리고 Prdx3-결핍 심근세포에서 손상된 미토콘드리아는 10주령 마우스에서 관찰되었으며, 이는 52주령에서 현저하게 증가되었고, 마우스는 형태학적으로 특이한 형태 및 매우 큰 크기를 갖는 거대하고 손상된 미토콘드리아를 나타내었다 (도 1j 및 1k). 이러한 결과는 Prdx3 결핍에 의해 유도된 MQC 기능장애가 기능장애 및 거대 미토콘드리아의 축적을 유도하고 심장 기능장애를 야기함을 나타낸다.

[165]

[166] **2.2. Prdx3 결핍에 의한 심근경색(myocardial infarction, MI)과 관련된 심장 기능장애 악화**

[167] 경색 심근증의 특징인, 산화적 스트레스에 의해 유발되는 미토콘드리아 손상은 과도한 심근세포 손실 및 LV 리모델링을 촉진한다.

[168] Prdx3 결핍에 의해 유발된 미토콘드리아 기능장애 및 감소된 마이토파지가 MI 후 심부전을 악화시키는지를 평가하기 위해, 심장 기능을 MI 유도 15일 후 심장 초음파검사를 사용하여 평가하였다 (도 4a). EF 및 SV는 야생형 마우스에서보다 Prdx3-결핍 마우스에서 유의하게 더 낮았다. LV 말단-수축제 부피는 Prdx3-결핍 마우스에서 유의하게 증가되었지만, LV 단부-이완제 부피는 야생형 및 PrdX3-결부 마우스 사이에서 유의하게 상이하지 않았다 (도 3a 내지 3e). 이들 결과는 Prdx3 결핍이 MI 후 심장 기능장애를 악화시킨다는 것을 나타낸다. 더욱이, Masson's 트릭롬 염색은 Prdx3 결핍이 심장 섬유증 및 LV 리모델링을 악화시키는 것으로 나타났다 (도 3f). 또한, 다중 소포를 갖는 손상된 미토콘드리아의 수가 야생형 마우스보다 Prdx3-결핍 마우스의 경색된 심장에서 더 높았다는 것을 확인하였다 (도 3g). 손상된 미토콘드리아의 MQC-유도 제거의 파괴는 아포토시스 캐스케이드의 활성화를 특징으로 하는 악성 세포 사멸을 유도한다.

[169] 그리고 MI 후 야생형 및 Prdx3-결핍 마우스의 경색된 심장을 사용하여 *in situ* 상에서 아포토시스 분석을 수행하였다. 그 결과, 아포토시스 세포 사멸이 Prdx3-결핍 마우스의 경색된 심장에서 유의하게 증가되었음을 확인하였다 (도 3h). 10주령 Prdx3-결핍 마우스는 생리학적 조건 하에서 명백한 심장 기능장애를 나타내지 않았으나 (도 4b), 손상된 MQC에 기인하는 손상된 미토콘드리아의 증가된 수는 MI 후 심부전의 유병률을 설명할 수 있다. 따라서, MI 하에서, Prdx3 결핍은 경색된 심장에서 증가된 미토콘드리아 손상 및 결과적인 세포 자연사 (Apoptosis)를 초래함을 나타낸다.

[170]

[171] **2.3. Prdx3 결핍에 의한 생체내(*in vivo*) 마이토파지 억제**

[172] Prdx3 결핍에 의해 야기되는 미토콘드리아 손상이 미토콘드리아 ROS 축적에 기인하는지 여부를 추가로 결정하기 위해, Prdx3-결핍 마우스에서 미토콘드리아 표현형을 확인하였다. 미토콘드리아 막 포텐셜을 Prdx3-결핍 마우스로부터 분리된 MEF에서 분석하여, 증가된 수의 손상 또는 탈분극된 미토콘드리아를 나타냈다 (도 5a 및 5c). 다음으로, Prdx3-결핍 MEF에서 미토콘드리아 ROS의 분석은 Prdx3 결핍이 증가된 미토콘드리아 ROS 수준을 유도한다는 것을 확인하였다 (도 5b 및 5d). ROS 축적을 예방하는데 Prdx3의 1차 분자 기능을 확인한 후, 미토콘드리아 ROS 스캐빈저 (ROS scavenger)인 미토-카탈라제 (Mito-catalase)의 과발현이 Prdx3 결핍과 관련된 미토콘드리아 손상을 완화시킬 수 있는지 여부를 확인하였다. 미토-카탈라제 과다발현은 Prdx3 결핍에 의해 유발되는 미토콘드리아 손상을 감소시키는 것으로 나타났다 (도 5a 내지 5e). 이러한 결과는 Prdx3 결핍-유도된 미토콘드리아 손상이 비정상적 ROS 축적과 밀접하게 연관된다는 것을 나타낸다. 또한, 생체내에서 Prdx3 결핍은 Prdx3-결핍 마우스의 심장 및 다른 조직에서 미토콘드리아 손상을 일으킨다 (도 6A 및 6B). ATP 수준과 산소 소비율(OCR)도 Prdx3 결핍 심근세포에서 크게 감소하여 Prdx3 결핍이 심장 미토콘드리아 기능 장애를 유발함을 보여준다 (도 7a 내지 7g). 손상된 미토콘드리아의 수는 52-주령 Prdx3-결핍 마우스의 심장, 간, 골격근, 및 뇌에서 증가되었고 (도 1j 및 1k, 도 6A 및 6B), 이는 Prdx3-결핍 마우스가 MQC 연구에 적합한 동물 모델임을 나타낸다.

[173] 다음으로, 미토콘드리아-특이적 Prdx3에 의한 ROS의 조절을 통한 미토콘드리아 손상의 예방 및 PINK1-매개된 마이토파지를 통한 손상된 미토콘드리아의 제거에서 2개의 MQC 과정 사이의 가능한 조절을 확인하기 위해, Prdx3-결핍 및 Pink1-결핍 마우스의 심장에서 미토콘드리아 표현형을 비교하였다. 미토콘드리아 손상은 Prdx3-결핍 마우스의 심장 및 다른 조직에서 증가되었지만 (도 1j 및 1k, 도 6A 및 6B), 마이토파지(mitophagy)는 야생형 및 Pink1-결핍 생쥐(도 8a 및 8b, 도 9a 내지 9c)에서보다 Prdx3-결핍 마우스의 심장 및 다른 조직에서 현저하게 낮았다.

- [174] 다음으로 MI 후의 병태생리학적 결과, 특히 마이토파지 양식이 Prdx3에 의해 영향을 받는지 여부를 확인하였다. 우리는 MI가 있는 Prdx3 결핍 mt-Keima 마우스를 사용하여 마이토파지에서 Prdx3의 심장 기능을 특성화했으며, 마이토파지는 MI 후 4시간 후에 야생형 mt-Keima 마우스의 심장에서 유의하게 증가했지만, MI에 관계없이 Prdx3 결핍 mt-Keima 마우스의 심장에서는 현저하게 감소함을 확인하였다 (도 9d). 우리는 또한 Prdx3 결핍이 MI 후 24시간 동안 심장 조직에서 마이토파지를 상당히 약화시킨다는 것을 확인하였다 (도 8c 및 8d). 일관되게, Prdx3의 *Drosophila* ortholog인 Prdx3의 고갈은 *Drosophila* 유충과 *Drosophila* 성인 지방체의 날개 디스크에서 마이토파지를 감소시켰다 (도 9e).
- [175] 이러한 결과는 ROS 수준을 조절하여 미토콘드리아 손상을 예방하는 본질적인 역할 외에도 마이토파지 조절에서 Prdx3의 잠재적 역할을 나타낸다.
- [176]
- [177] **2.4. Prdx3의 Prdx3-의존성 국소화 및 미토콘드리아에서의 PINK1 분해를 통한 마이토파지를 조절**
- [178] 마이토파지의 조절에 대한 Prdx3의 역할을 확인하기 위해, PINK1 단백질 수준이 Prdx3 결핍에 의해 변경되는지 여부를 조사하였다. 이를 위해, 야생형과 Prdx3-결핍 MEF 사이의 PINK1 단백질 수준을 비교하였다. PINK1 단백질 수준은 야생형 MEF에서보다 Prdx3-결핍 및 프로테아좀 억제제 MG132-처리된 Prdx3-결핍 MEF에서는 더 높았다 (도 10a 및 10b, 도 11a). Prdx3 결핍은 PINK1의 상향조절에도 불구하고 감소된 마이토파지(mitophagy)를 초래하기 때문에, PINK1의 서브미토콘드리아 국소화가 Prdx3 결핍에 의해 변경되는지 여부를 확인하였다. 대조군 및 Prdx3-결핍 MEF에서 GFP-태깅된 PINK1을 과발현시키고, 에어리스칸(Airyscan) 초-해상도 현미경을 사용하여 OMM 마커 Tom20으로 표지된 미토콘드리아에서의 이의 국소화를 비교하였다. Prdx3-결핍 MEF 또는 PRDX3-고갈된 HeLa 세포에서, PINK1-GFP는 OMM에서 Tom20과 공동편재된 반면, PINK1-FP는 야생형 MEF 및 HeLa 세포에서 매트릭스에 우선적으로 국소화되었다(도 10c, 도 11b). 이러한 결과는 Prdx3이 PINK1의 서브미토콘드리아 국소화에 영향을 미치고, 이에 의해 그의 분해를 조절한다는 것을 나타낸다.
- [179] 이어서, Prdx3이 전구-마이토파지 조건 하에서 PINK1 발현에 영향을 미치는지를 평가하였다. 야생형 및 Prdx3-결핍 MEF를 미토콘드리아 언커플링제 CCCP 또는 미토콘드리아 호흡 억제제 올리고마이신 및 안티마이신 A (oligomycin and antimycin A, OA)로 처리하고, PINK1 단백질 수준을 확인하였다. 이전의 연구는 CCCP 또는 OA 치료가 미토콘드리아에서 PINK1 축적을 강하게 증가시켜, 마이토파지를 유도함을 나타내었으나, 본 발명에서 CCCP 또는 OA 처리에 의한 미토콘드리아에서의 PINK1 축적의 유도는 Prdx3 결핍에 의해 거의 완전히 폐지되었다 (도 10a, 10b, 10d 및 10e).
- [180] 일관되게, MEF에서 PINK1-GFP 또는 Parkin-GFP를 과다 발현하였을 때, ROS에 의한 미토콘드리아 손상이 Prdx3 결핍 MEFs에서 PINK1-GFP 및 Parkin-GFP의

CCCP 의존적 미토콘드리아 축적은 Prdx3 결핍 미토-카타라제에 의해 개선되었음에도 불구하고 강하게 억제되었다. (도 10f 내지 10i). 또한 MEF 및 HeLa 세포에서 PINK1-GFP 또는 Parkin-GFP를 과발현했을 때 PINK1-GFP 및 Parkin-GFP의 CCCP 또는 OA 의존성 미토콘드리아 축적은 Prdx3 결핍 MEF 또는 PRDX3 결핍 HeLa 세포에서 억제되었다 (도 11c 및 11d). 이러한 결과는 Prdx3이 PINK1의 서브미토콘드리아 (submitochondrial) 국소화 및 미토콘드리아의 분해를 조절하여 PINK1-Parkin 매개 마이토파지의 조절자 역할을 한다는 것을 나타낸다.

[181]

[182] 2.5. Prdx3와 PINK1의 미토콘드리아 표적화 서열 상호작용

[183] PRDX3이 공동-면역침전 실험을 사용하여 PINK1과 상호작용하는지를 시험하여, 내인성 PRDX3이 내인성 PINK1과 결합하는 것을 확인하였다 (도 12a).

[184] PRDX3과 PINK1 사이의 중요한 결합 부위를 확인하기 위해, PRDX3과 PINK1의 잘린 점돌연변이 구조를 만들고 PINK1의 N-말단 도메인이 PRDX3과의 결합에 필요하다는 것을 확인하였다 (도 13a 및 13b). PINK1¹⁻¹¹⁰과의 결합에 중요한 PRDX3의 N-말단 도메인을 추가로 결정하기 위해, 우리는 PRDX3⁶³⁻²⁵⁶, PRDX3³⁷⁻²⁵⁶, PRDX3¹⁻²⁵⁶, 및 PINK1¹⁻¹¹⁰를 사용하여 IP 실험을 수행하였다. PINK1¹⁻¹¹⁰가 PRDX3³⁷⁻²⁵⁶ 및 PRDX3¹⁻²⁵⁶과 결합하지만 PRDX3⁶³⁻²⁵⁶과는 결합하지 않는다는 것을 발견했는데, 이는 PRDX3의 N-말단 서열(아미노산 37-62)이 PINK1과의 결합에 필요함을 나타낸다 (도 13c). PRDX3Leu53Val 및 PINK1Ala93Val 돌연변이체를 이용하여, PRDX3에서의 Leu53 및 PINK1에서의 Ala93이 PRDX3과 PINK1 사이의 결합에 중요하다는 것을 확인하였다 (도 12b 및 12c). PRDX3에 의한 ROS 제거를 차단하는 우성-열성 PRDX3Cys108Ser/Cys229Ser은 여전히 PINK1에 결합할 수 있으며, 이는 ROS-억동 활성이 우성-열성 PRDX3에서 기능적으로 온전하게 유지되었음을 나타낸다 (도 12b). GST 풀다운 실험을 통해, PRDX3에서 Leu53 및 PINK1에서 Ala93이 이들 단백질 사이의 직접 결합에 중요하다는 것을 확인하였다 (도 12d 및 12e).

[185] PRDX3의 N-말단 서열 (아미노산 1 내지 62)은 미토콘드리아 표적화 신호로서 작용하는 것으로 보고되었다. PRDX3의 미토콘드리아 표적화 신호 서열을 추가로 명확하게 하기 위한 질량 분광분석법은 PRDX3의 N-말단 서열 (아미노산 1 내지 36)이 미토콘드리아 표적화에 필수적이라고 예측하였고, 성숙한 PRDX3이 Leu53을 함유하는 것으로 밝혀졌으며, 이는 PINK1에 대한 그의 결합을 보장하는 것이다 (도 12f 및 12g). 미토콘드리아 Prdx의 결정학(Prdx3의 *Leishmania infantum* ortholog)은 미토콘드리아 표적화 서열 외부의 N-말단 서열이 구조적으로 안정한 미토콘드리아 Prdx의 형성에 중요하다는 것을 나타내었고, 따라서 PRDX3의 N-말단 서열(아미노산 37 내지 62)이 PINK1의 미토콘드리아 표적화 서열에 결합하는 것을 확인하였다.

[186]

[187] **2.6. Prdx3의 마이토파지에서의 Oma1의 억제를 통한 PINK1 안정성 조절**

[188] 손상된 미토콘드리아에서 PINK1 수준이 증가함에 따라 Prdx3 단백질 발현이 변화하는지 여부를 확인하였다. Prdx3 단백질 수준이 또한 손상된 미토콘드리아에서 증가되어, PINK1의 상향조절을 모방함을 확인하였다 (도 14a 및 14b). 또한 Prdx3의 미토콘드리아 국소화가 CCCP-유도된 미토콘드리아 손상 하에서 PINK1과의 결합시 미토콘드리아 매트릭스로부터 OMM으로 전환되는지 여부를 확인하였다. Tom20과 Prdx3의 공동-면역염색은 Prdx3이 건강한 미토콘드리아에서 미토콘드리아 매트릭스에 국한된 반면, Tom20 또는 PINK1과의 공동-국소화에 의해 확인되는 바와 같이, 손상된 미토콘드리아에서 OMM에 전위되는 것을 확인하였다 (도 14c 및 14d).

[189] 다양한 세포 스트레스는 미토콘드리아 기능장애를 유발할 수 있으며, 이는 그 자체가 IMM-상주 스트레스-유도된 프로테아제 OMA1의 활성화를 촉진할 수 있다. 손상된 미토콘드리아에서 활성화시, Oma1은 Dele1을 절단하고 스트레스-유도된 단백질분해 캐스케이드를 개시한다. 최근 연구는 OMA1이 손상된 미토콘드리아로 유입되는 파킨슨병 관련 PINK1 돌연변이체를 분해한다는 것을 확인하였다. Prdx3을 포함하는 Prdx는 정상 조건 하에서 퍼옥시다제로서 및 다양한 스트레스에 노출시 샤페론으로서 이중 기능을 할 수 있다. 인간 PRDX3은 스트레스 조건 하에서 촉매적으로 활성인 자가-조립 샤페론으로서 작용한다.

[190] Prdx3의 존재에 관계없이 PINK1이 Oma1에 의해 분해되는지를 결정하기 위해, 본 발명자들은 Oma1 고갈 및 CCCP 처리 후 야생형 및 Prdx3-결핍 MEF에서 손상된 미토콘드리아에서 PINK1의 안정성을 확인하였다. 마이토파지를 겪는 손상된 미토콘드리아에서, PINK1은 Prdx3의 존재 하에 Oma1에 의해 분해되지 않았다 (도 14e 및 14f). 또한, PINK1은 Prdx3의 부재 하에 Oma1에 의해 분해되었지만, 이의 수준은 siRNA(siOma1)를 사용하여 Oma1 고갈에 의해 회복되었다. PINK1-GFP는 또한 CCCP 처리 후 Prdx3-결핍 MEF 및 PRDX3-공핍 HeLa 세포에서 완전히 손실되었다. 그러나, siOma1을 사용한 Oma1 고갈은 CCCP로 처리된 세포에서 PINK1-GFP 수준을 극적으로 회복시켰다 (도 14g 및 14h, 도 15). 따라서, PINK1의 N-말단에 Prdx3의 결합은 Oma1에 의한 이의 절단을 차단함으로써 분해로부터 후자 단백질을 보호할 수 있다. 이는 Prdx3이 PINK1에 대한 샤페론으로서 작용한다는 것을 나타낸다.

[191] 그리고 Prdx3이 손상된 미토콘드리아에서 PINK1의 안정성을 조절함으로써 PINK1-Parkin-매개된 마이토파지(mitophagy)를 조절하는 것을 확인하기 위해, PINK1 동원/반응 실험을 수행하였다. Mid49는 미토콘드리아 동력학에서 분열을 제어하는 Drp1의 미토콘드리아 동원을 조절하고, N-말단 미토콘드리아 표적화 서열 및 OMM 도메인을 갖는 OMM 단백질이다. 미토콘드리아 표적화 서열 및 OMM 도메인을 함유하는 N-Mid49를 사용하여, PRDX3-결합 영역 및 OMA1 절단 부위 둘 다를 결여하고 OMM에 지속적으로 국한된 미토콘드리아 표적화 도메인 절단된 형태의 PINK1 (PINK 1¹¹¹⁻⁵⁸¹)을 생성하였다 (도 16a). N-Mid49-PINK1

¹¹¹⁻⁵⁸¹이 Prdx3-결핍 MEF에서 과발현되는 경우, 작제물은 CCCP-유도된 미토콘드리아 손상과 무관하게 미토콘드리아에 정상적으로 국소화된다 (도 16b). N-Mid49-PINK1¹¹¹⁻⁵⁸¹이 Prdx3-결핍 MEF 또는 PRDX3-고갈된 HeLa 세포에서 과발현되는 경우, 상기 작제물은 단지 CCCP 처리 후 손상된 미토콘드리아에 대해 Parkin을 동원한다 (도 16c 및 16d). N-Mid49-PINK1¹¹¹⁻⁵⁸¹은 Prdx3 및 CCCP-유도된 미토콘드리아 손상의 존재에 관계없이 손상된 미토콘드리아에서 안정하게 발현되었다 (도 16e). 더욱이, Prdx3-결핍 MEF에서 N-Mid49-PINK1¹¹¹⁻⁵⁸¹의 과발현은 Prdx3-결손 MEF에서의 발견과 비교하여 정상 마이토파지의 발생을 통해 감소된 미토콘드리아 탈분극을 초래하였다 (도 16f). 대부분의 세포에서 미토콘드리아 탈분극을 유도하기 위해, Prdx3-결핍 MEF 및 N-Mid49-PINK1¹¹¹⁻⁵⁸¹-과발현 Prdx3-결핍 MEF를 CCCP로 24시간 동안 처리하였다. 그러나, CCCP 치료 후 미토콘드리아 탈분극은 N-Mid49-PINK1¹¹¹⁻⁵⁸¹-과발현 Prdx3-결핍 MEFs에서 감소되었고, 이는 N-Mid49-PINK1¹¹¹⁻⁵⁸¹-매개된 마이토파지를 통한 손상된 미토콘드리아의 제거를 나타낸다 (도 16g). 따라서, Prdx3은 사페론으로서 작용하고 단백질과 결합함으로써 손상된 미토콘드리아에서 PINK1 안정성을 유지하여, 활성화된 Oma1에 의한 절단으로부터 이를 보호할 수 있다.

[192]

[193] **2.7. Prdx3의 심근세포에서의 MQC 과정을 조절**

[194] Prdx3-결핍 심장에서 마이토파지의 억제가 PINK1-Parkin-매개된 마이토파지와 기능적 연결을 갖는지 여부를 확인하기 위해, CCCP 치료 후 야생형 및 Prdx3-결손 심근세포에서 손상된 미토콘드리아에서 Parkin의 국소화를 조사하였다. 내인성 Parkin이 야생형 심근세포에서 손상된 미토콘드리아에 국한되지만 Prdx3-결핍 심근세포에서는 국한되지 않음을 확인하였으며 (도 17a 및 도 18), 이는 Prdx3이 심근세포에서의 PINK 1-Parkin 매개성 도식을 조절하는 것을 나타낸다.

[195] 다음으로, Prdx3 또는 Prdx3-DN 아데노바이러스가 CCCP-유도된 마이토파지에서 마이토파지를 구제할 수 있는지 여부를 확인하였다. Prdx3-결핍 심근세포를 CCCP 처리 후 Prdx3 또는 Prdx3-DN을 보유하는 아데노바이러스로 감염시켰다. Prdx3-DN은 ROS 제거에 대해서는 결함이 있지만, PINK1-매개된 마이토파지에 대해서는 기능적이다. Prdx3 또는 Prdx3-DN 발현은 Prdx3-결핍 심근세포에서 마이토파지를 야생형 심근세포와 유사한 수준으로 회복시켰다 (도 17b 및 17c). 또한, Prdx3-결핍 심근세포에서 손상된 미토콘드리아의 수는 아데노바이러스 Prdx3 또는 Prdx3-DN 형질감염에 의해 감소되었는데, 이는 Prdx3 결핍에 대한 증가된 미토콘드리아 손상이 ROS 제거에 결함이 있는 Prdx3-DN에 의해 활성화된 기능적 마이토파지에 의해 감소될 수 있음을 나타낸다 (도 17d 및 17e).

[196] 결과적으로, Prdx3은 미토콘드리아 손상의 예방과 손상된 미토콘드리아의 제거 사이의 상호작용을 통해 주요 조절자로서 작용하며, 이는 심장 기능에 필수적임을 확인하였다.

[197]

[198] **2.8. Prdx3의 파킨슨병에서의 효과 확인**[199] **2.8.1. Prdx3 유전자 녹아웃 마우스 제작**

[200] Prdx3 유전자는 마우스의 19번 염색체 (chromosome)에 위치하며 엑손 (exon) 1번에서 엑손 7번까지 유전자 번역을 통해 257 아미노산 (amino acid)으로 구성된 단백질을 구성하였다. Prdx3 유전자의 엑손 1에 미토콘드리아 목표 신호 (mitochondrial targeting signal)가 존재하고 엑손 4의 109번과 엑손 6의 230번에 활성산소를 제거하는 시스테인 (cysteine) 잔기가 존재함을 확인하였다. Prdx3 유전자는 미토콘드리아 매트릭스 (mitochondrial matrix)에 존재하고 미토콘드리아 (mitochondria)에서 활성산소를 제거하는 기능을 가지고 있다.

[201] Prdx3 컨벤셔널 녹아웃 (Conventional KnockOut) 마우스는 외래 유전자인 네오마이신 (neomycin)의 5'-UTR에 Prdx3 유전자의 엑손 1의 5'-UTR의 인트론 (intron) 일부분을 넣고, 3'-UTR에 Prdx3 유전자의 엑손 4의 3'-UTR의 인트론 부분을 제조합한 콘스트럭트 (construct)를 마우스 배아 줄기 세포 (Mouse Embryonic Stem Cell)에 전기충격 방법으로 주입하여, Prdx3 유전자의 엑손 1의 5'-UTR의 인트론 부분과 엑손 4의 3'-UTR의 인트론 부분에 상동 재조합 (homologous recombination) 방법으로 엑손 1에서 엑손 4까지 삭제 (deletion)을 유도하였다. 네오마이신이 있는 배지에서 Prdx3 유전자의 엑손 1에서 엑손 4까지 삭제된 마우스 배아 줄기 세포를 선택한 후 마우스 낭배기 배아에 미세주입하여 Prdx3 유전자 녹아웃 마우스를 제작하였다 (도 19 참조). Prdx3 야생형 (wild type, WT) 마우스는 도 20에서와 같이 ① Prdx3-정방향 프라이머 (Forward primer: cag gaa atg tca ata agt gtc tac, 서열번호 4)를 엑손 1의 왼쪽의 인트론 부분에서 제작하고, ② Prdx3-역방향 프라이머 (Reverse primer: cca gag gcc act tgt gta gc, 서열번호 5)는 엑손 1에서 제작하여 증합효소 연쇄반응 (Polymerase Chain Reaction, PCR)을 통해 390 염기 쌍 (base pair)의 결과물을 확인하였다. Prdx3 녹아웃 마우스의 판별은 도 20에서와 같이 ① Prdx3-정방향 프라이머 (Forward primer: cag gaa atg tca ata agt gtc tac, 서열번호 4)를 엑손 1의 왼쪽의 인트론 부분에서 제작하고 ③ Prdx3-네오-역방향 프라이머 (neo-Reverse primer: cga gga cca gag caa cct tc, 서열번호 6)를 Prdx3 유전자의 엑손 1에서 엑손 4 (서열번호 7 내지 10)까지 삭제하기 위해 도입된 외래 유전자인 네오마이신에서 제작하여 PCR를 통해 300 염기 쌍의 결과물을 확인하였다.

[202] 이와 같은 방법을 통해 Prdx3 녹아웃 마우스를 판별하고 Prdx3 녹아웃 마우스에서 유래한 MEF(Mouse Embryonic Fibroblast) 세포에서 Prdx3 야생형 마우스와 비교해서 Prdx3 발현이 없음을 웨스턴 블랏 (western blot) 결과를 통해서 확인하였다 (도 20 참조).

[203]

[204] **2.8.2. Prdx3 유전자 녹아웃 마우스에서 파킨슨병 발병 확인**

- [205] 5개월령의 마우스의 도파민 신경이 존재하는 뇌의 흑색질(substantia nigra)을 분석하여 Prdx3 야생형 마우스와 비교해서 Prdx3 녹아웃 마우스의 흑색질에서 도파민 신경이 유의적으로 감소함을 확인하였다 (도 21 참조). Prdx3 녹아웃 마우스의 운동성이 감소하고 Prdx3 녹아웃 마우스의 뇌의 흑색질에서 미토콘드리아 기능이 떨어져 있음을 확인하였다 (도 22 참조). 또한, Prdx3 녹아웃 마우스의 흑색질의 도파민 신경에서 파킨슨병에서 나타나는 alpha-synuclein aggregation 및 lipid droplet을 확인하였다 (도 23 참조). 전자현미경 분석을 통해 Prdx3 녹아웃 마우스의 흑색질의 도파민 신경에서 파킨슨병의 특징인 lipid droplet과 neuromelanin이 많이 증가되어 있음을 확인하였다 (도 24 참조).
- [206] 상기 결과는, 본 발명에 따른 Prdx3 녹아웃 마우스가 파킨슨병의 발병과 치료를 연구하기에 적합한 파킨슨병 모델 마우스임을 나타내는 것이다.
- [207]
- [208] **2.8.3. 파킨슨병에서 Prdx3의 치료효과 확인**
- [209] 파킨슨병 연구에 많이 사용되는 SH-SY5Y neuron 배양세포에서 Prdx3 발현을 억제하면 도파민 양이 감소하고 adenovirus-Prdx3를 처리하면 다시 도파민 양이 회복됨을 확인하였다 (도 25 참조).
- [210] 파킨슨병 발병 배양세포 모델인 alpha-synuclein stable SH-SY5Y neuron 배양세포에 sodium arsenite를 처리하여 활성산소 스트레스를 주면 파킨슨병 발병에 직접적으로 관여하는 alpha-synuclein aggregation이 생기는데 Prdx3 발현을 억제하면 alpha-synuclein aggregation이 증가하고 adenovirus-Prdx3를 처리하여 Prdx3 발현을 회복시키면 alpha-synuclein aggregation이 감소함을 확인하였다 (도 26 참조).
- [211]
- [212] 또한, 파킨슨병 발병에 직접적으로 관여하는 alpha-synuclein Pre-formed Fibrils (PFFs)를 마우스 뇌에서 추출한 뉴런에 처리하면 alpha-synuclein aggregation이 생기면서 뉴런의 퇴행을 유도하여 체외 파킨슨병 발병 모델이 형성되는 것을 확인하였다. 해당 alpha-synuclein aggregation(초록색)이 형성된 뉴런에 adenovirus-Prdx3를 처리하여 Prdx3 발현을 증가시키면 alpha-synuclein aggregation(초록색)이 없어짐을 세포면역염색을 통해서 확인하였다 (도 27 참조).
- [213] 또한, 웨스턴 블롯팅 실험을 통해서 adenovirus-Prdx3를 처리하여 Prdx3 발현을 증가시키면 alpha-synuclein aggregation을 나타내는 불용해성의 alpha-synuclein이 감소함을 확인하였다. 이를 통해 Prdx3 발현저하가 파킨슨병 발병에 중요한 원인이 되는 alpha-synuclein aggregation 형성에 관여할 수 있음을 확인하였고, Prdx3 자체가 파킨슨병 치료에 중요하게 관여할 수 있음을 확인하였다 (도 28 참조).
- [214] 상기 결과들은 Prdx3가 파킨슨병의 치료제로서 유용하게 이용될 수 있음을 시사하는 것이다.
- [215]
- [216]

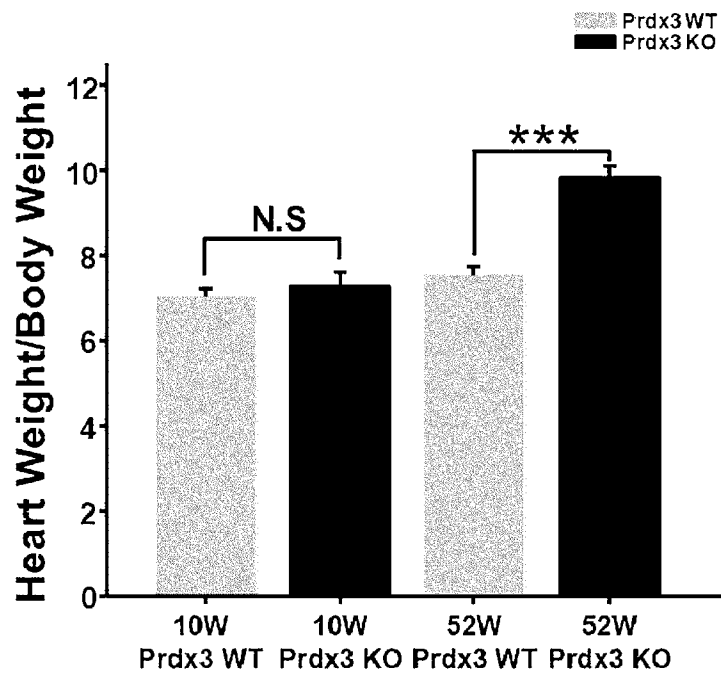
청구범위

- [청구항 1] Prdx3 펩타이드 또는 이의 유사체를 유효성분으로 포함하는, 미토콘드리아 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서, 상기 Prdx3 유사체는 Prdx3 우성-열성(dominant-negative, DN) 돌연변이인 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 3] 청구항 1에 있어서, 상기 Prdx3 펩타이드는 마이토파지(Mitophagy)를 제거하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 4] 청구항 3에 있어서, 상기 Prdx3 펩타이드는 PINK1 펩타이드 분해를 통해 마이토파지를 조절하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 5] 청구항 1에 있어서, 상기 Prdx3 펩타이드는 알파-시뉴클레인(alpha-synuclein) 응집체를 제거하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 6] 청구항 1에 있어서, 상기 미토콘드리아 관련 질환은 심장질환 (cardiovascular disease), 림프종 (Lymphoma), 사구체신염 (Glomerulonephritis), 골다공증 (Osteoporosis), 운동신경세포병 (Motor Neuron Disease), 근위축증 (muscular atrophy), 다운 증후군 (Down Syndrome), 암종 (Carcinoma), 피크 병 (Pick Disease), 파킨슨 증후군 (Parkinson Syndrome) 및 알츠하이머 증후군 (Parkinson Syndrome)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인, 약학적 조성물.
- [청구항 7] Prdx3 펩타이드 또는 이의 유사체를 유효성분으로 포함하는, 미토콘드리아 관련 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.
- [청구항 8] Prdx3 펩타이드 또는 이의 유사체를 유효성분으로 포함하는, 미토콘드리아 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학 제제.
- [청구항 9] Prdx3 펩타이드 또는 이의 유사체를 포함하는 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 미토콘드리아 관련 질환의 예방 또는 치료 방법.
- [청구항 10] Prdx3 유전자의 5'-UTR 엑손 1 (exon 1) 내지 엑손 4이 제거된, Prdx3 유전자 제거 마우스 모델.
- [청구항 11] 청구항 10에 있어서, 상기 마우스 모델은 파킨슨병 마우스 모델인 것을 특징으로 하는, 마우스 모델.
- [청구항 12] Prdx3 유전자의 5'-UTR 엑손 1 (exon 1) 내지 엑손 4 제거하는 단계;를 포함하는, Prdx3 유전자 제거 마우스 모델의 제조 방법.
- [청구항 13] 청구항 12에 있어서, 상기 Prdx3 유전자의 5'-UTR 엑손 1 (exon 1) 내지 엑손 4 제거는 상동 재조합 (homologous recombination)에 의한 것인, Prdx3 유전자 제거 마우스 모델의 제조 방법.
- [청구항 14] 청구항 12에 있어서,

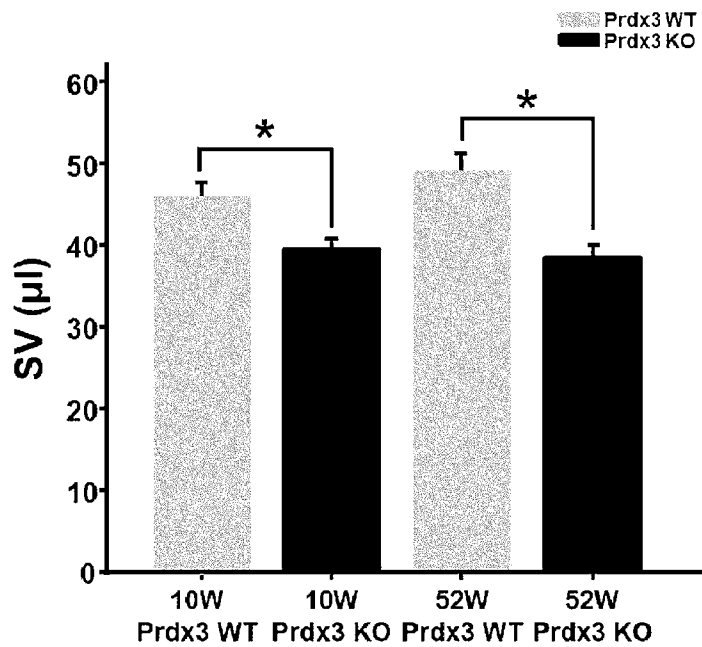
상기 제거하는 단계는 Prdx3 유전자의 5'-UTR 엑손 1 (exon 1) 내지 엑손 4 부분을 포함하는 염기서열을 네오마이신 (neomycin) 유전자를 포함하는 콘스트럭트(construct)로 치환하여 수행되는 것인, Prdx3 유전자 제거 마우스 모델의 제조 방법.

- [청구항 15] 청구항 14에 있어서,
상기 콘스트럭트 치환은 전기충격 방법에 의한 것인, Prdx3 유전자 제거 마우스 모델의 제조 방법.

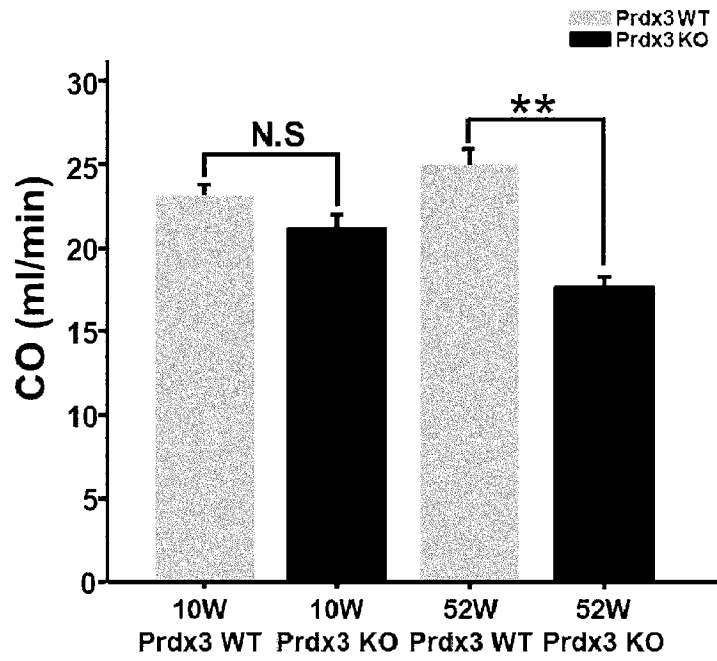
[도1a]



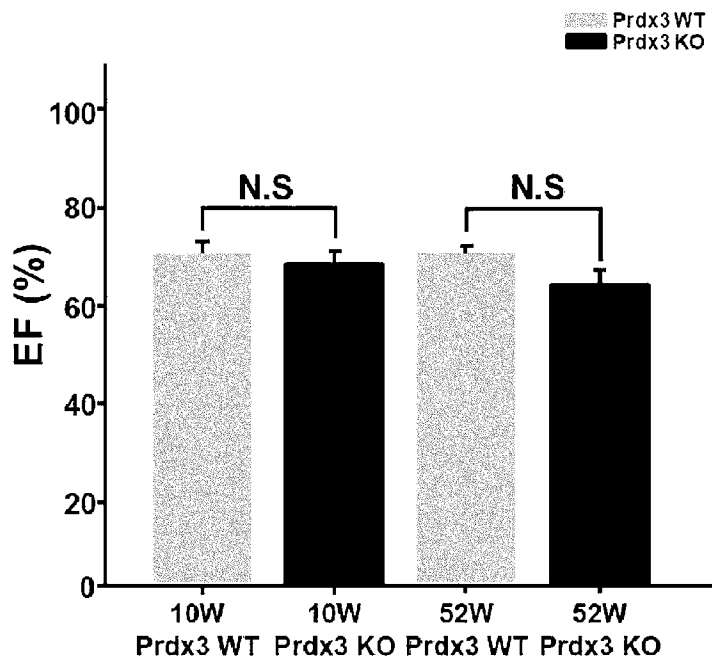
[도1b]



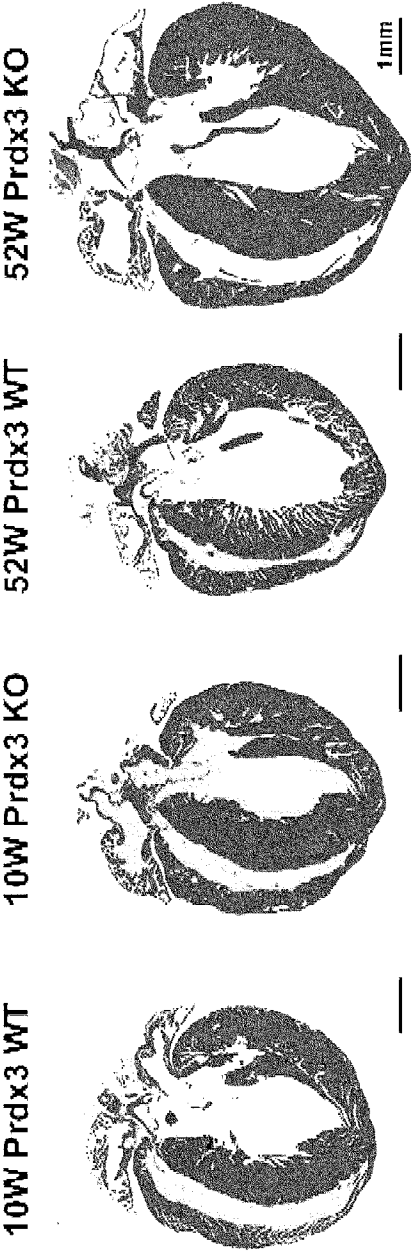
[도1c]



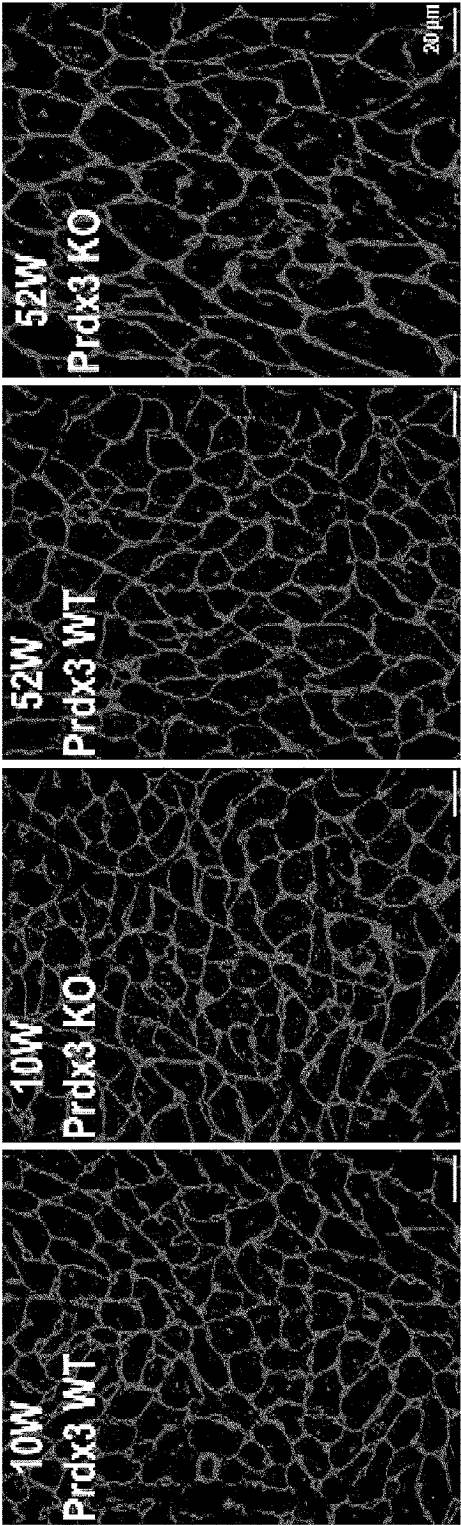
[도1d]



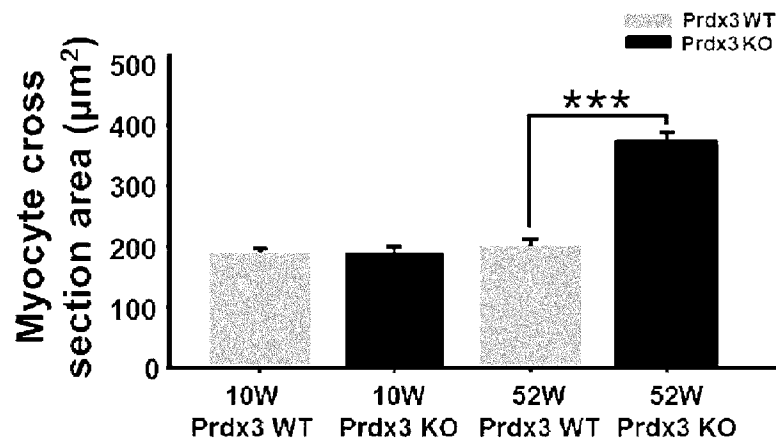
[도 1e]



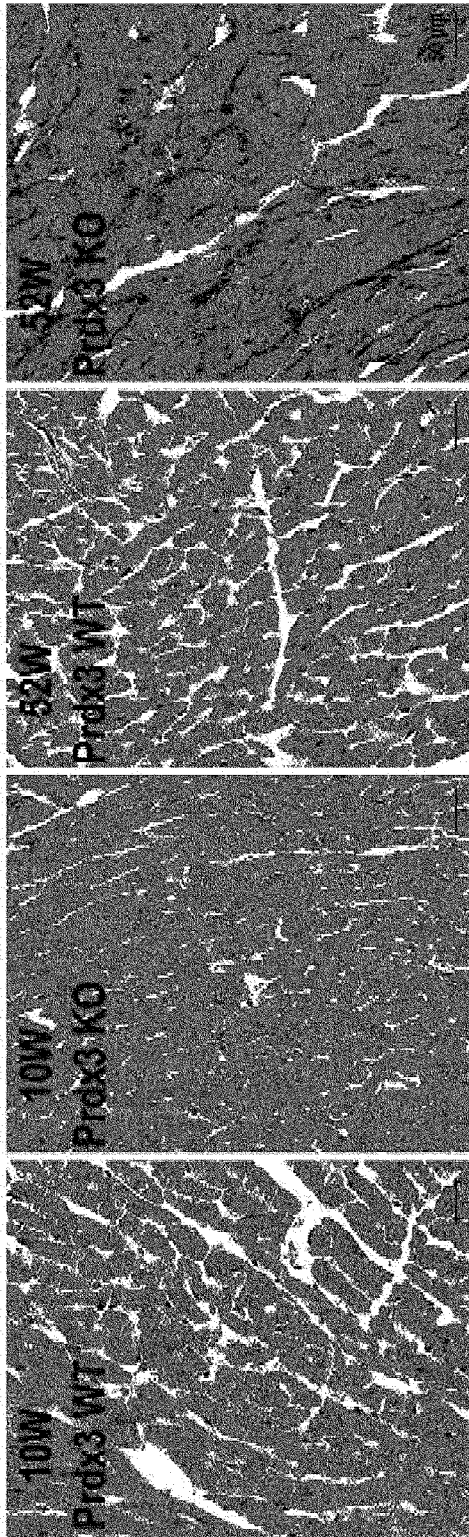
[도 1f]



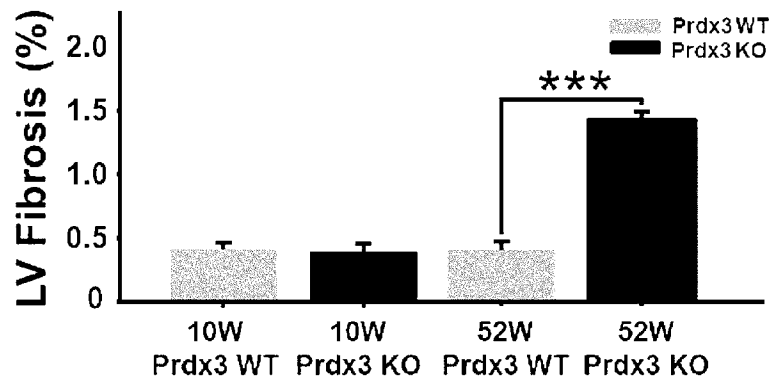
[도1g]



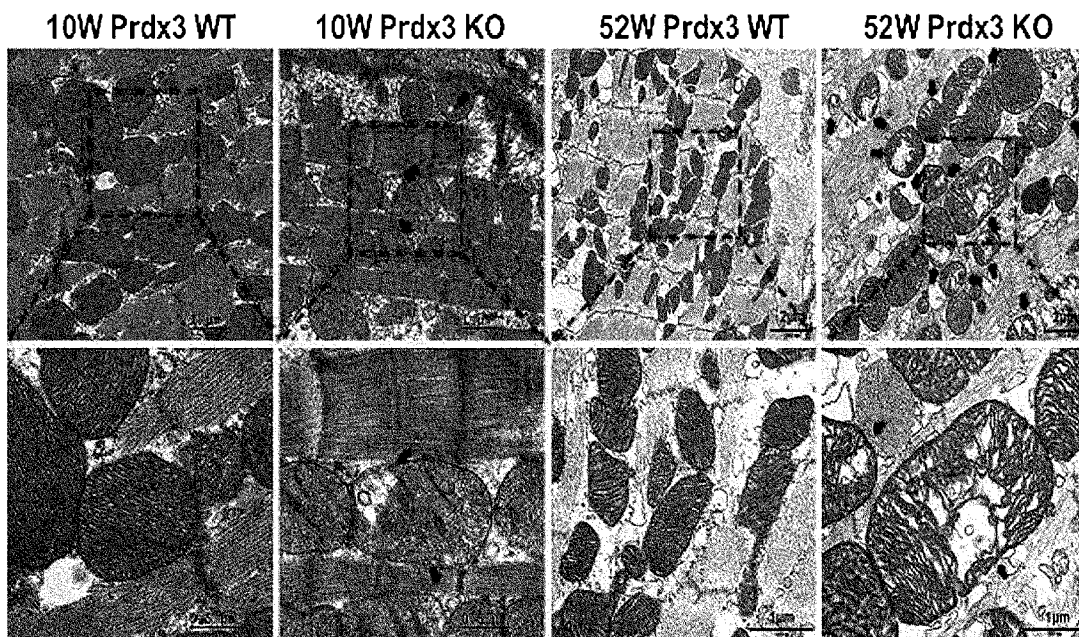
[도 1h]



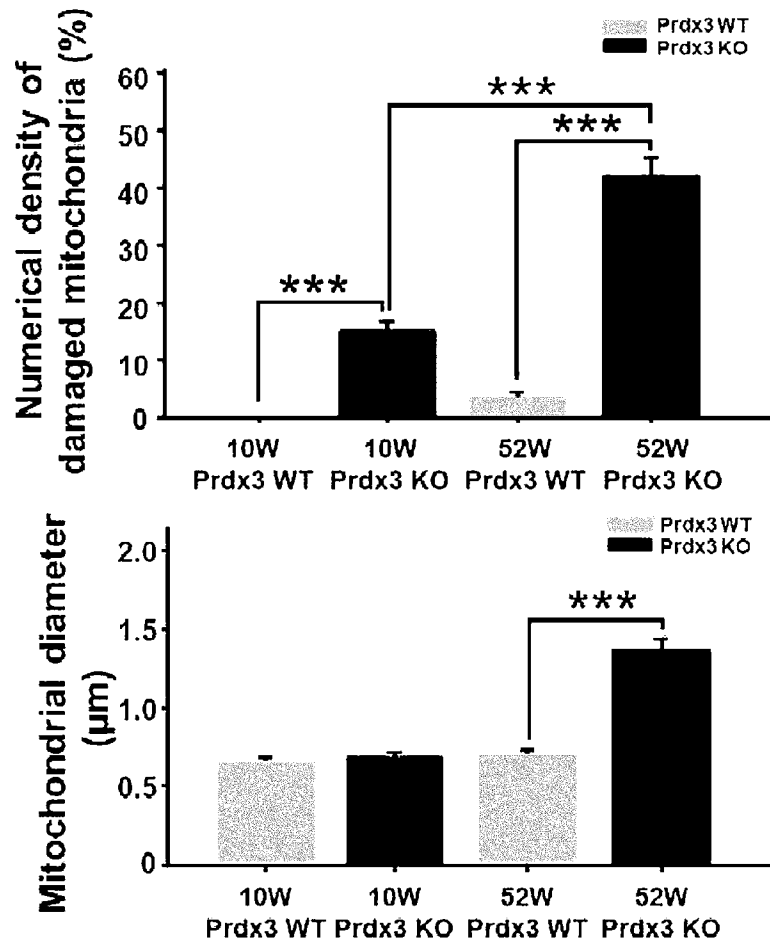
[도 1i]



[도 1j]



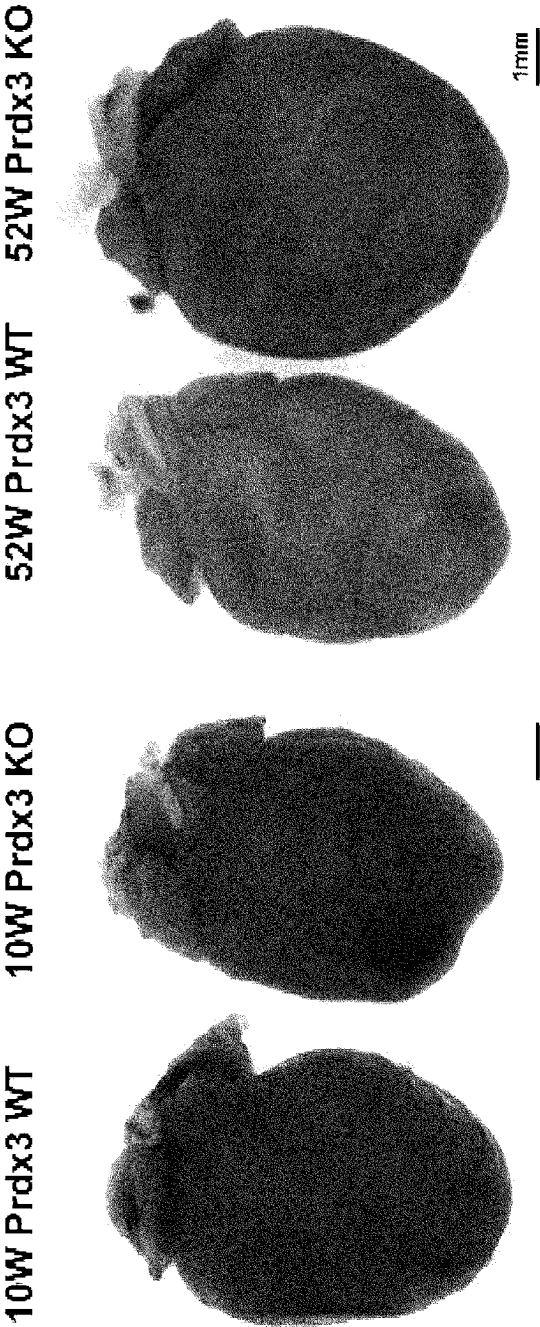
[도 1k]



[도2a]

10 Week				49~55 Week			
	Prdx3 WT	Prdx3 KO	p Value	Prdx3 WT	Prdx3 KO	p Value	
Animals, n	6	6		10	6		
Heart rate	509.33±5.8	558.83±6.5	NS	474.6±8.8	439.82±7.8	NS	
EF (%)	71.39±3.0	69.66±3.2	NS	70.68±2.5	64.91±3.5	NS (0.0617)	
SV (μl)	45.67±2.6	39.54±2.6	0.0368	50.56±3.9	38.79±3.1	0.0118	
FS (%)	40.3±2.7	38.75±3.0	NS	39.71±2.3	35.13±3.0	NS	
CO (ml/min)	23.21±1.6	22.11±2.1	NS	24.05±2.7	16.94±1.9	0.0019	

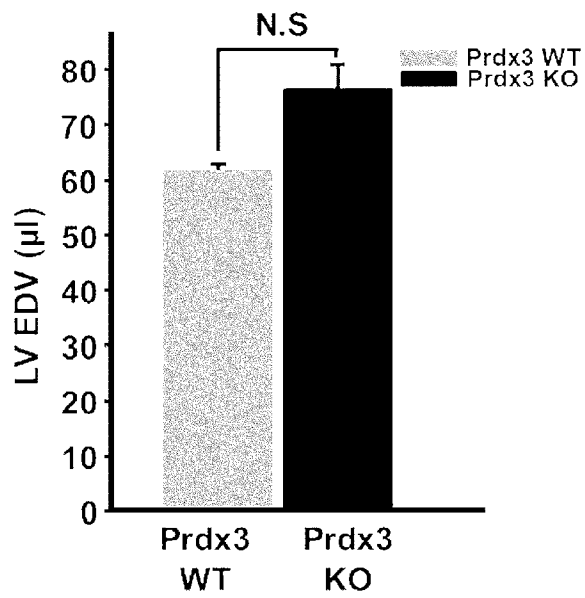
[도2b]



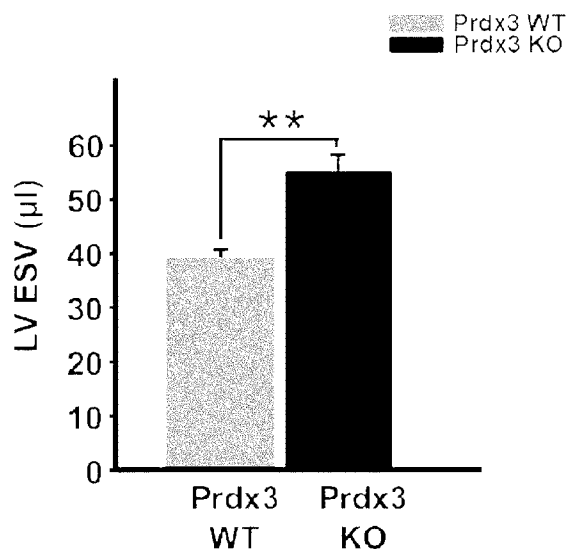
[도3a]



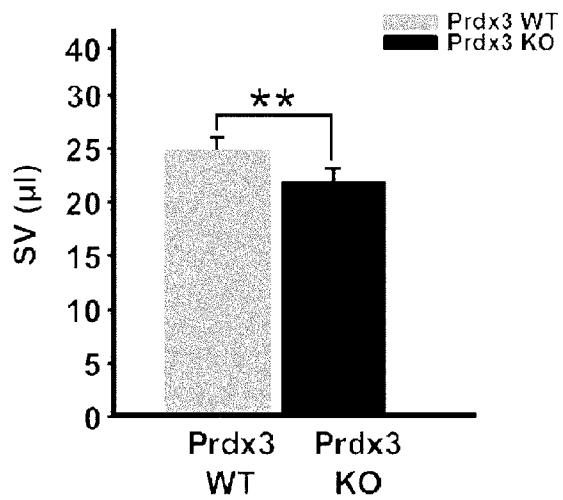
[도3b]



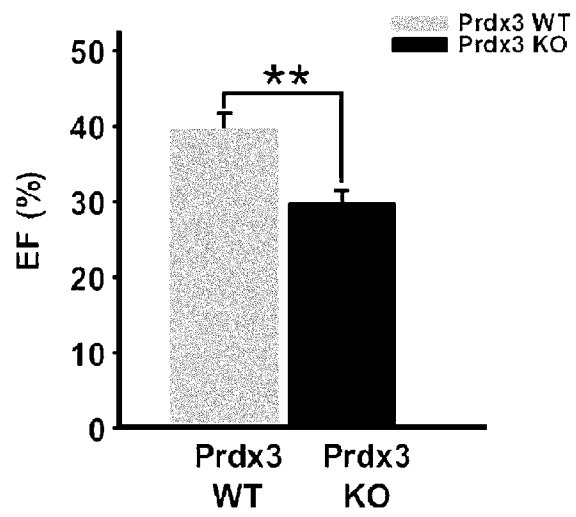
[도3c]



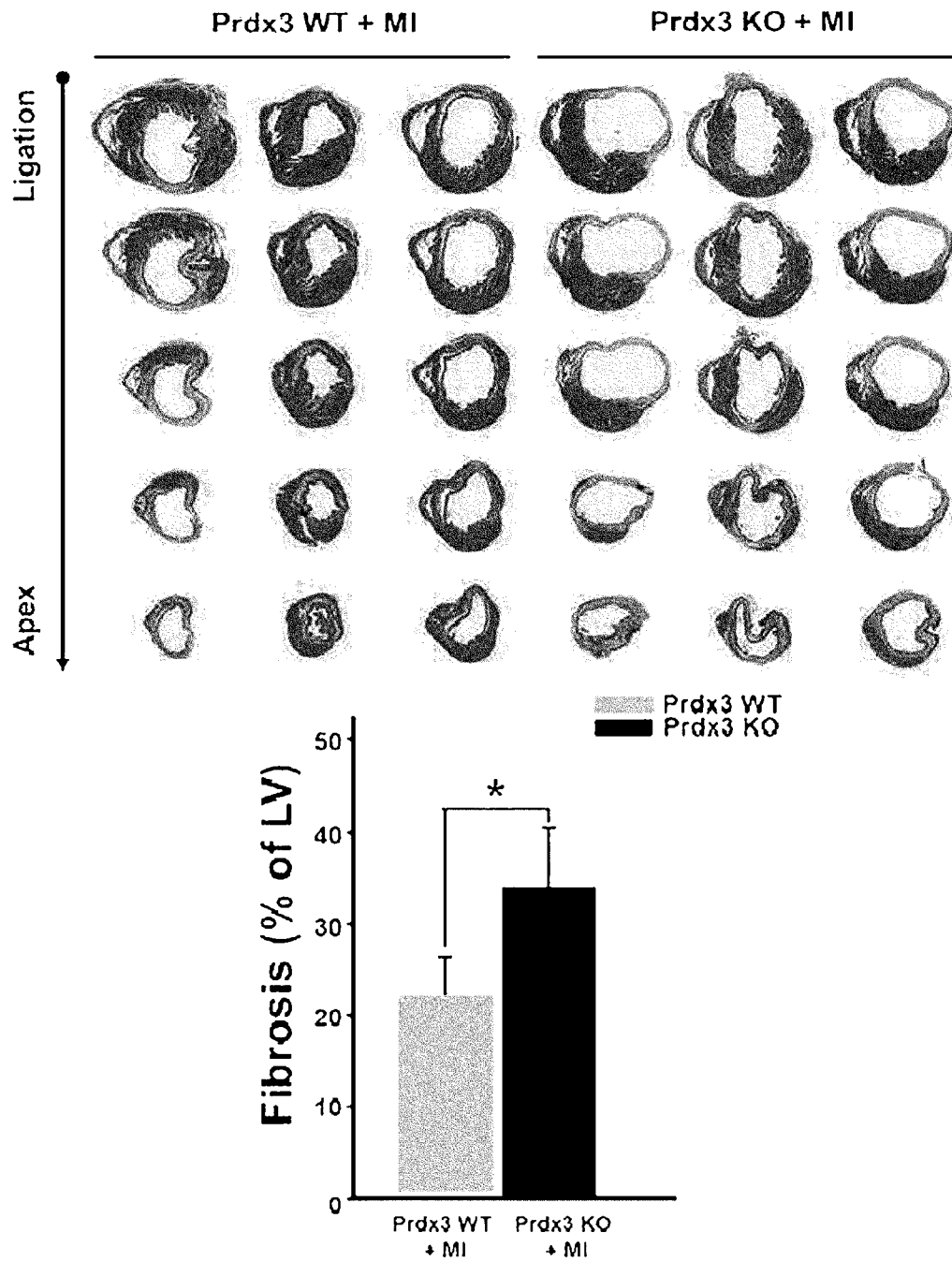
[도3d]



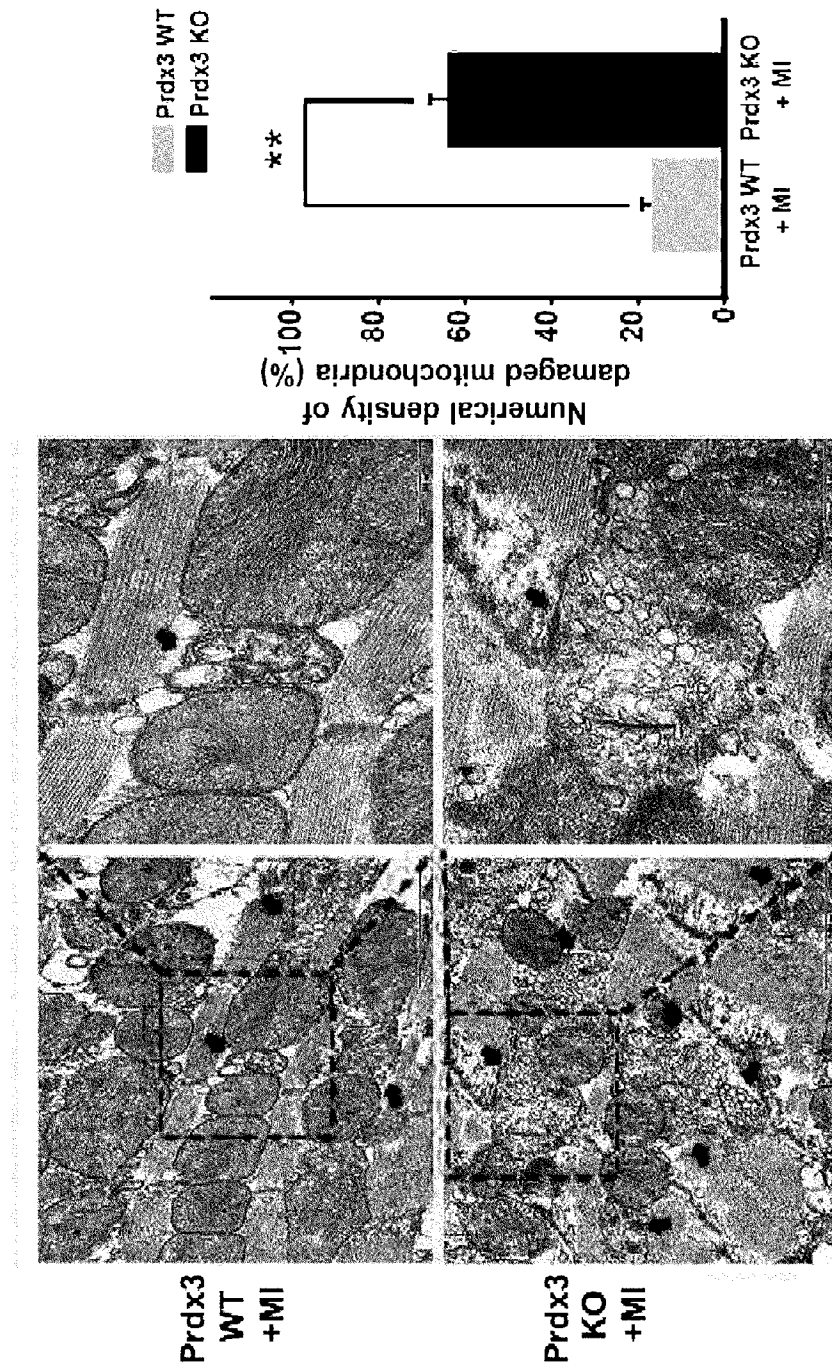
[도3e]



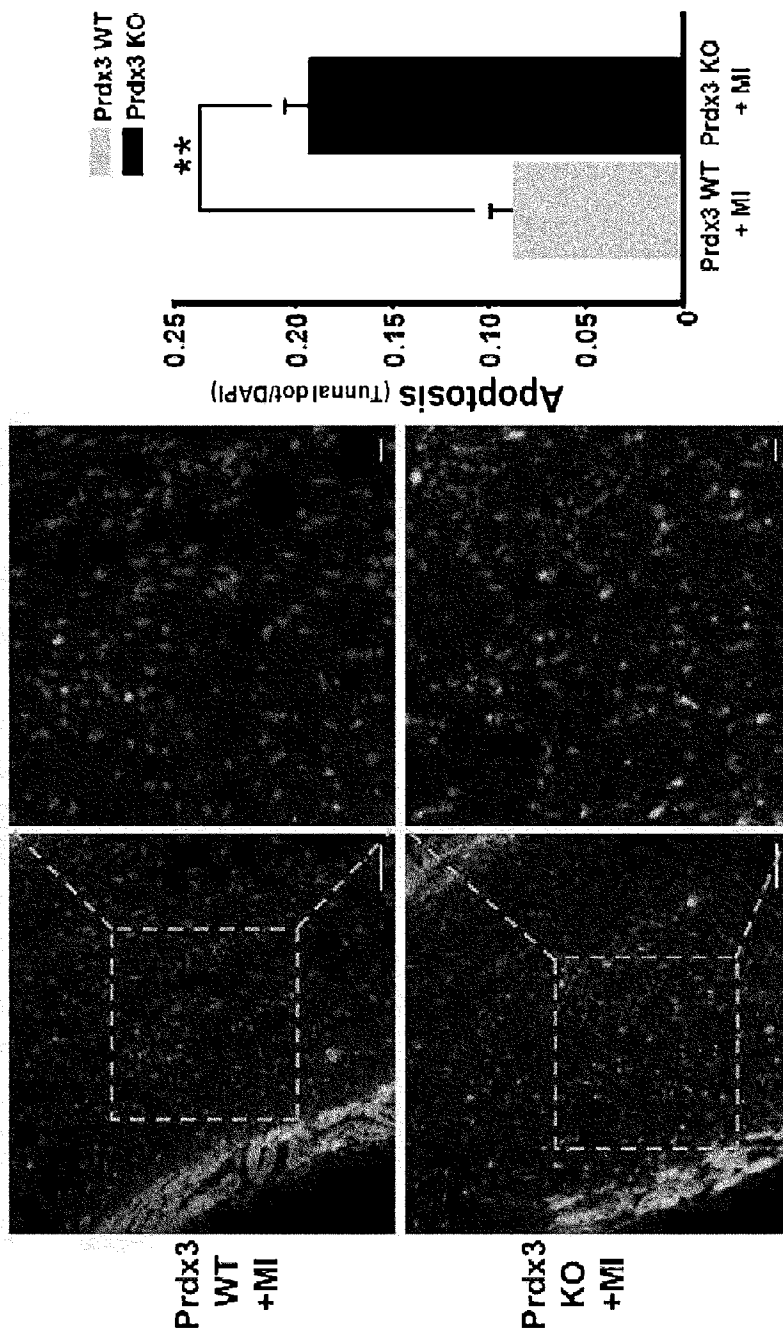
[도3f]



[도3g]



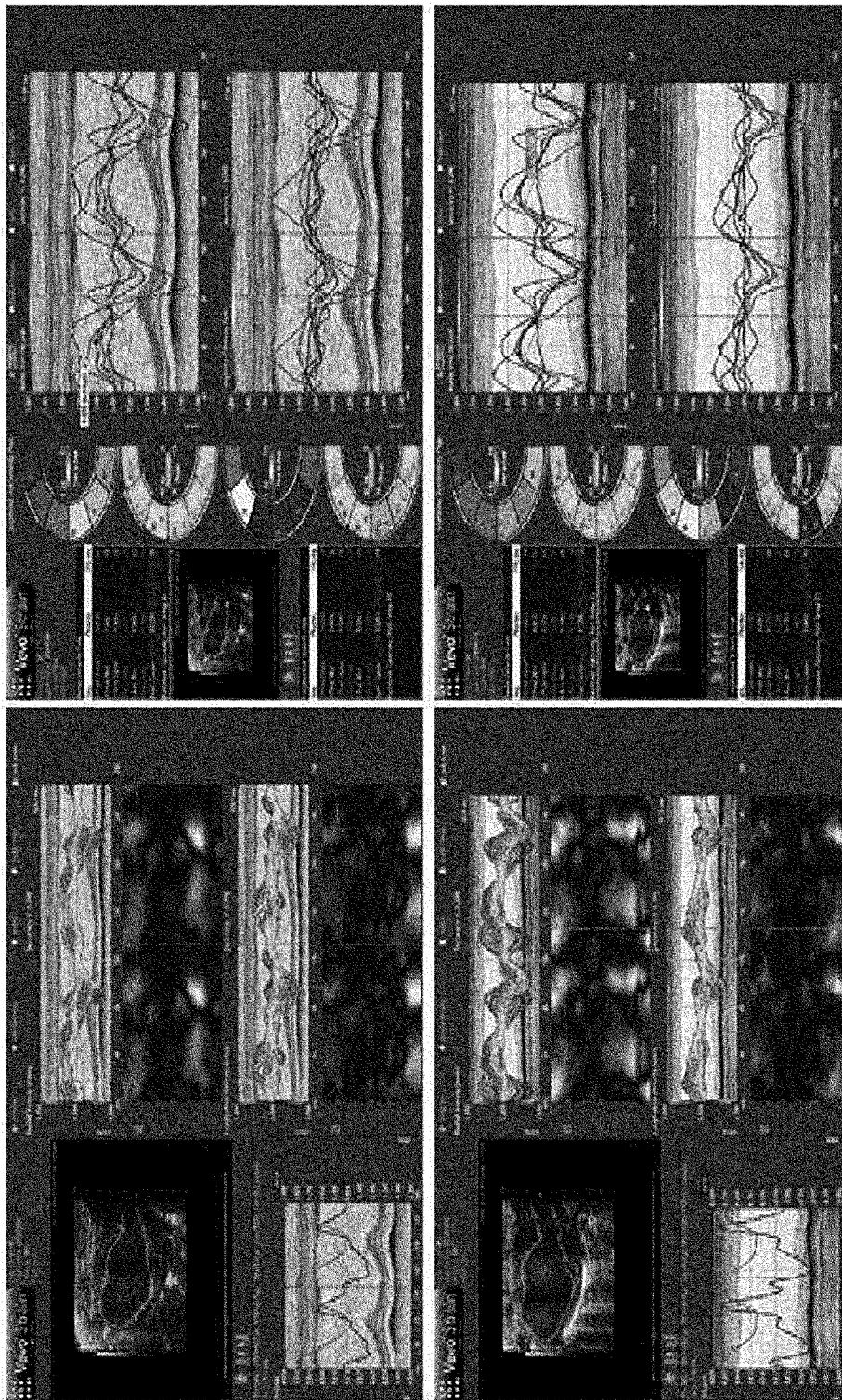
[도3h]



[Table 4a]

	Baseline			Post-MI		
	Prdx3 WT	Prdx3 KO	p Value	Prdx3 WT	Prdx3 KO	p Value
Animals, n	7	8		7	8	
Heart rate	457±2.1	458±1.9	NS	462±7	443±3.3	NS
EF (%)	48.3±4.0	47.0±4.0	NS	39.4±4.2	30.1±3.9	0.0037
EDV (μl)	70.0±16.5	58.5±3.3	NS	62.4±6.4	74.2±5.2	NS
ESV (μl)	35.8±7.6	31.4±3.5	NS	37.7±4.7	52.3±6.0	0.0093
SV (μl)	34.2±9.9	27.7±2.0	NS	24.7±3.6	22.0±1.7	NS
FS (%)	27.8±3.0	26.9±2.9	NS	23.2±4.2	15.3±4.8	0.0059
CO (ml/min)	15.7±4.9	12.6±1.3	NS	11.4±1.5	9.7±1.0	0.0214

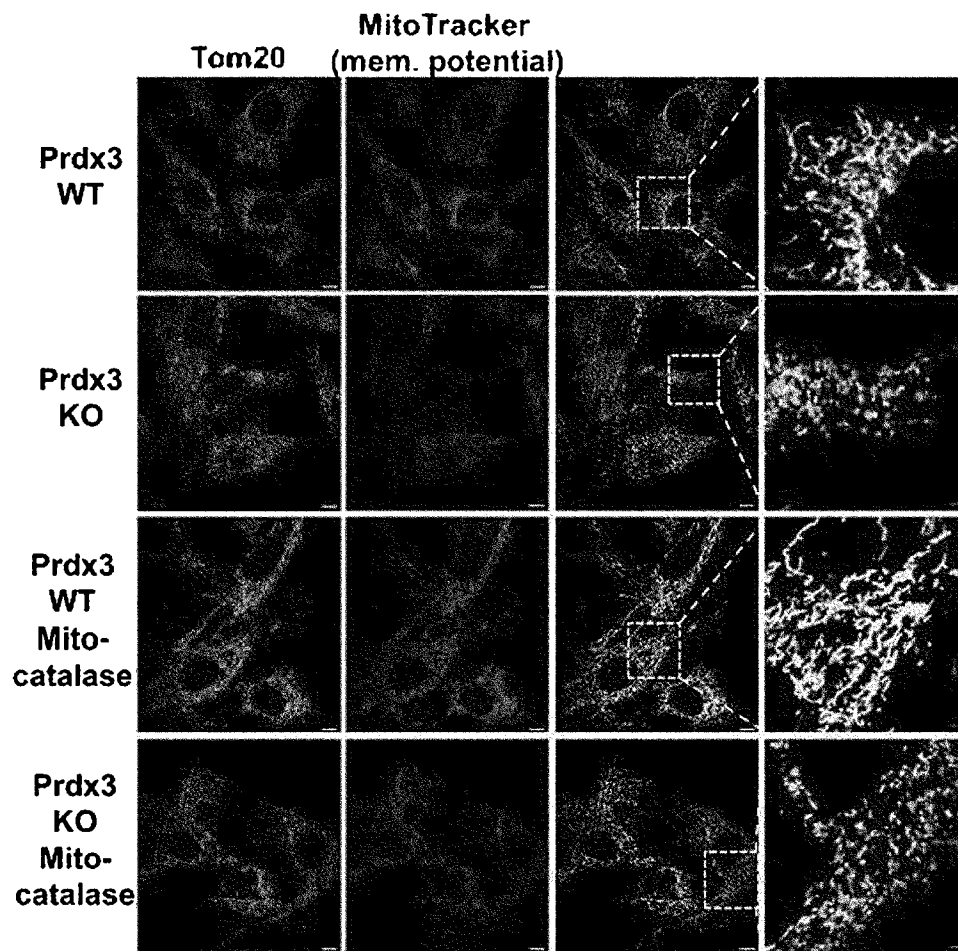
[도4b]



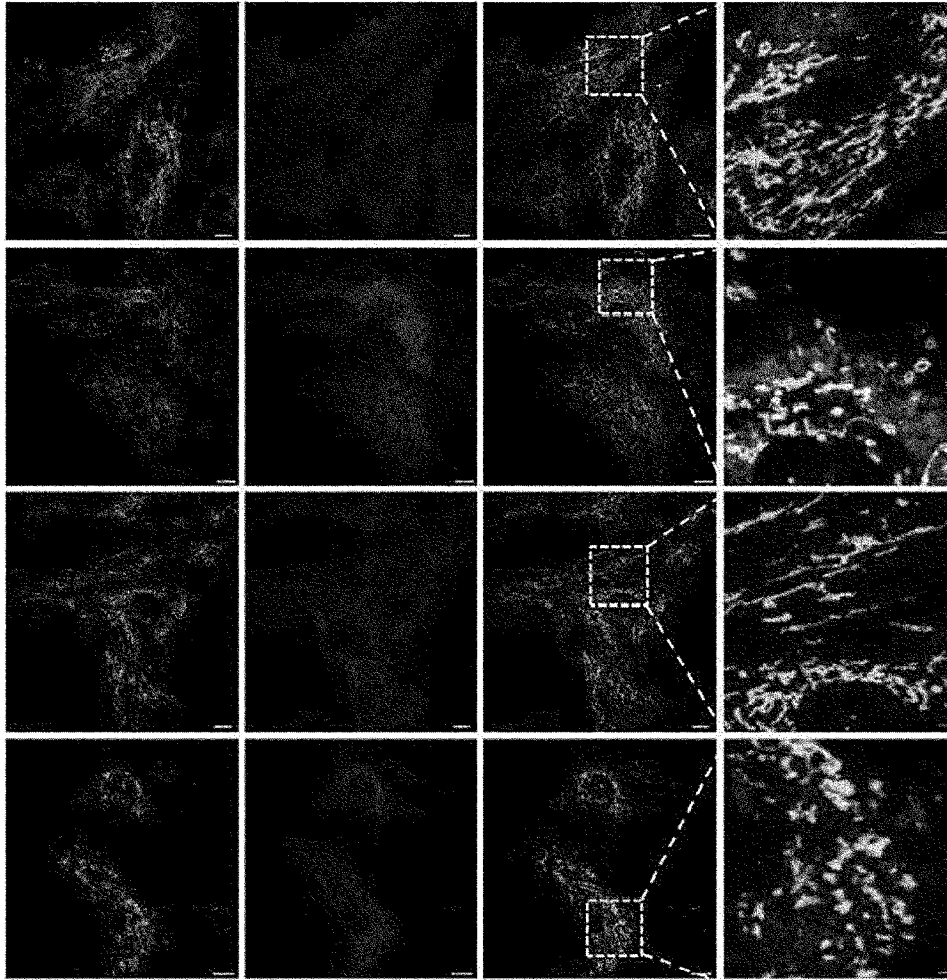
Prdx3 WT

Prdx3 KO

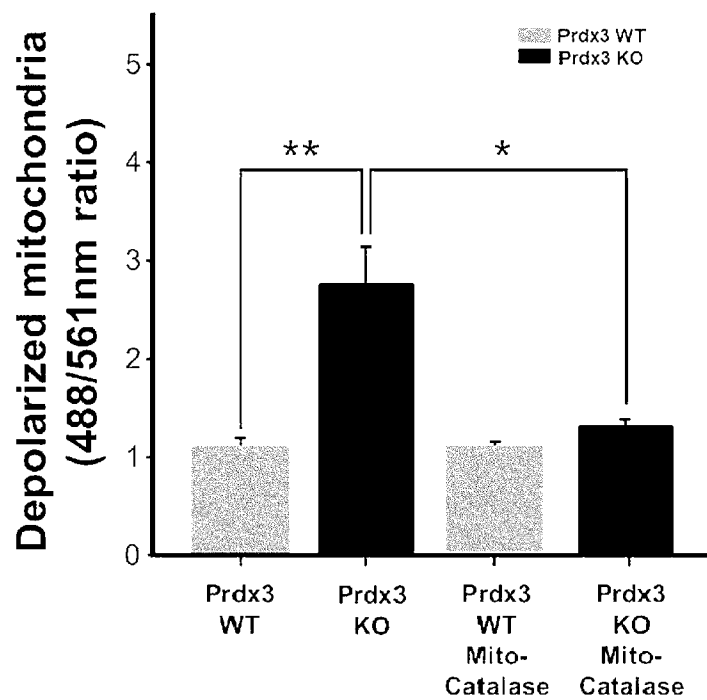
[도5a]



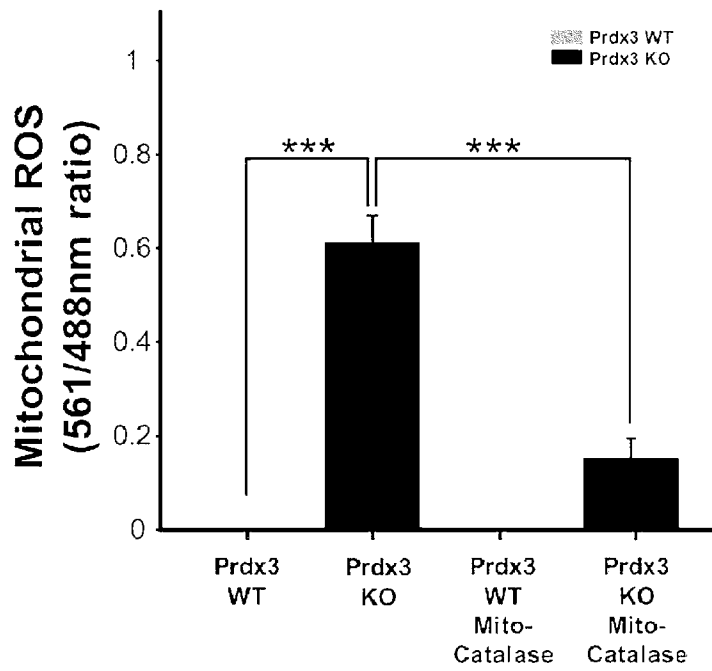
[도5b]

MitoTracker MitoSOX (ROS)

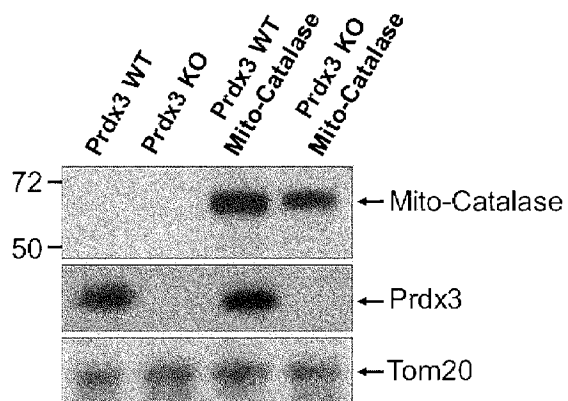
[도5c]



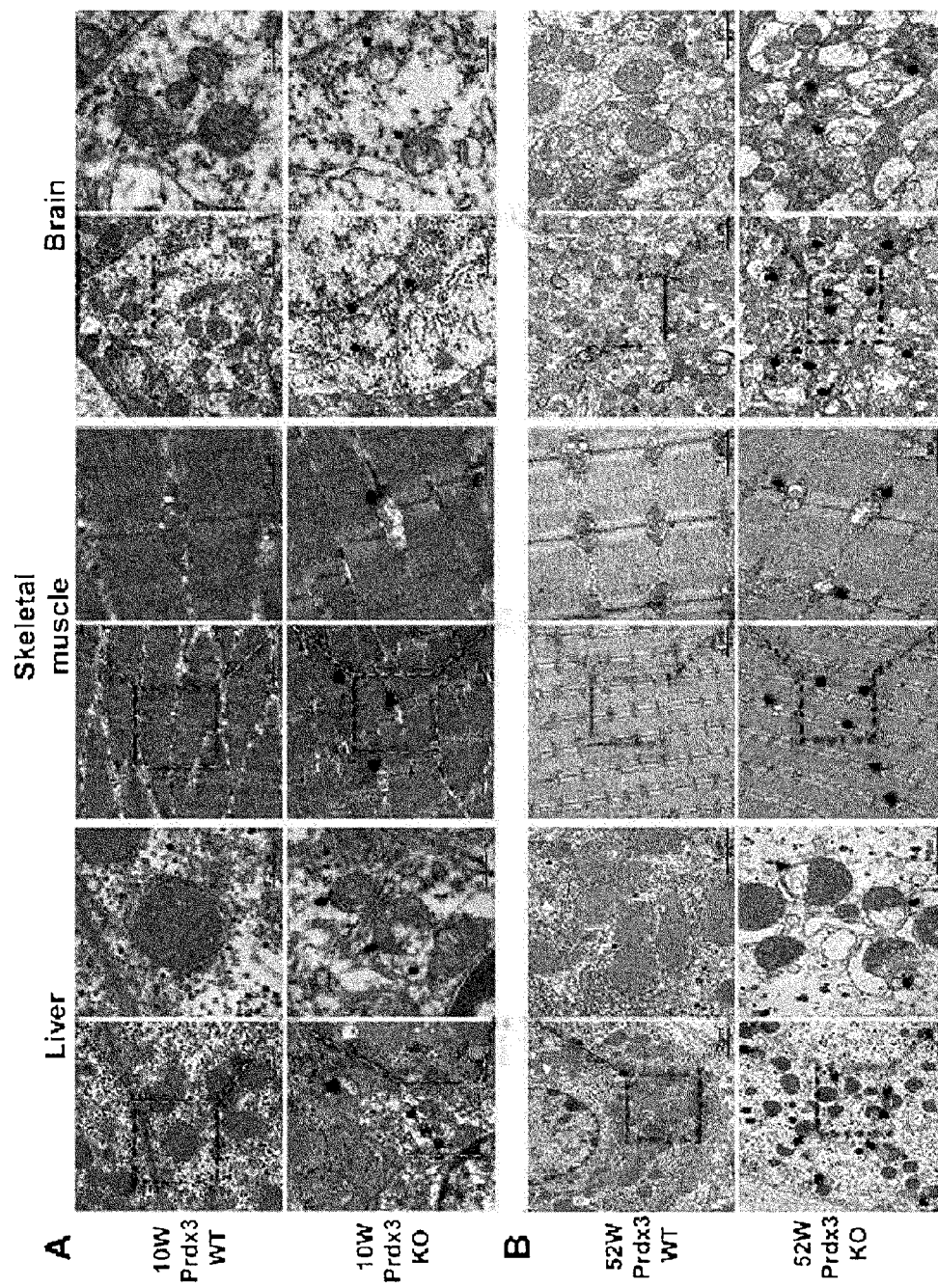
[도5d]



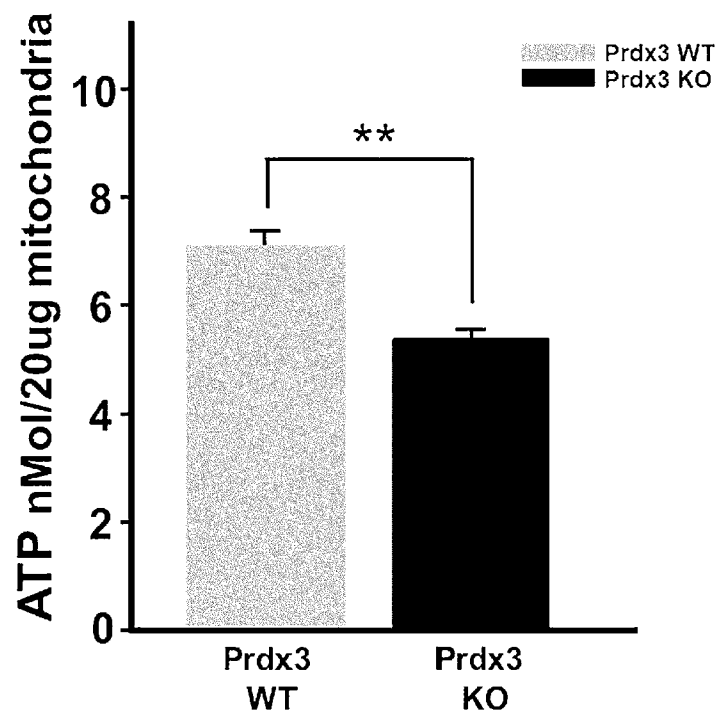
[도5e]



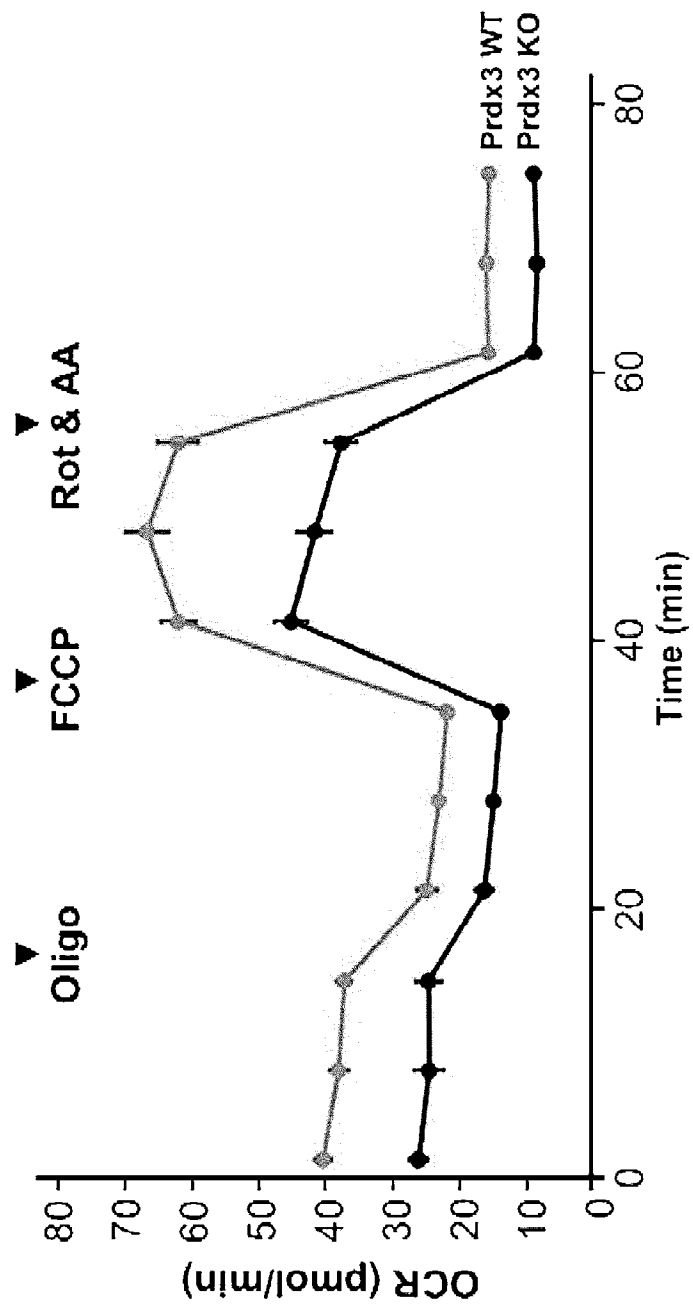
[도6]



[도7a]

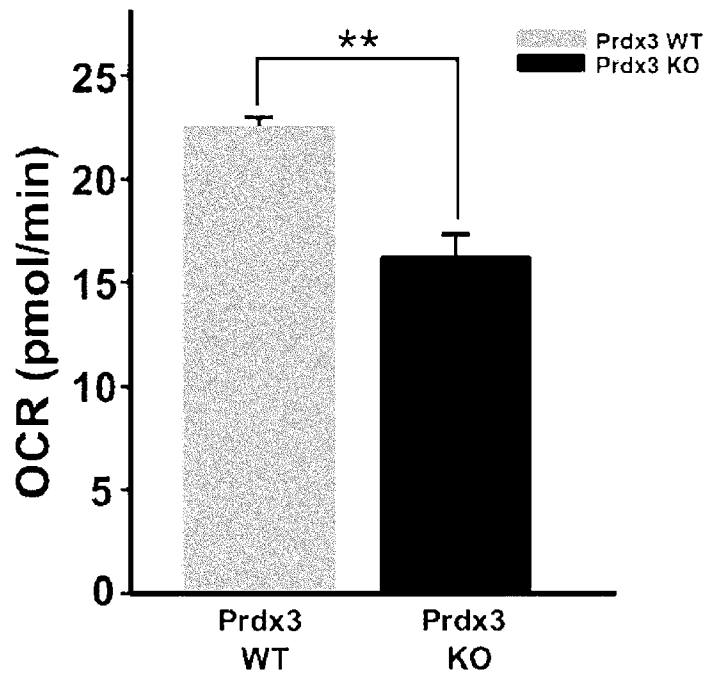


[도7b]



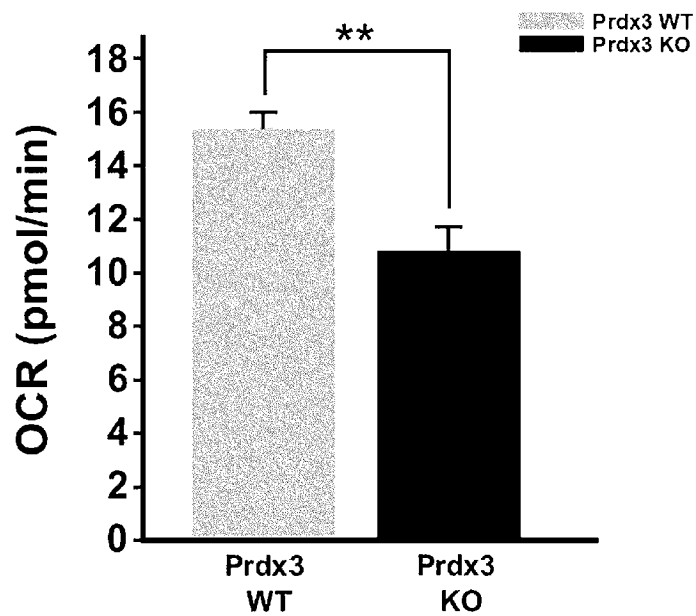
[도7c]

Basal Respiration

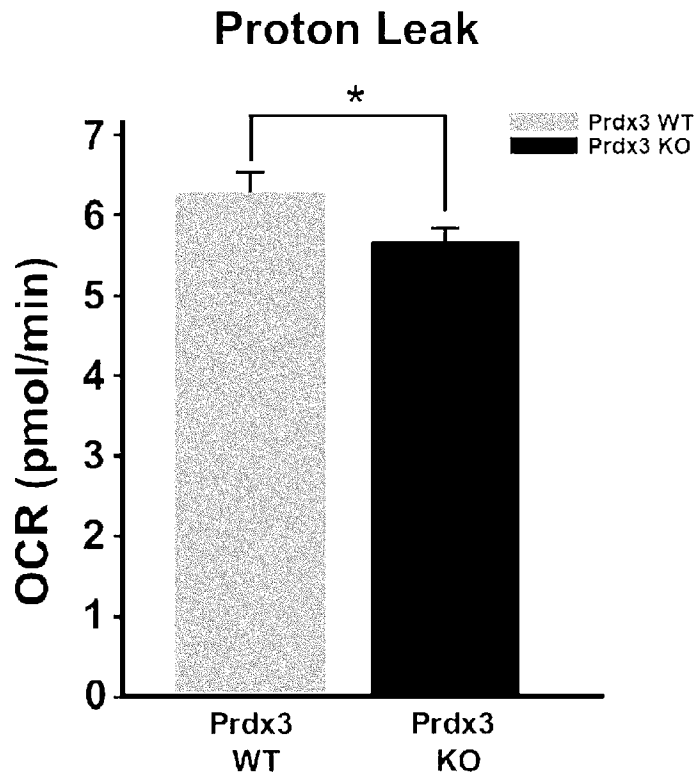


[도7d]

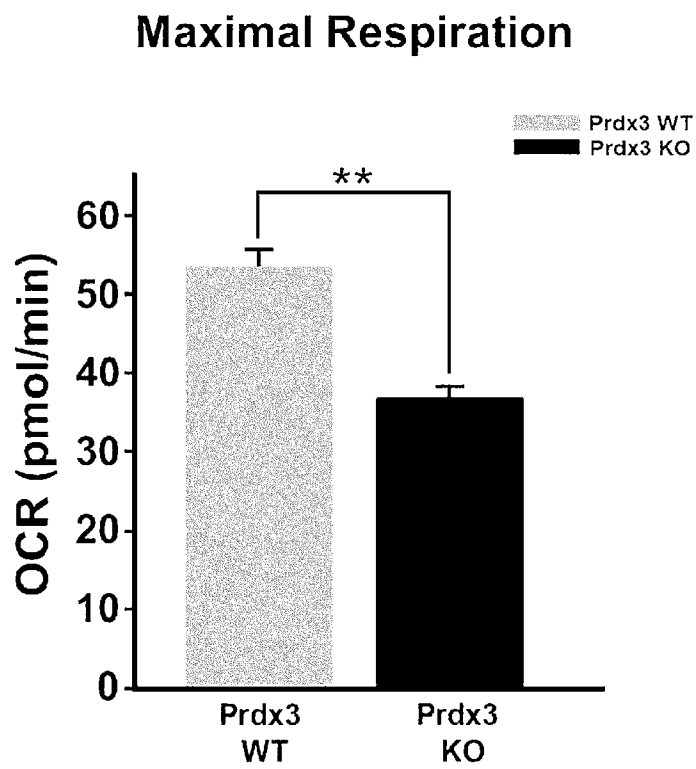
ATP linked Respiration



[도7e]

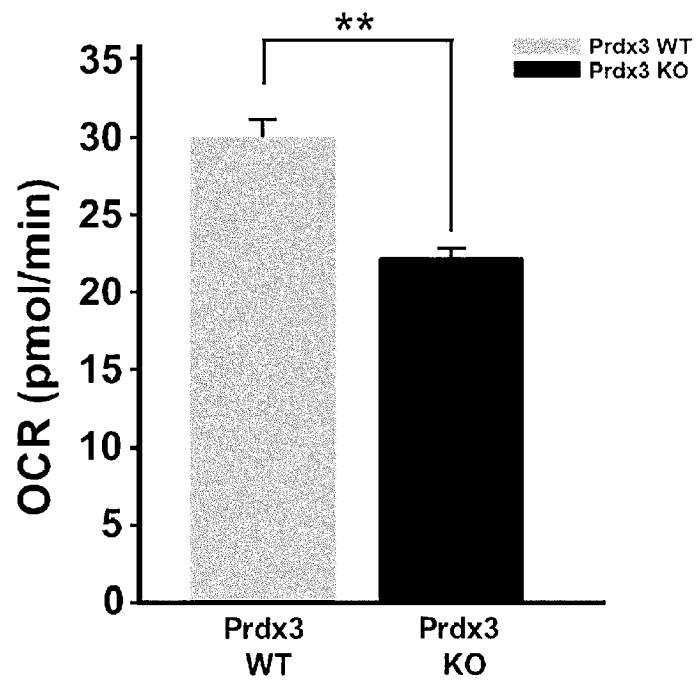


[도7f]

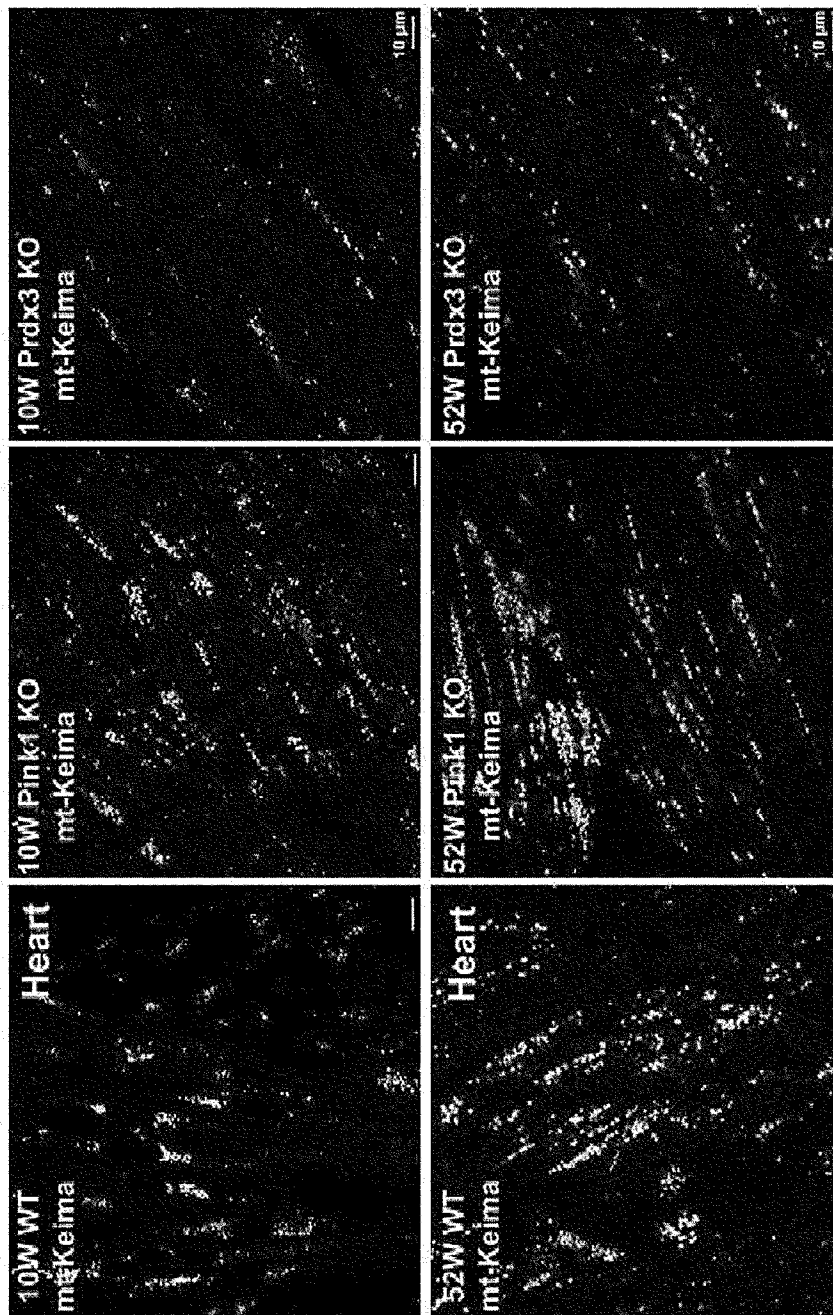


[도7g]

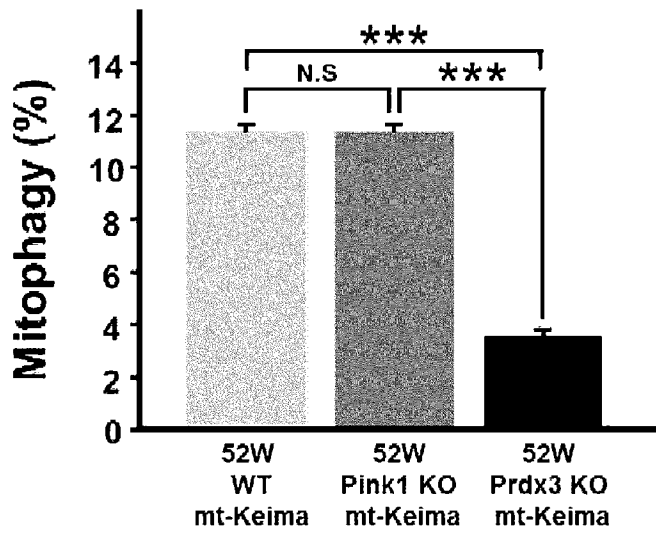
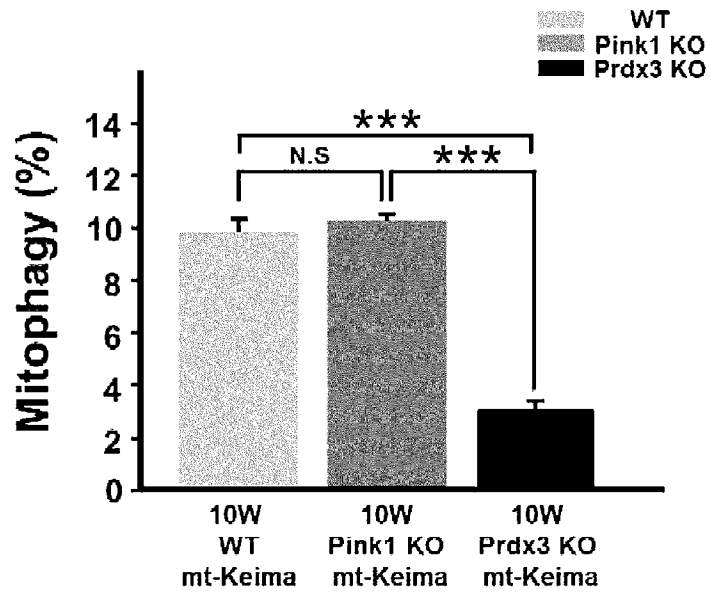
Spare Respiratory Capacity



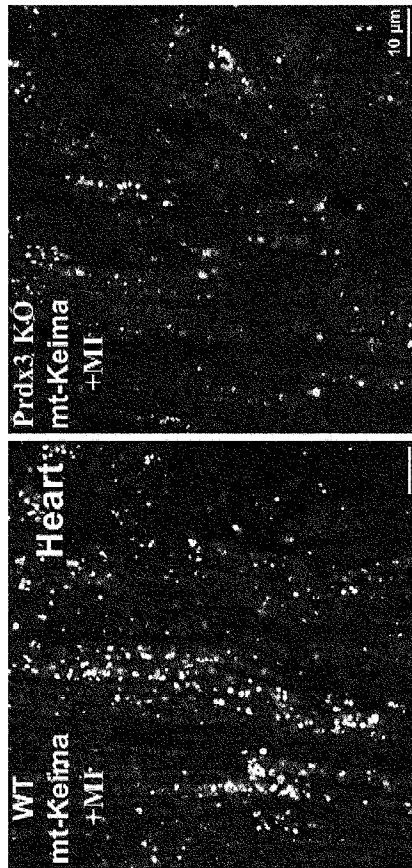
[도8a]



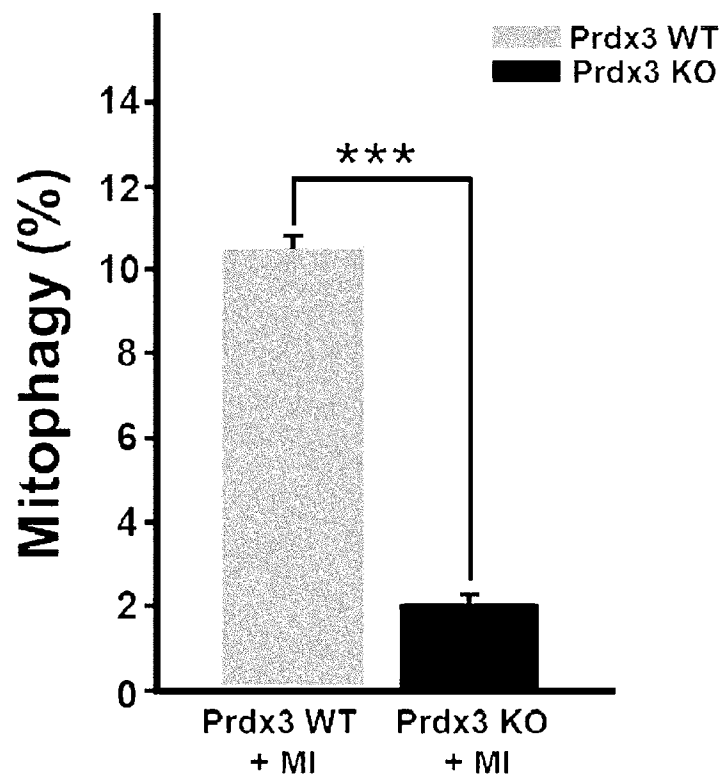
[도8b]



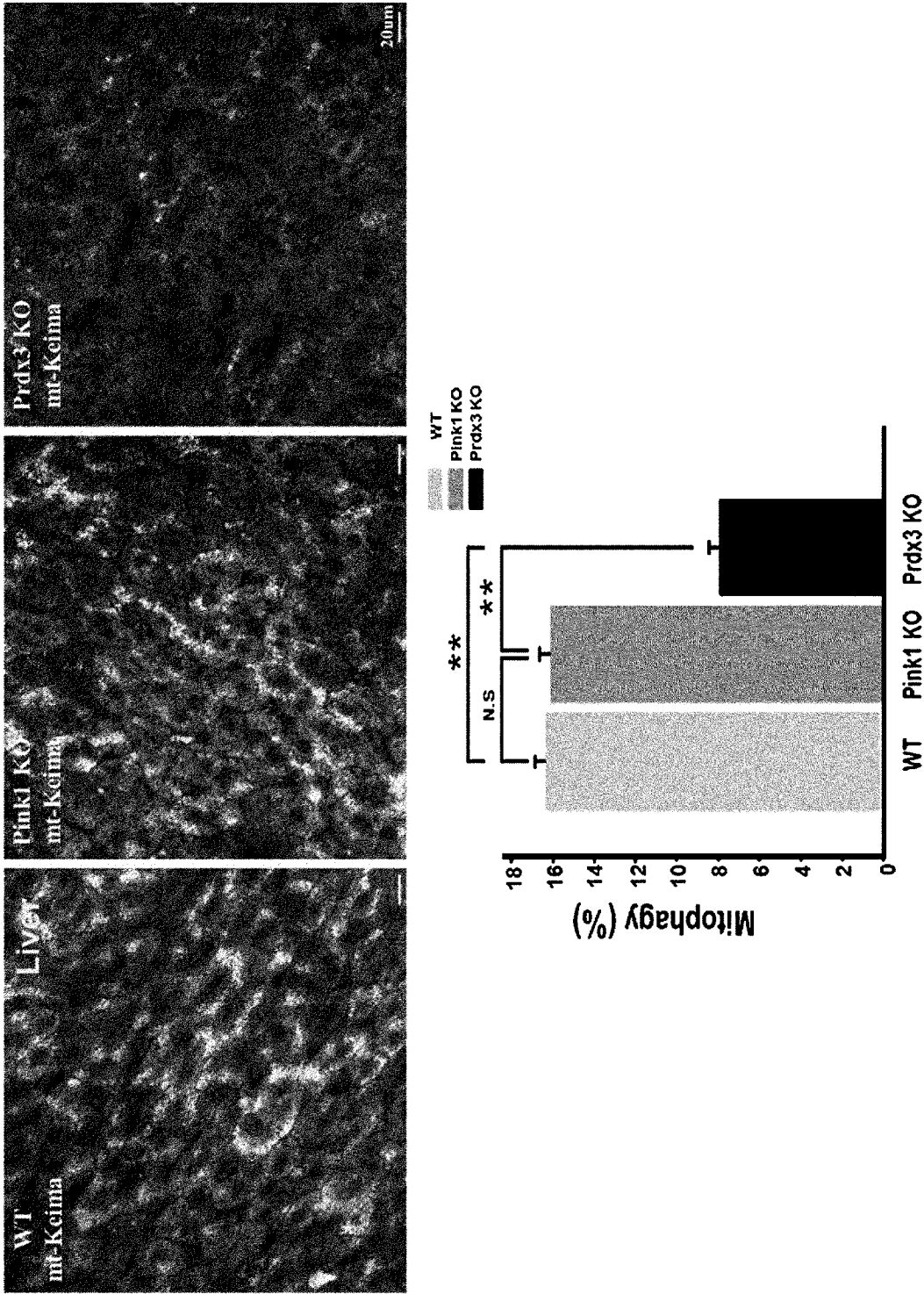
[도8c]



[도8d]



[도9a]

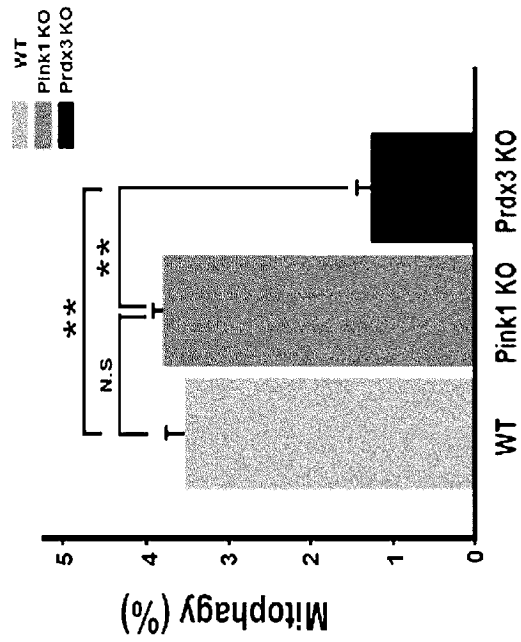


WT mt-Keima

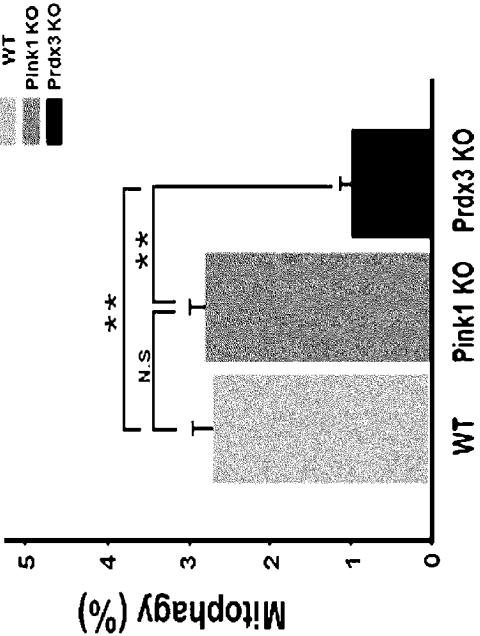
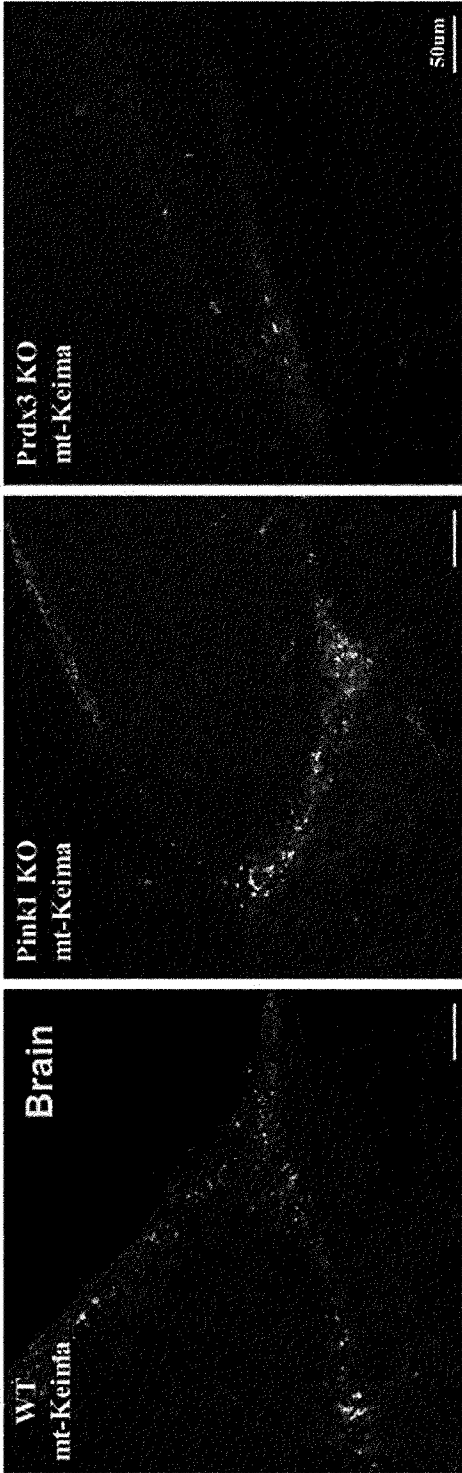
Pink1 KO mt-Keima

Prdx3 KO mt-Keima

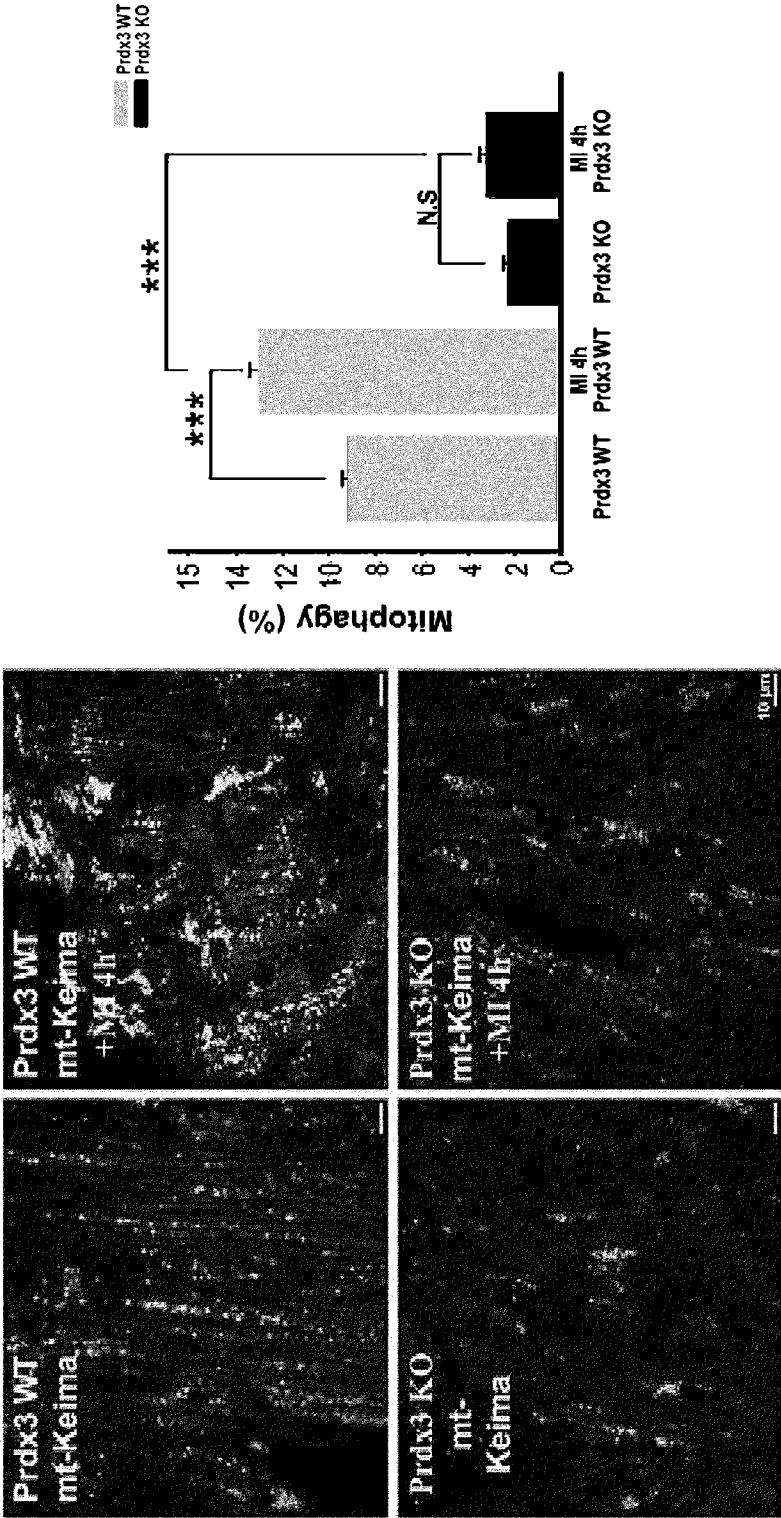
200 μ m



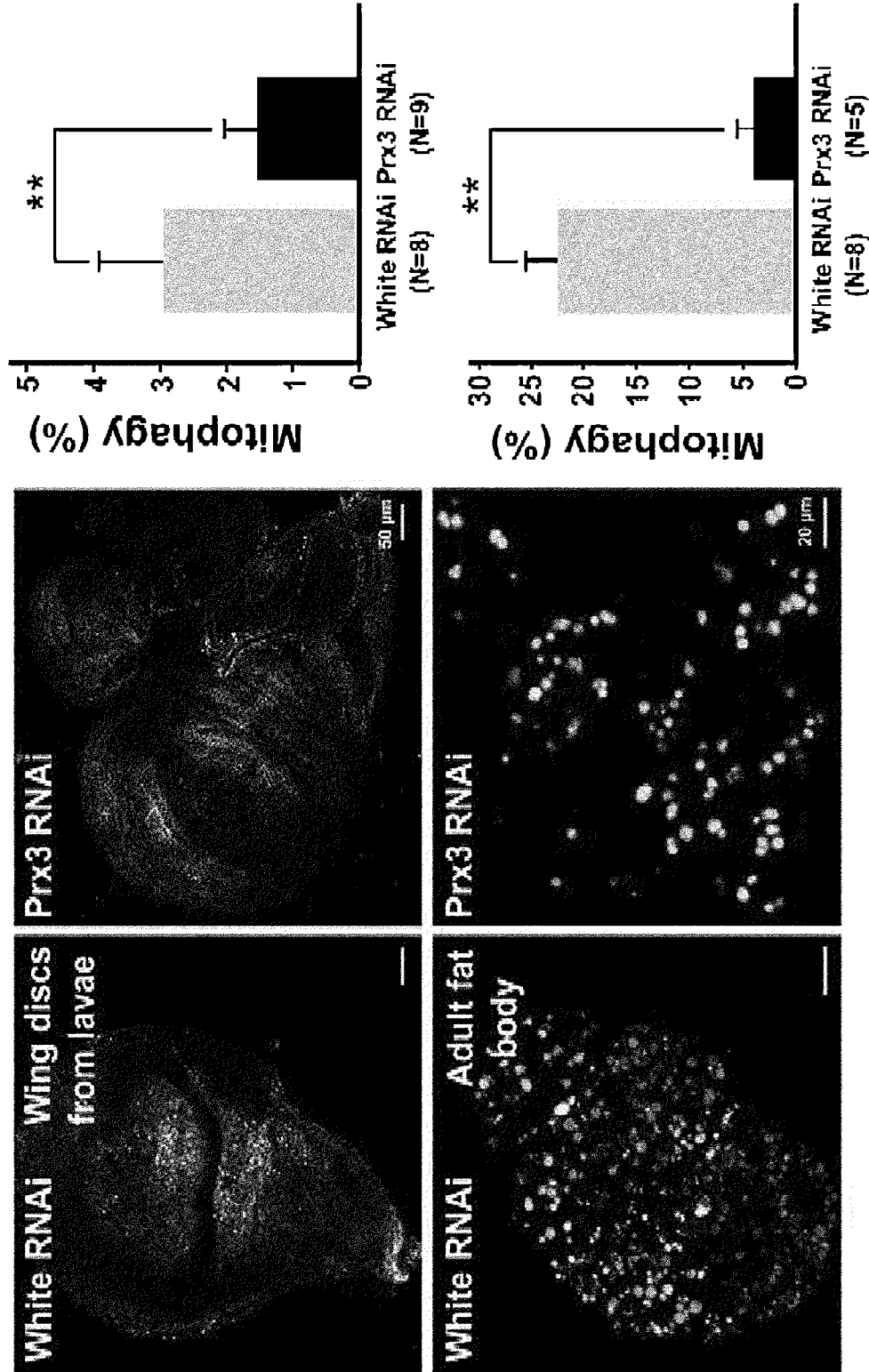
[도9c]



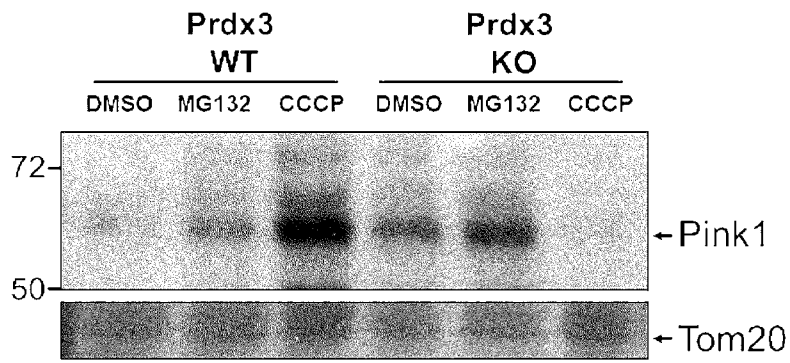
[p5d]



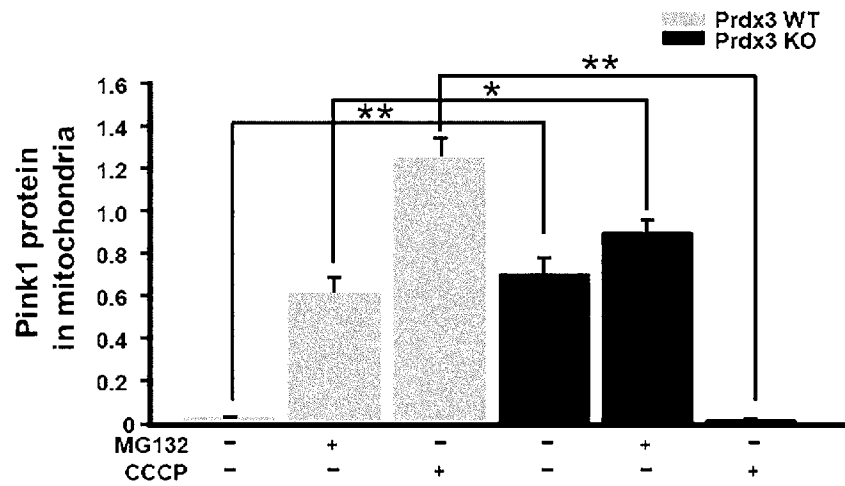
[도9e]



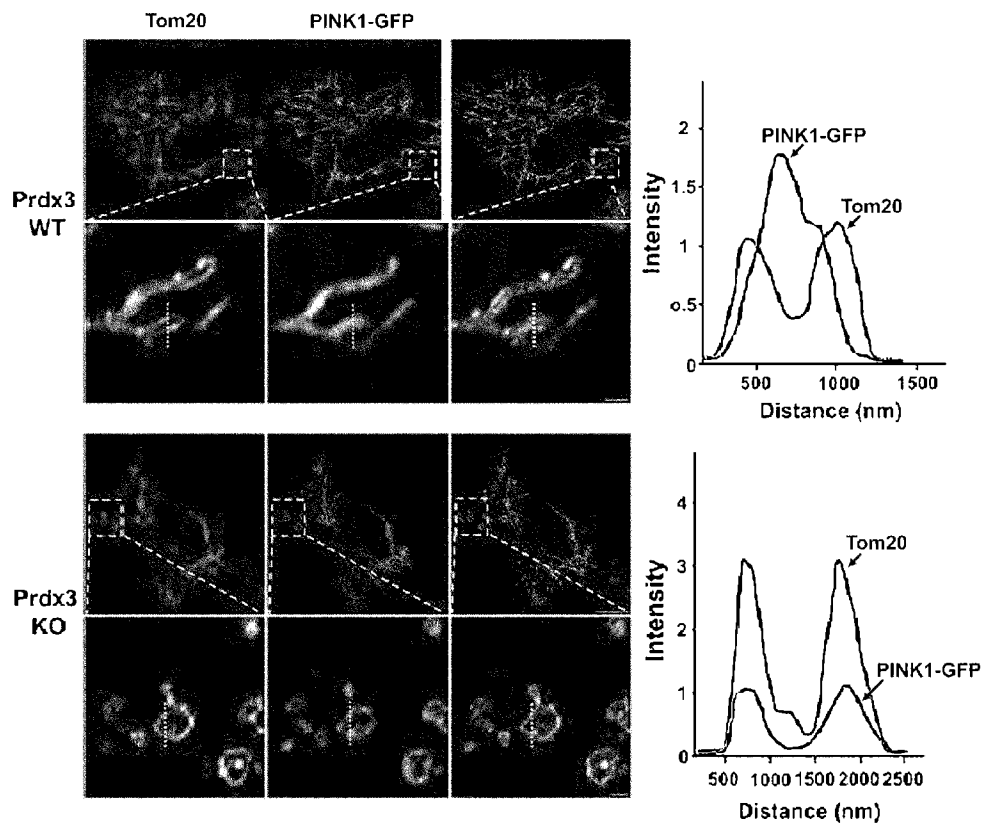
[도10a]



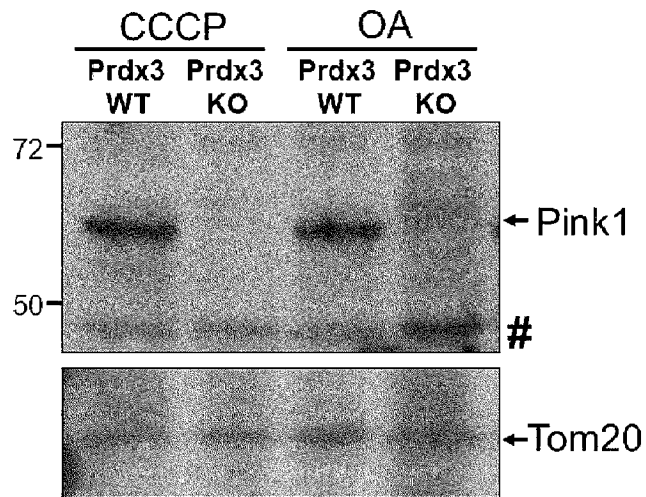
[도10b]



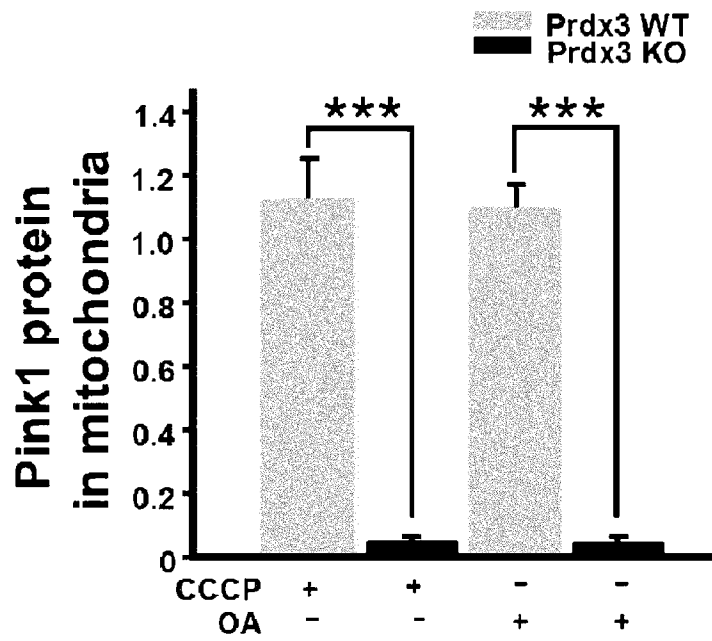
[도10c]



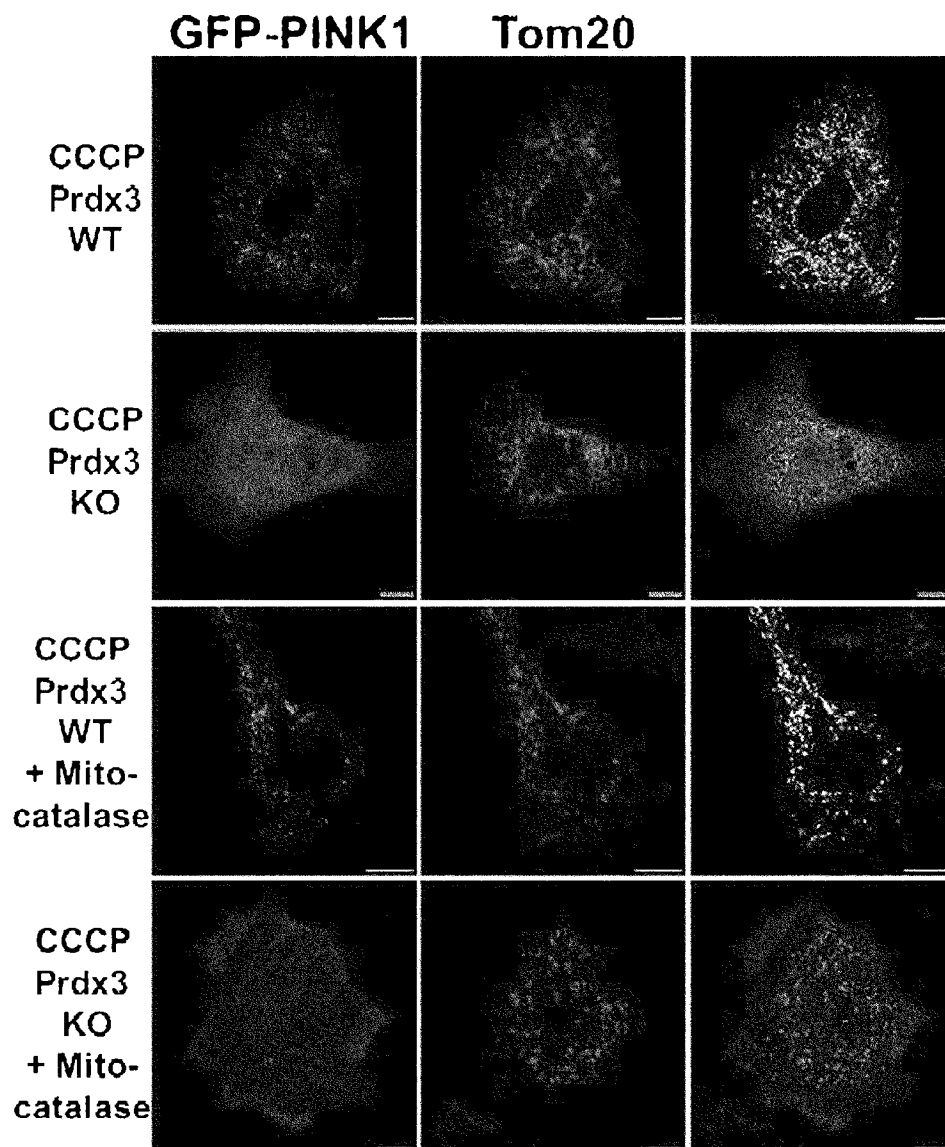
[도10d]



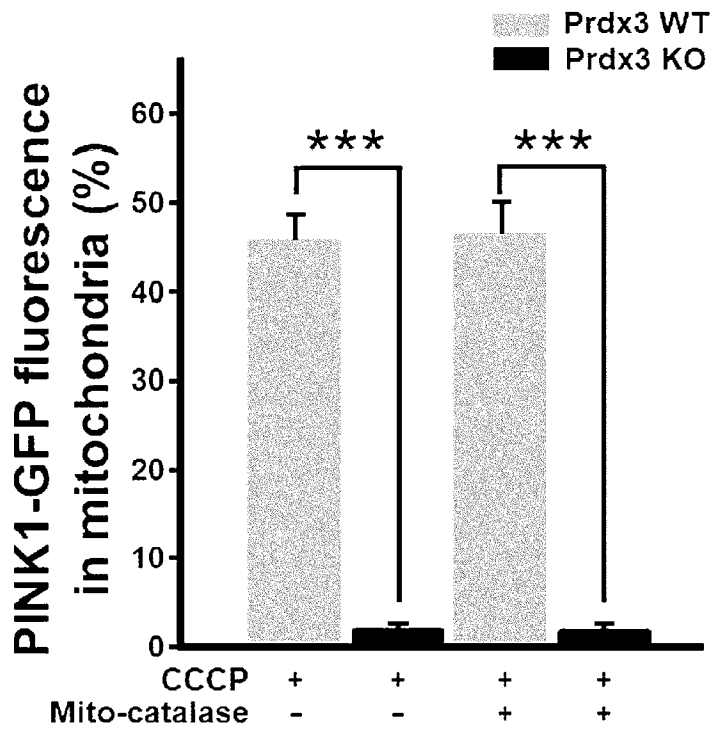
[도10e]



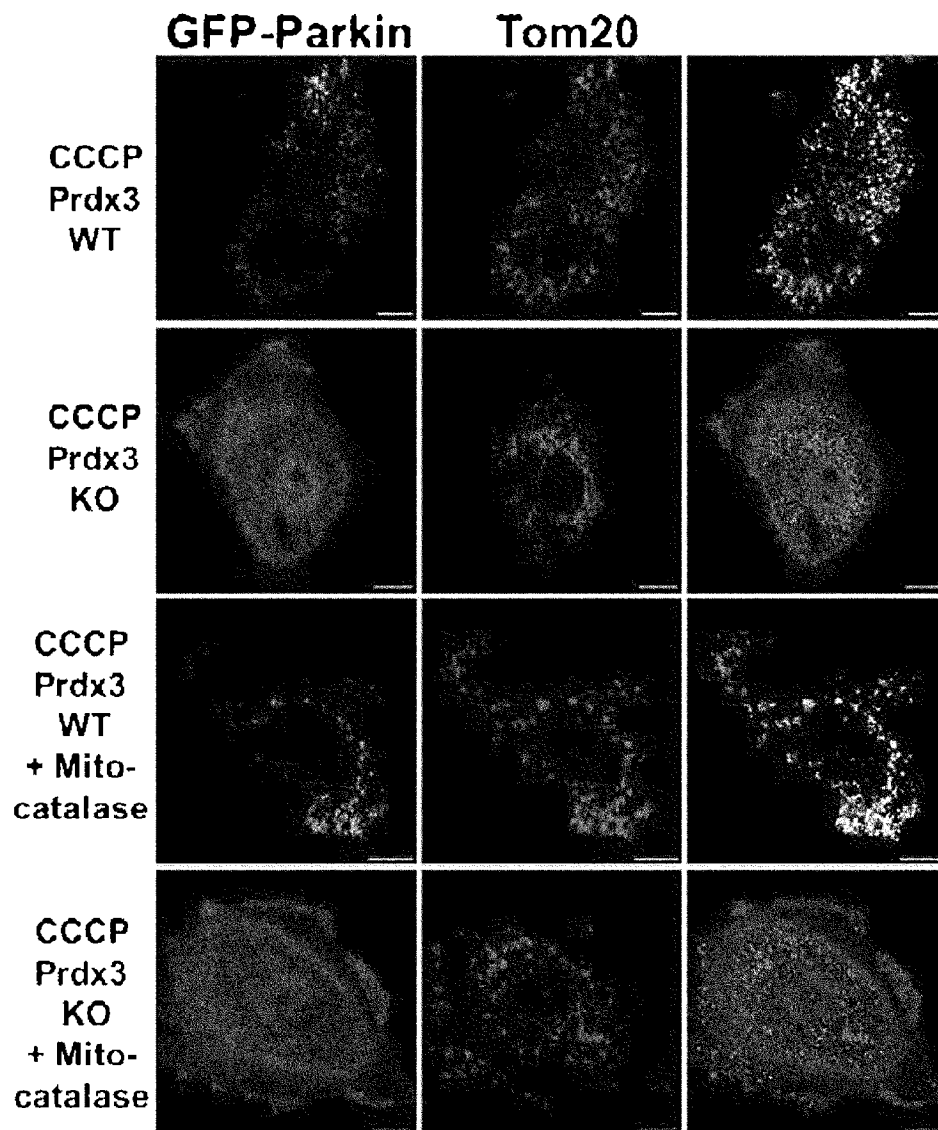
[도 10f]



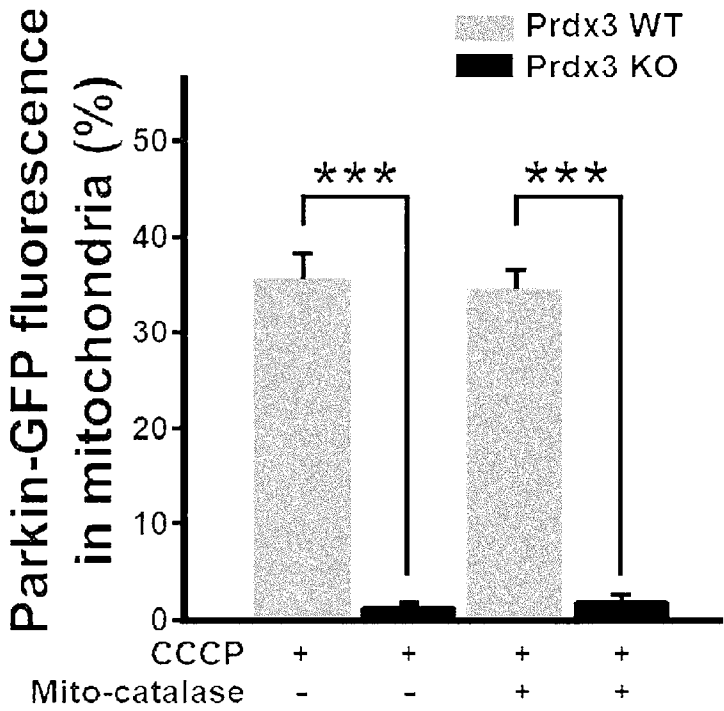
[도 10g]



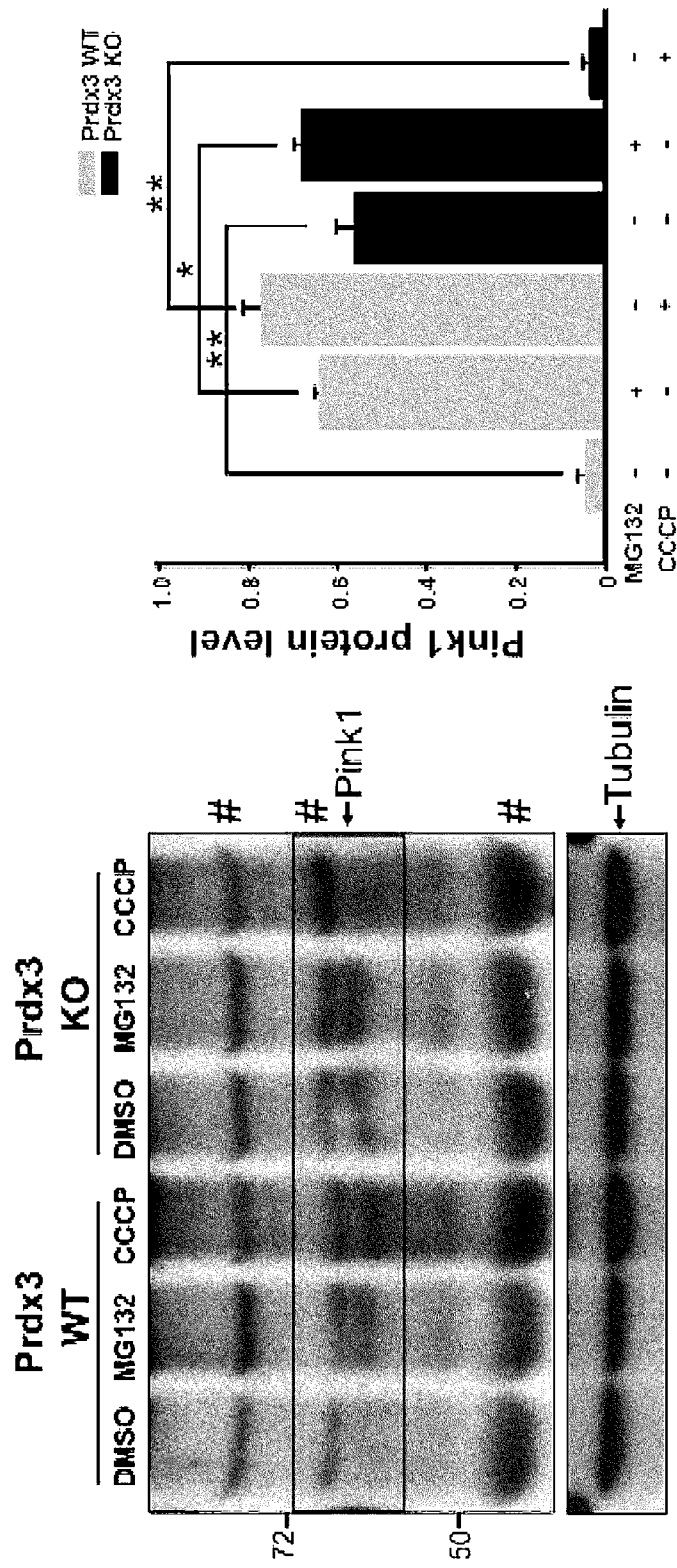
[도 10h]



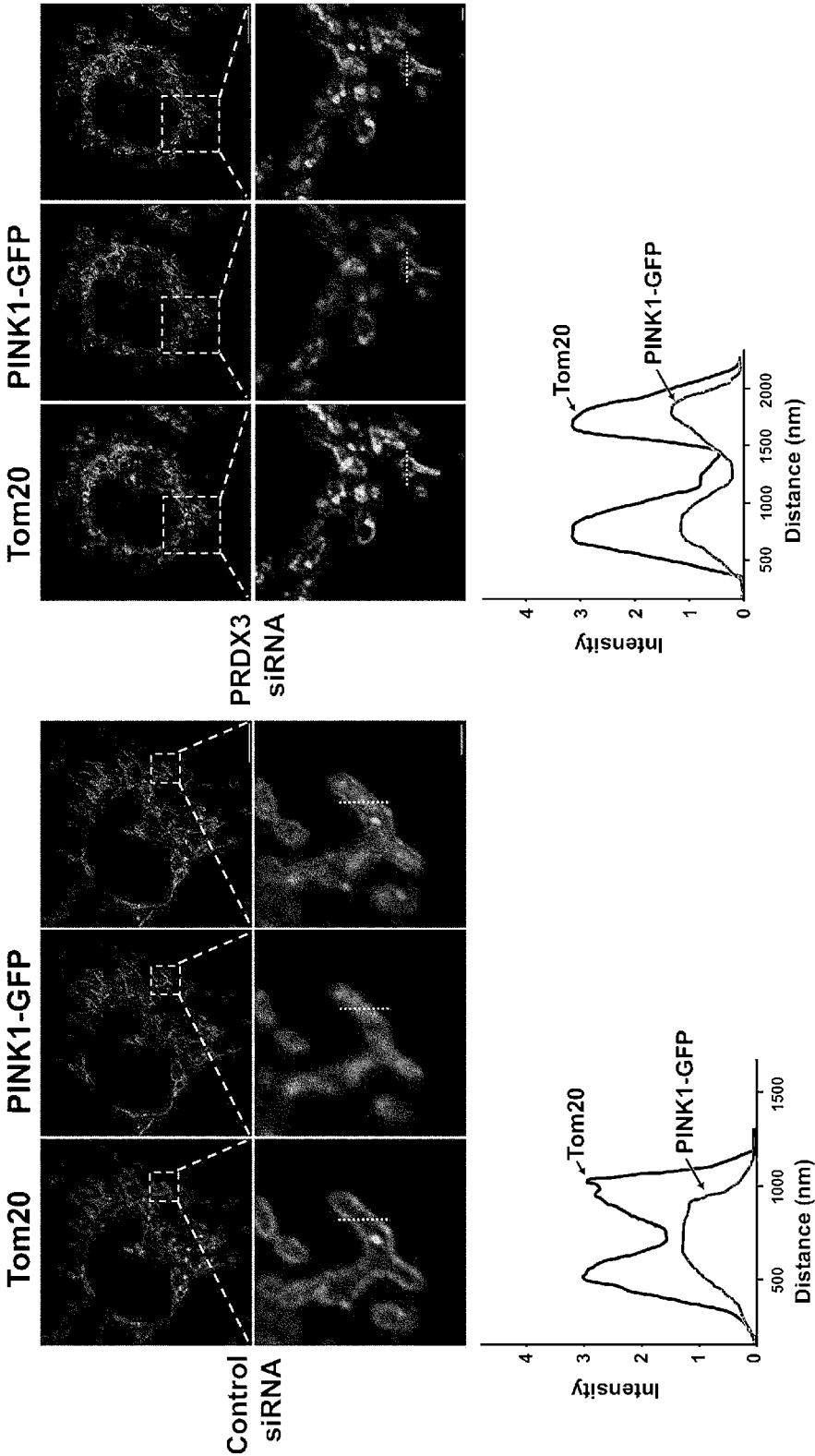
[도10i]



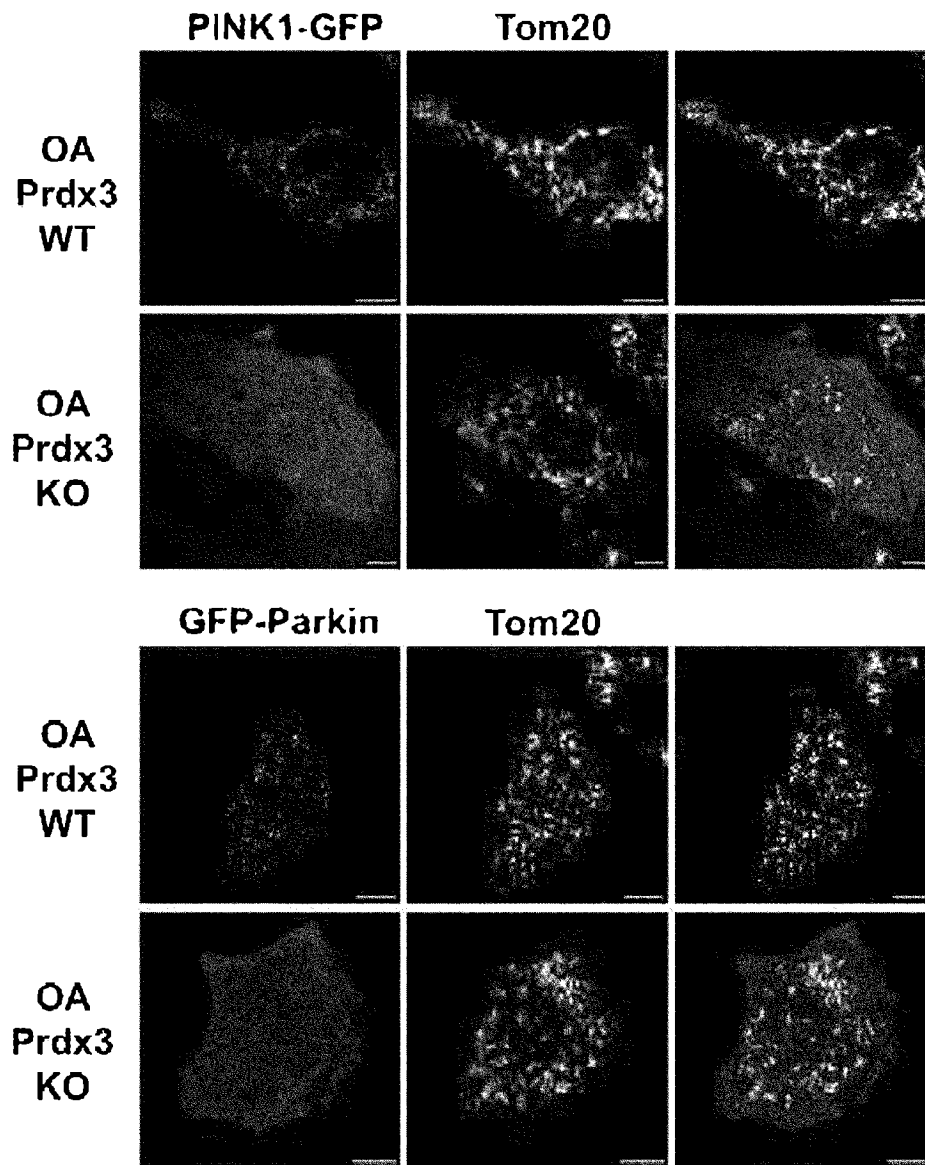
[도11a]



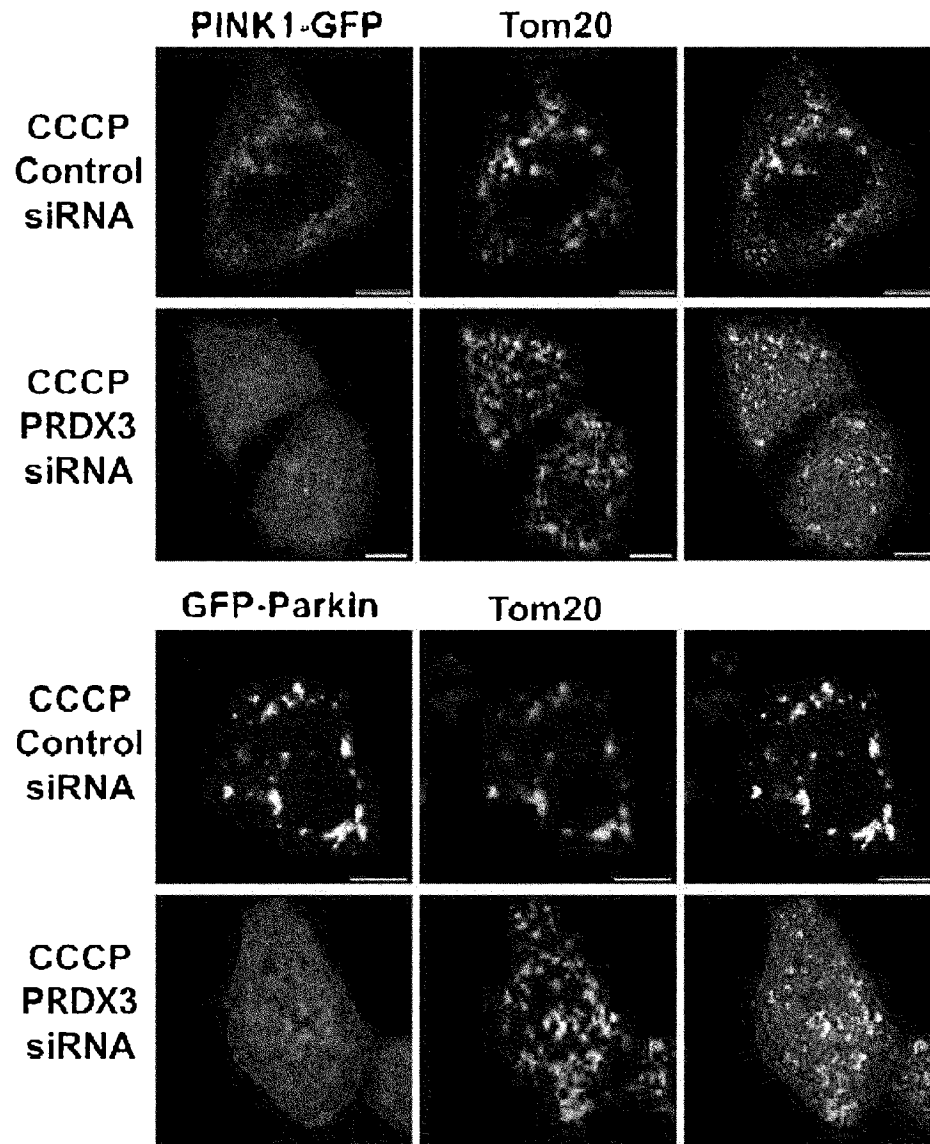
[도 11b]



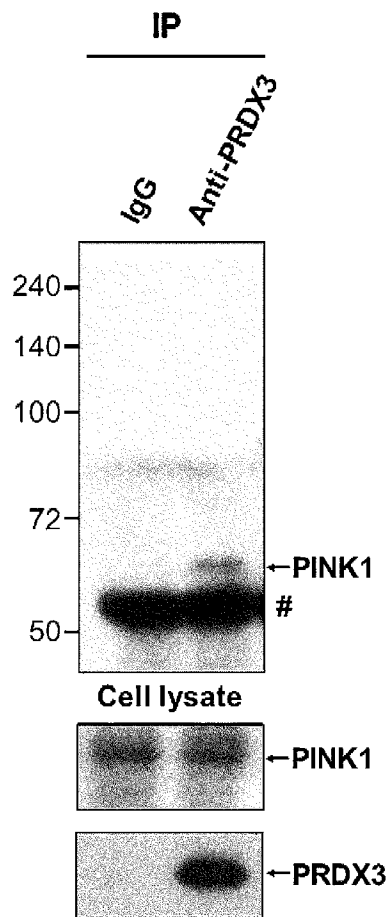
[도11c]



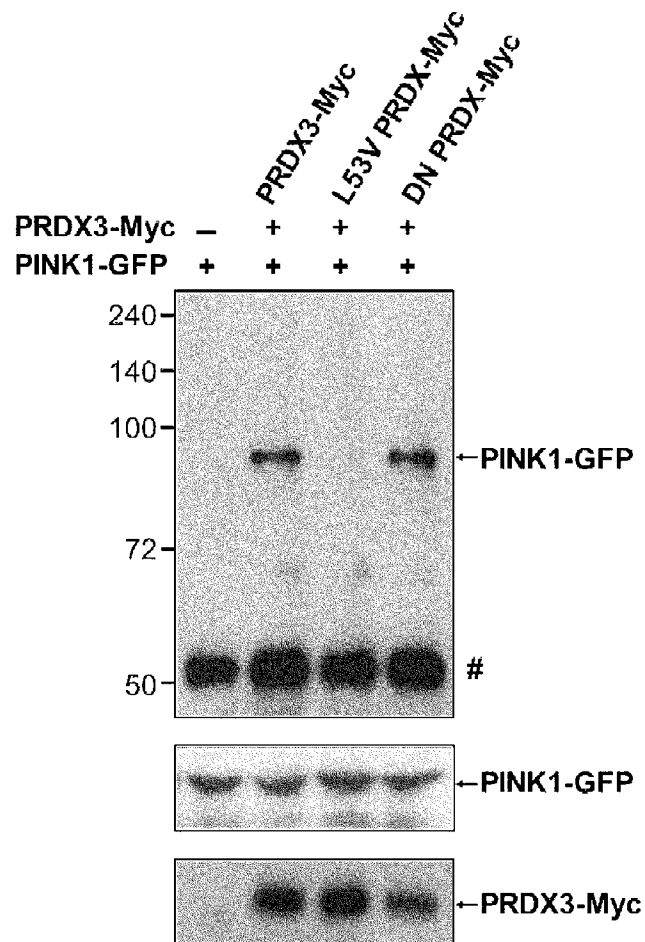
[도11d]



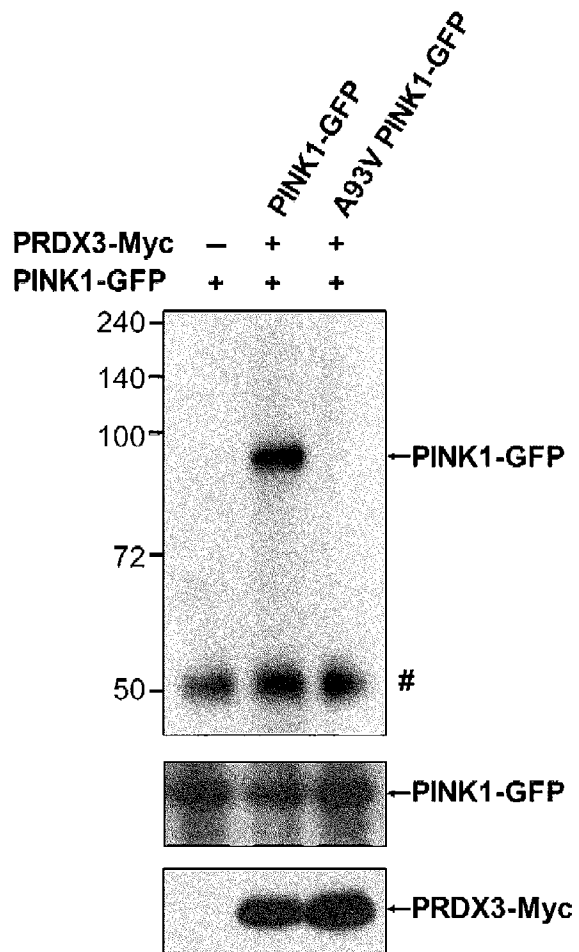
[도 12a]



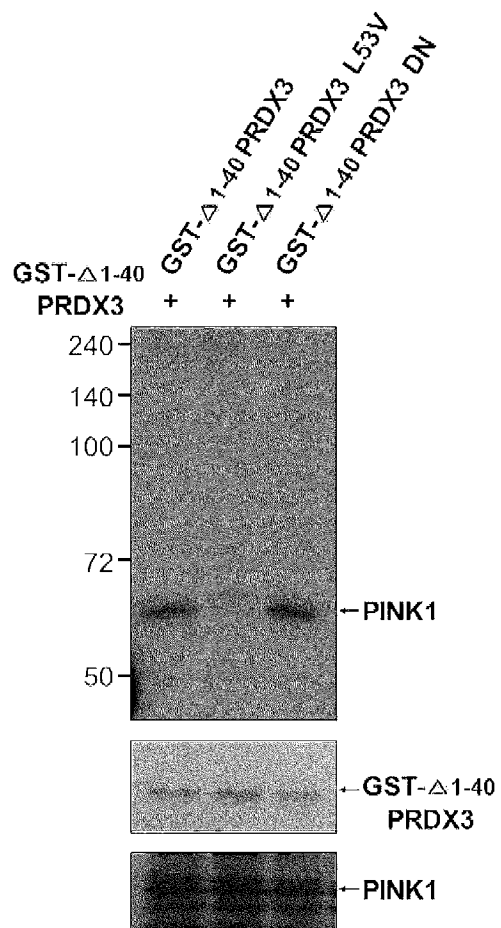
[도 12b]



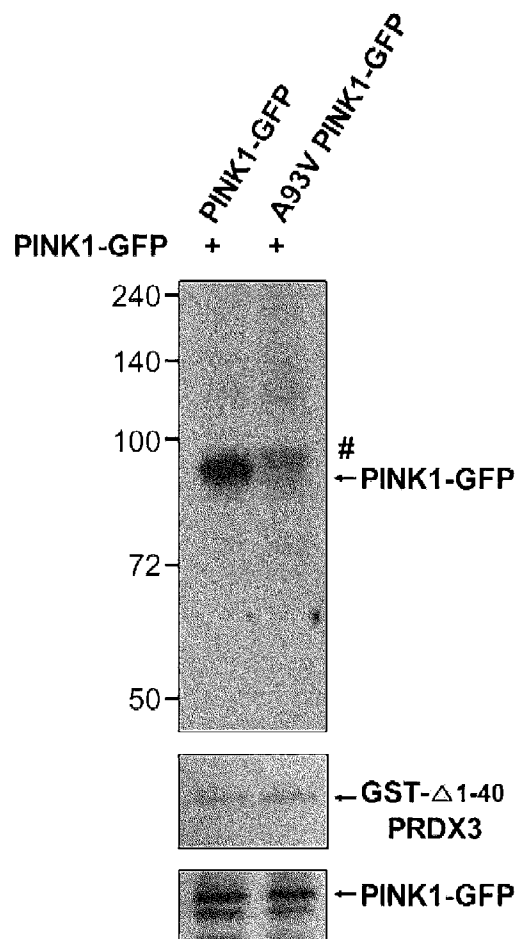
[도 12c]



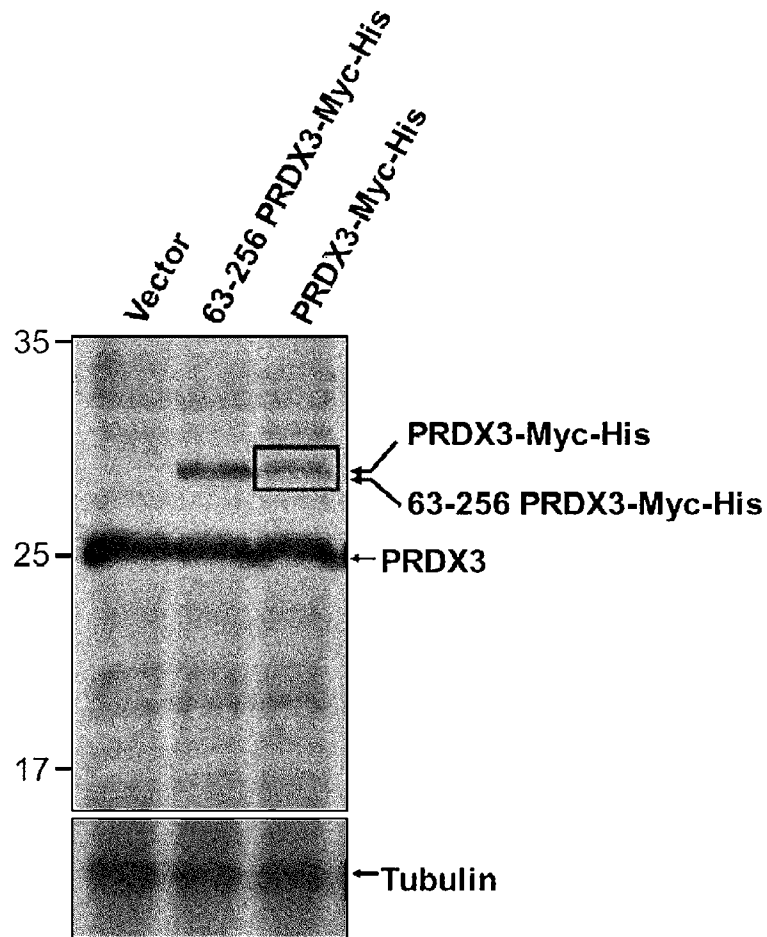
[도 12d]



[D12e]



[도 12f]



The diagram illustrates the PRDX3 protein structure, highlighting the premature and mature sequences. The premature sequence is shown as a long horizontal arrow pointing right, labeled "Premature sequence". The mature sequence is shown as a shorter horizontal arrow pointing right, labeled "Mature PRDX3". The mature sequence is a subset of the premature sequence, starting from the 36th residue and ending at the 53rd residue. The sequence is: MAAAVGRLLRASVARHVSAIPWGISATAALRPAACGRTSLNLLCSGSSQAALFSTSSCH. The residues 36, 37, 38, and 39 are marked with dots above them. The residue 53 is marked with dots above it. An upward arrow points to the residue 53, indicating the PRDX3 Leu53 binding site, ensuring the binding of PRDX3 to PINK1.

Premature sequence

Mature PRDX3

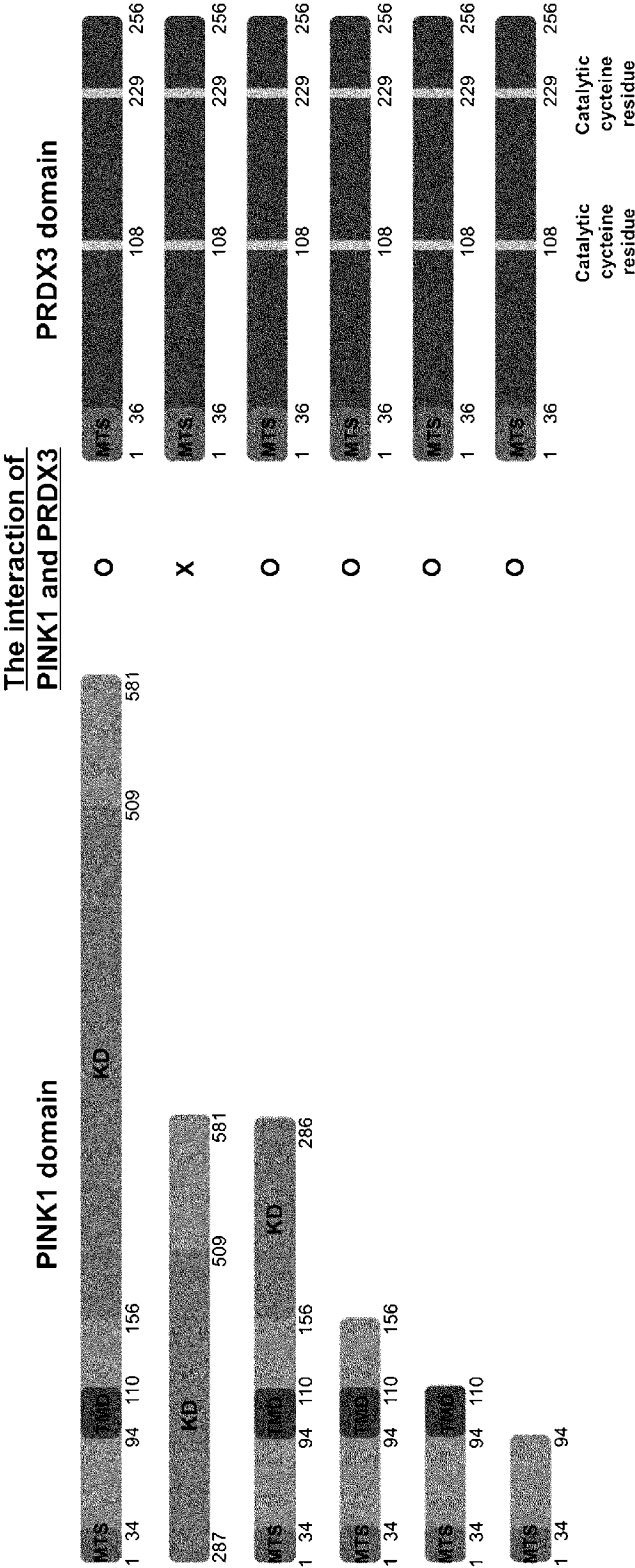
MAAAVGRLLRASVARHVSAIPWGISATAALRPAACGRTSLNLLCSGSSQAALFSTSSCH

1 2 3... 36 37 38 39... 53

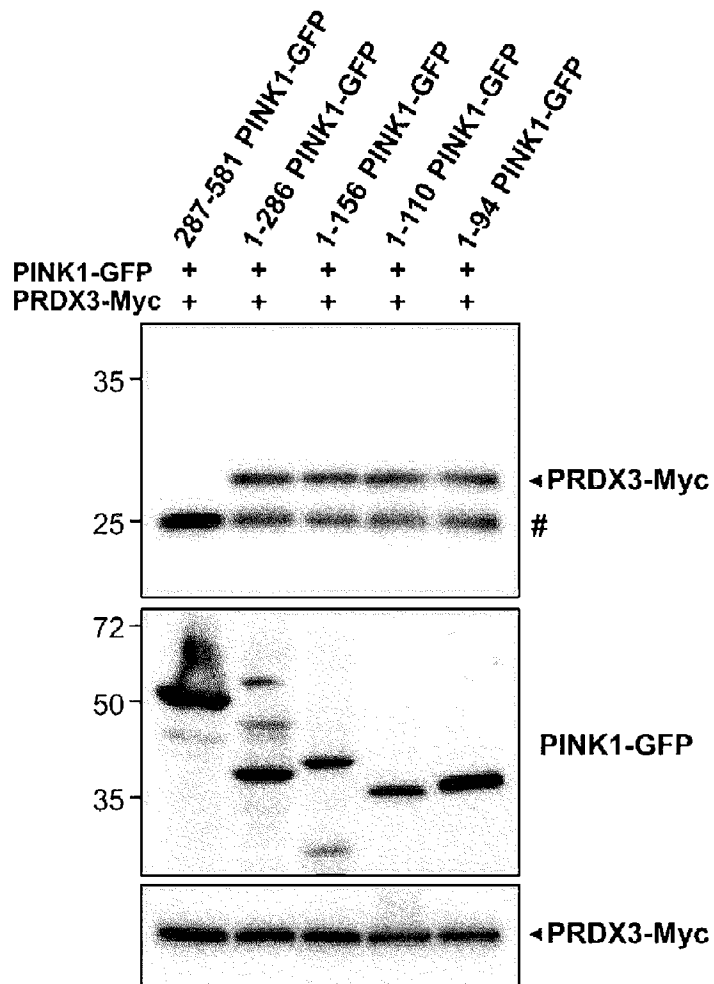
↑

The PRDX3 Leu53 binding site,
ensuring the binding of PRDX3 to PINK1

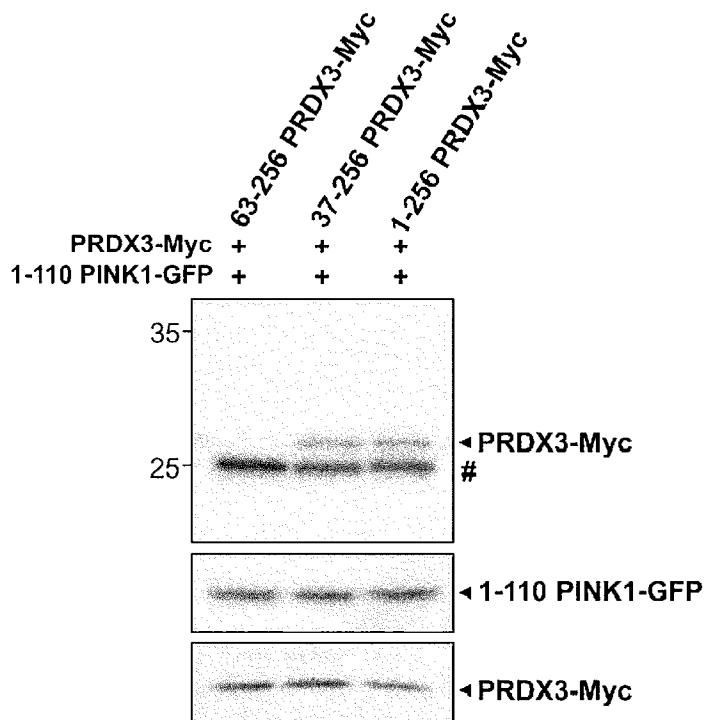
[도 13a]



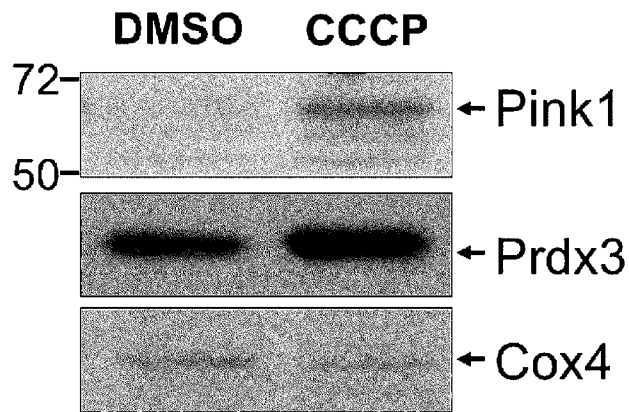
[도 13b]



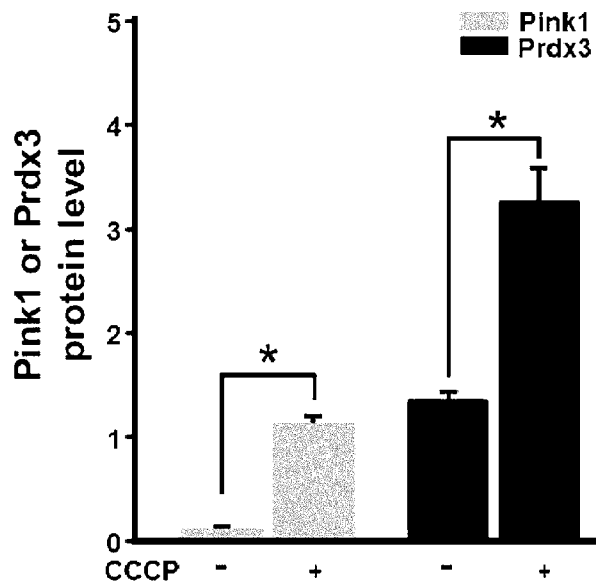
[도 13c]



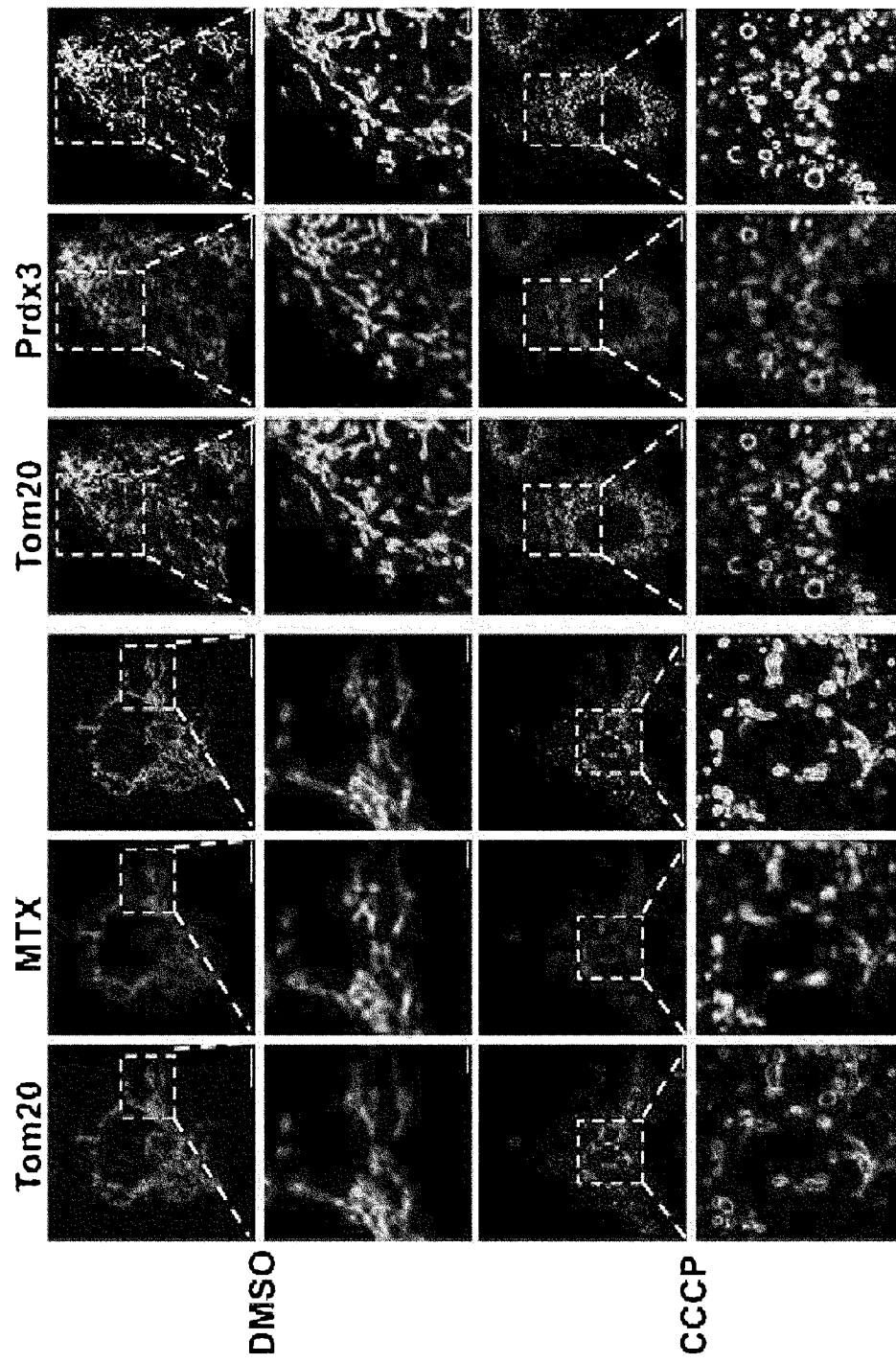
[도 14a]



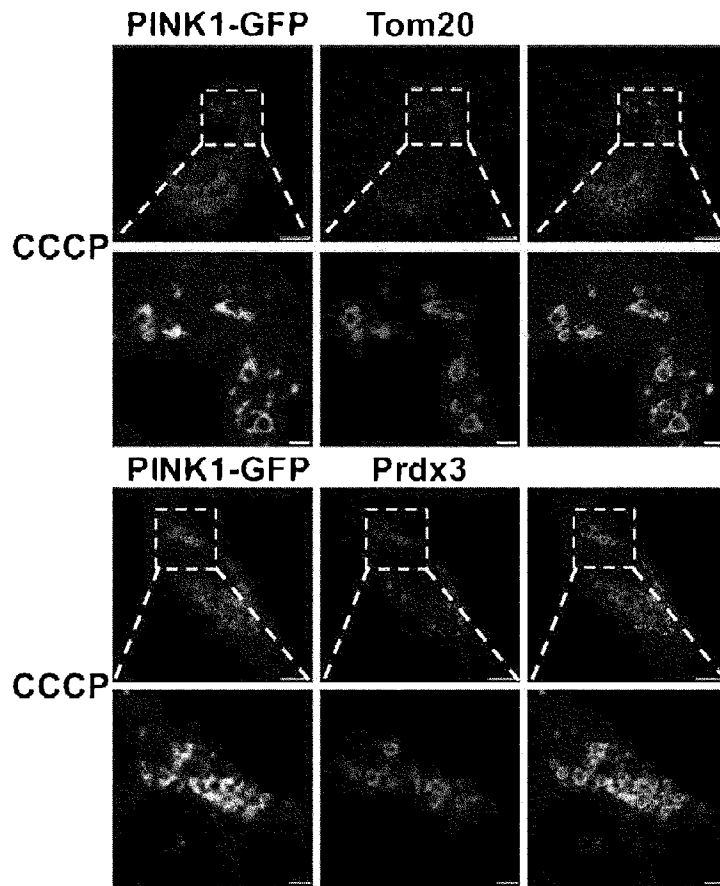
[도 14b]



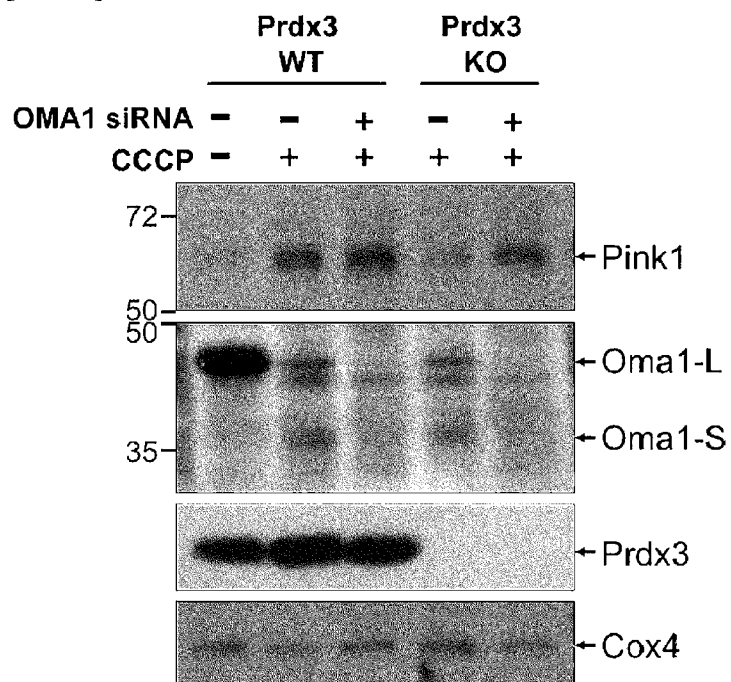
[도 14c]



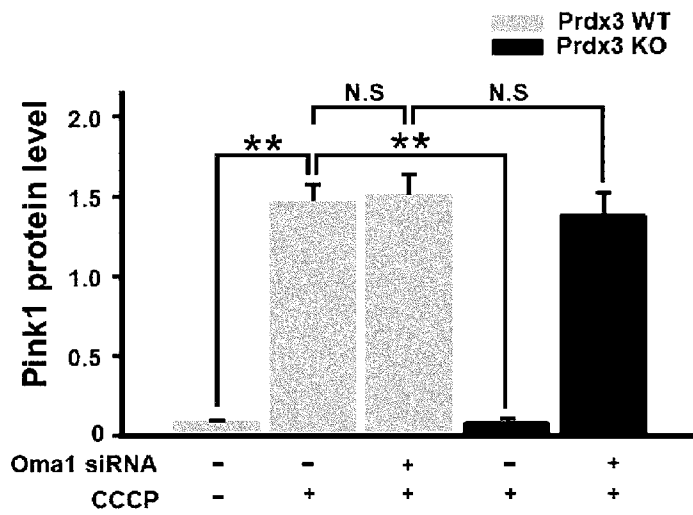
[도 14d]



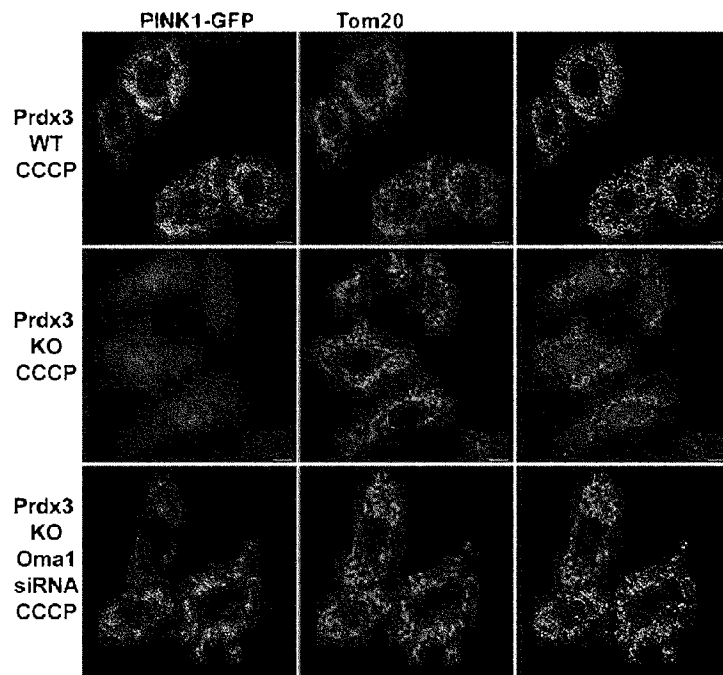
[도 14e]



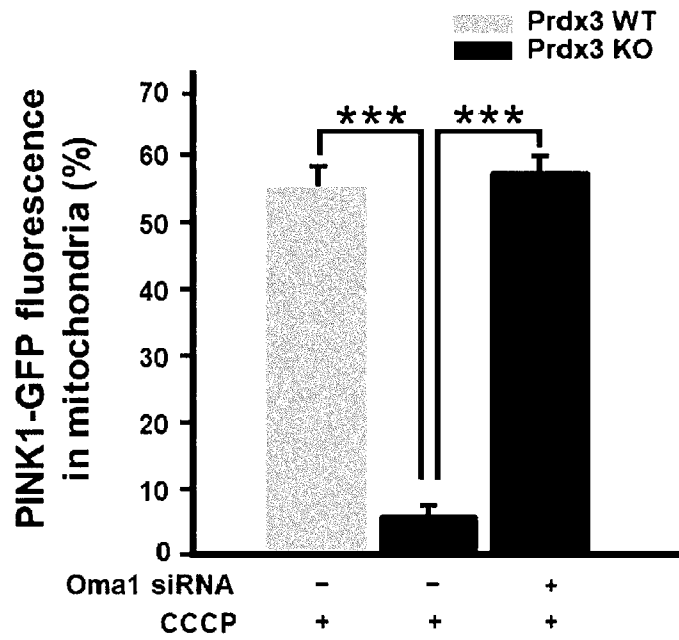
[도14f]



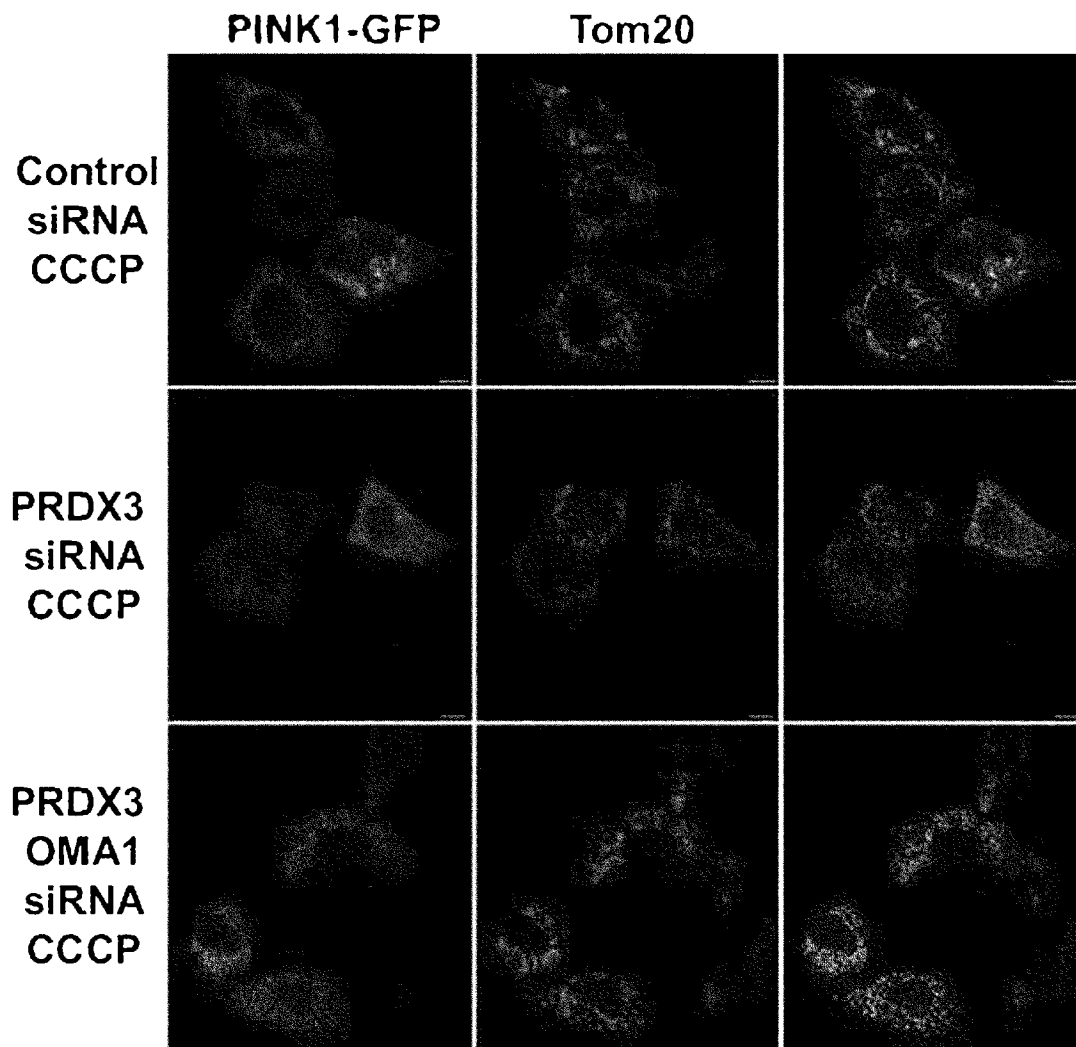
[도14g]



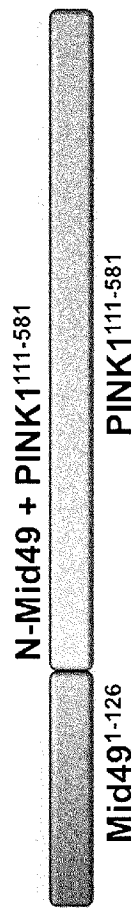
[도14h]



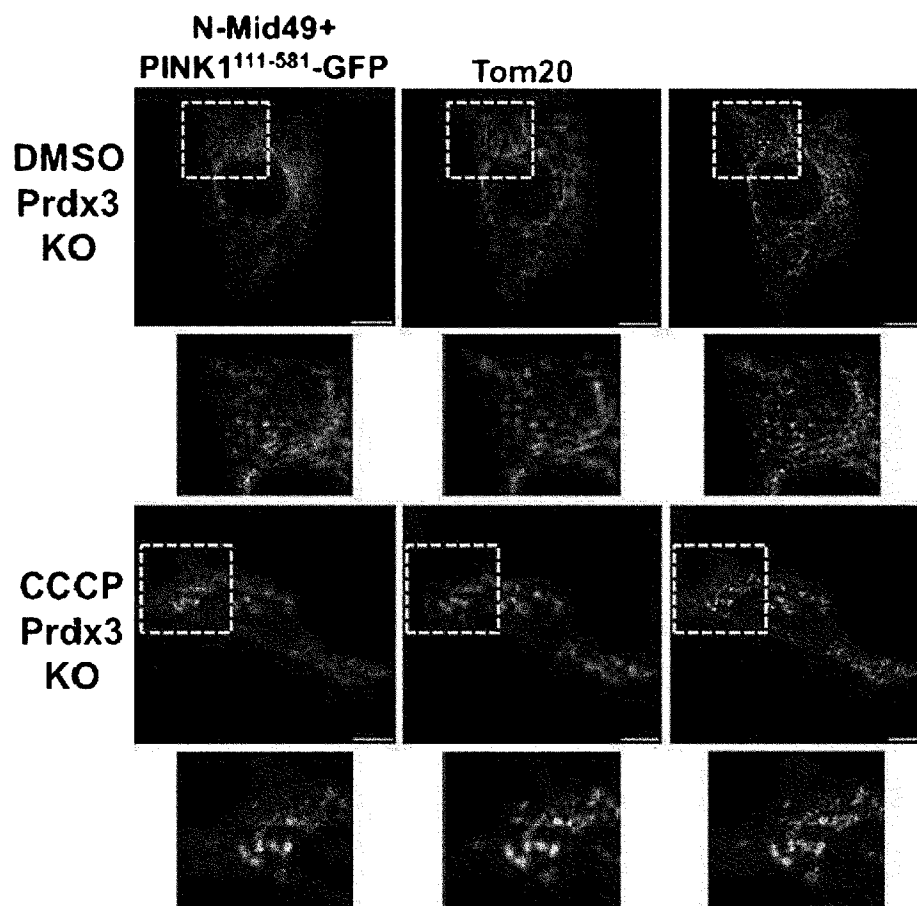
[도15]



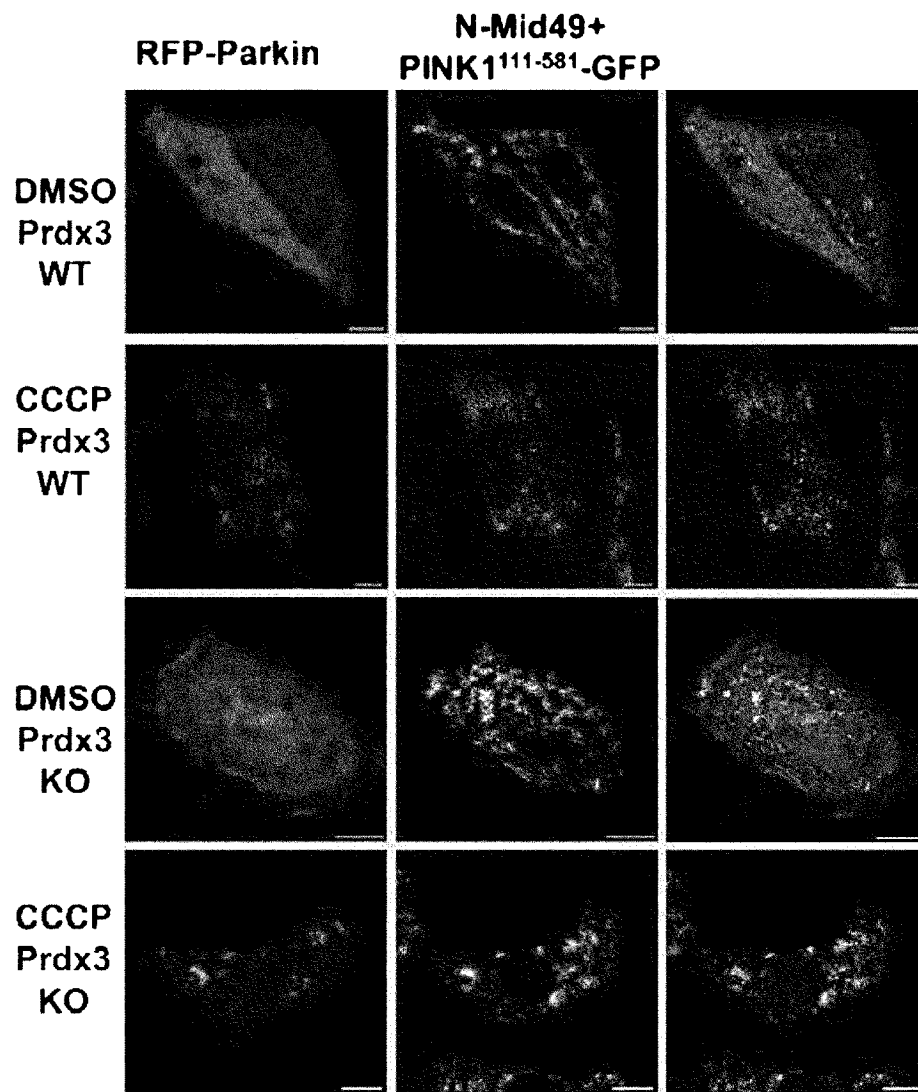
[도 16a]



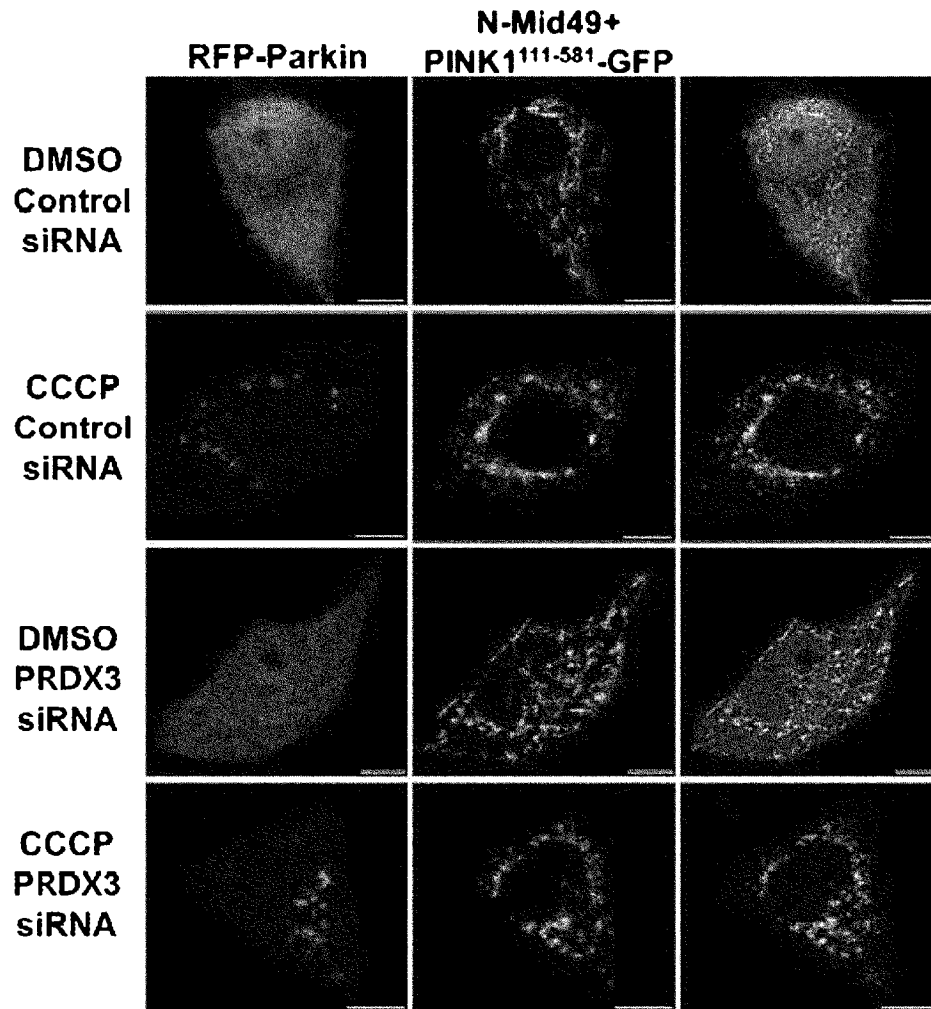
[도 16b]



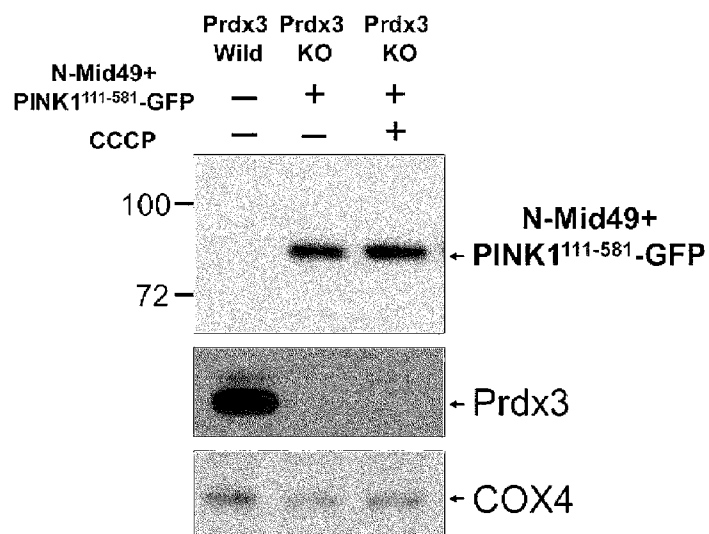
[도16c]



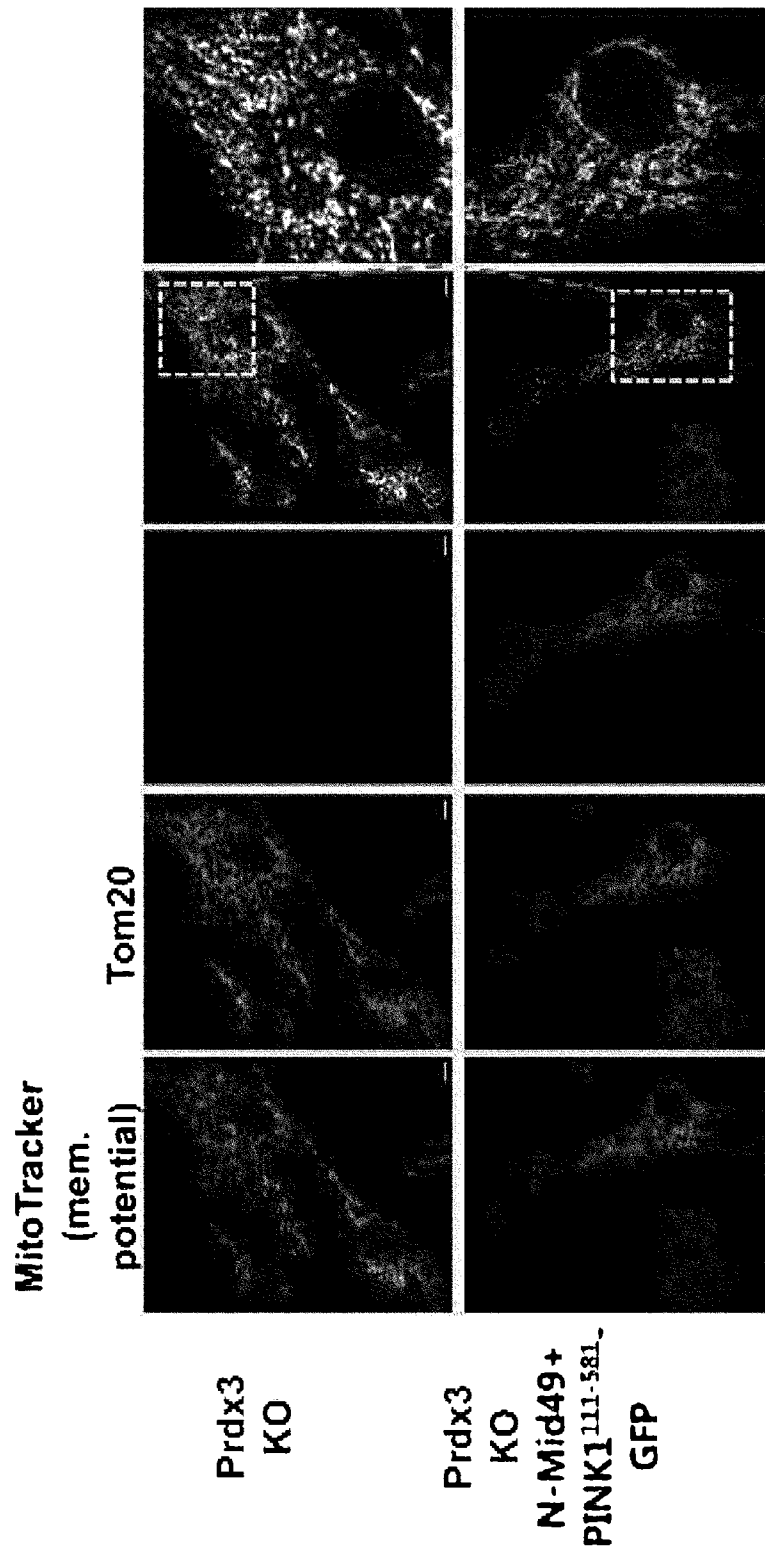
[도16d]



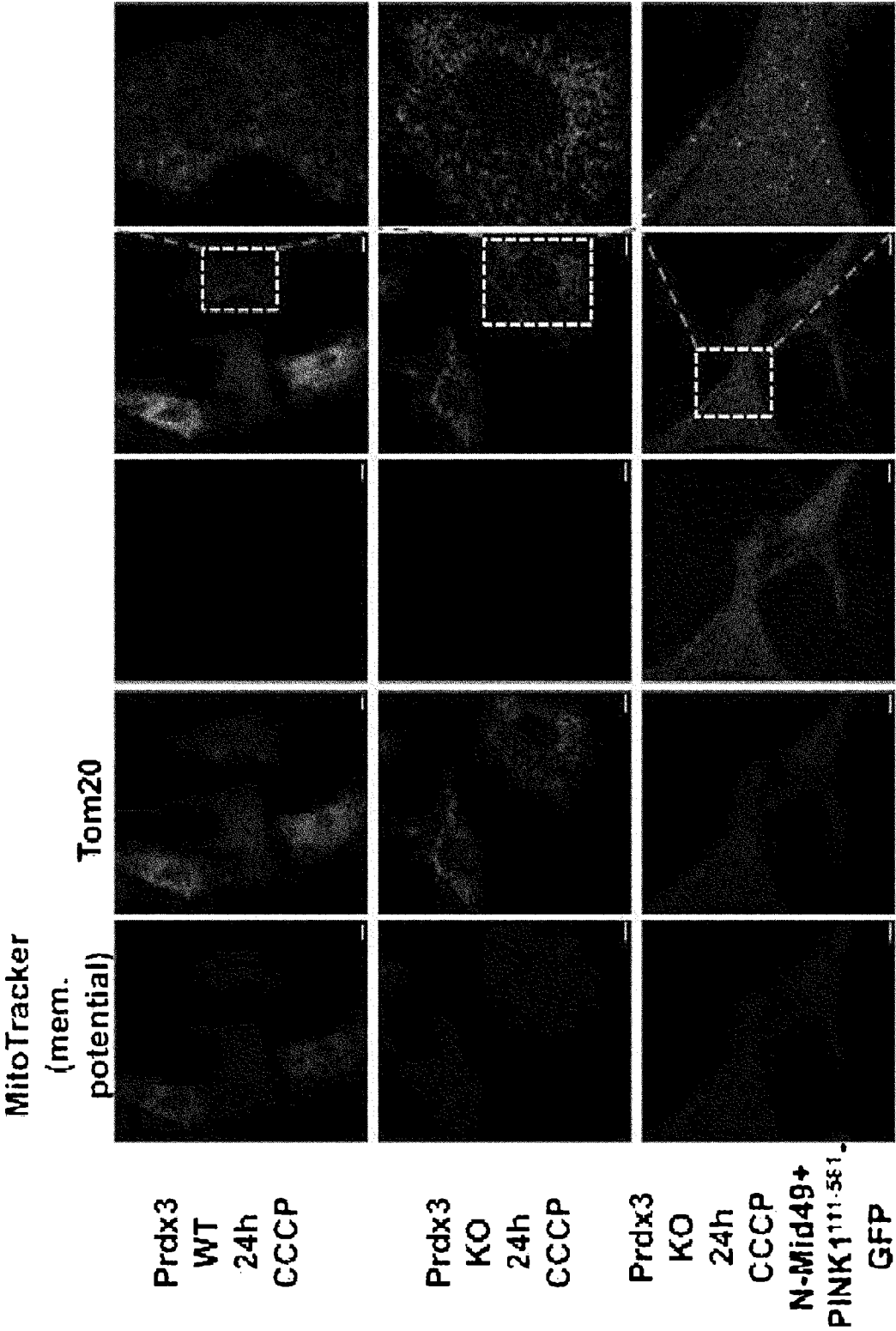
[도16e]



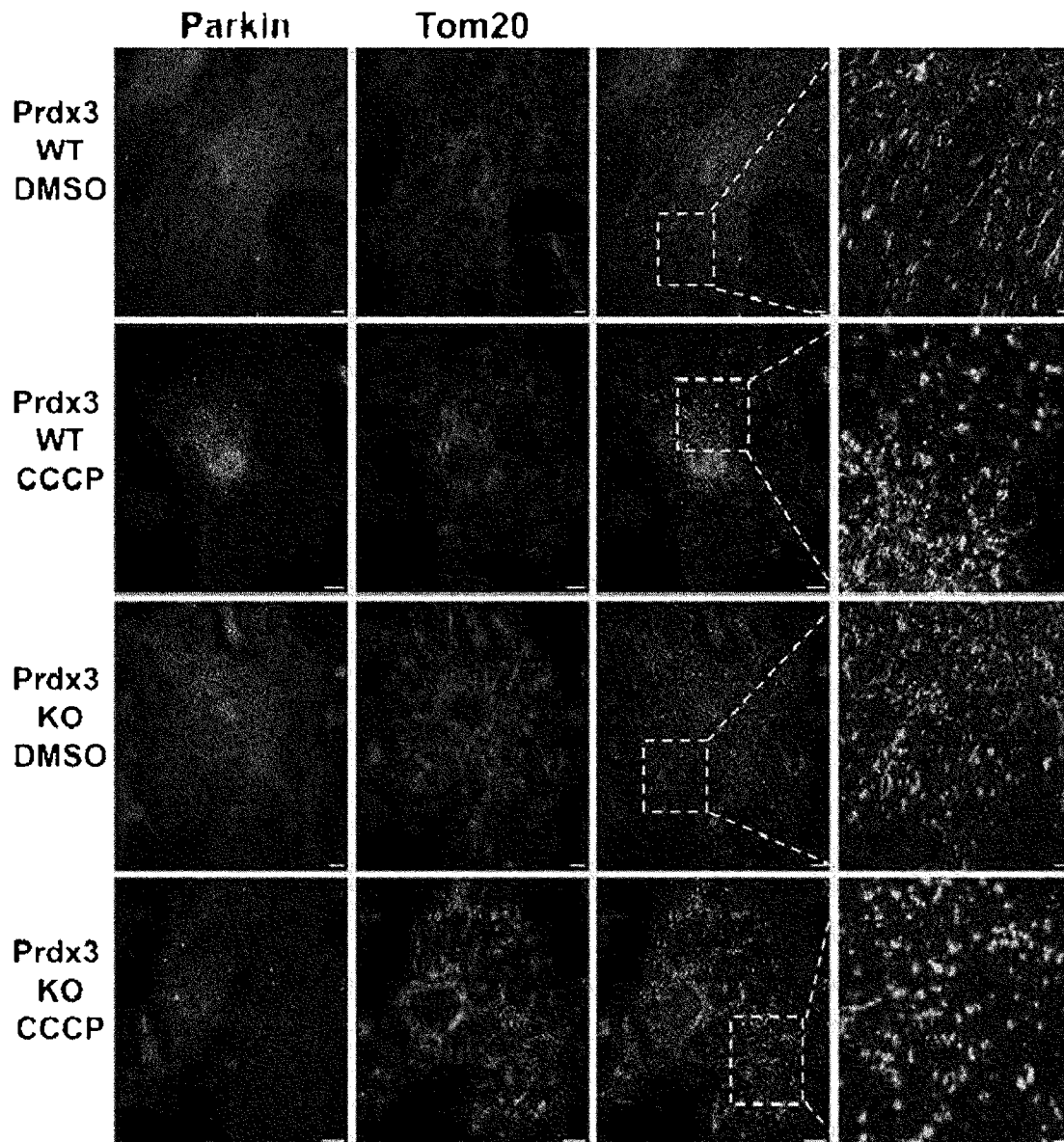
[도 16f]



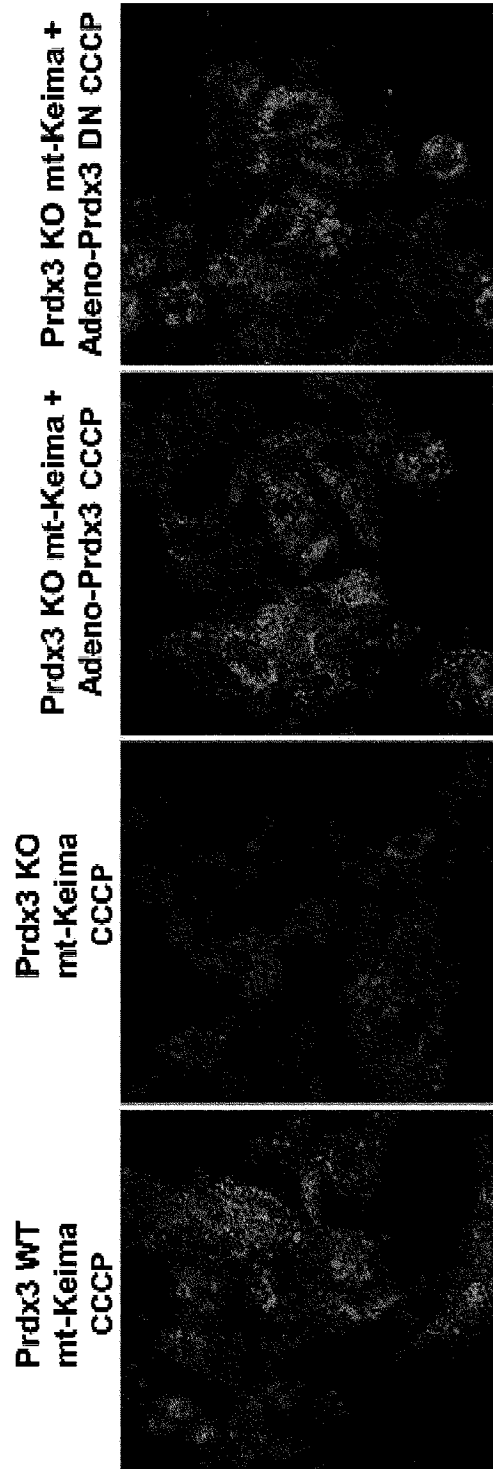
[도16g]



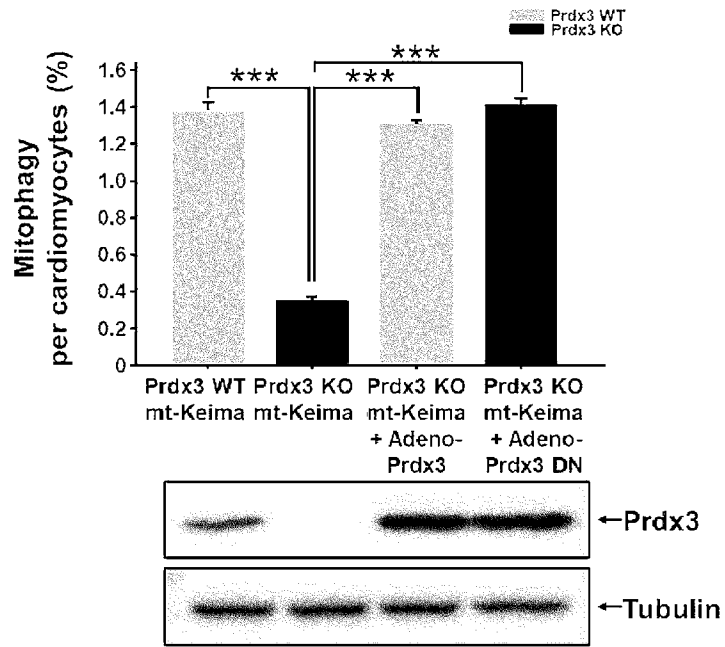
[도17a]



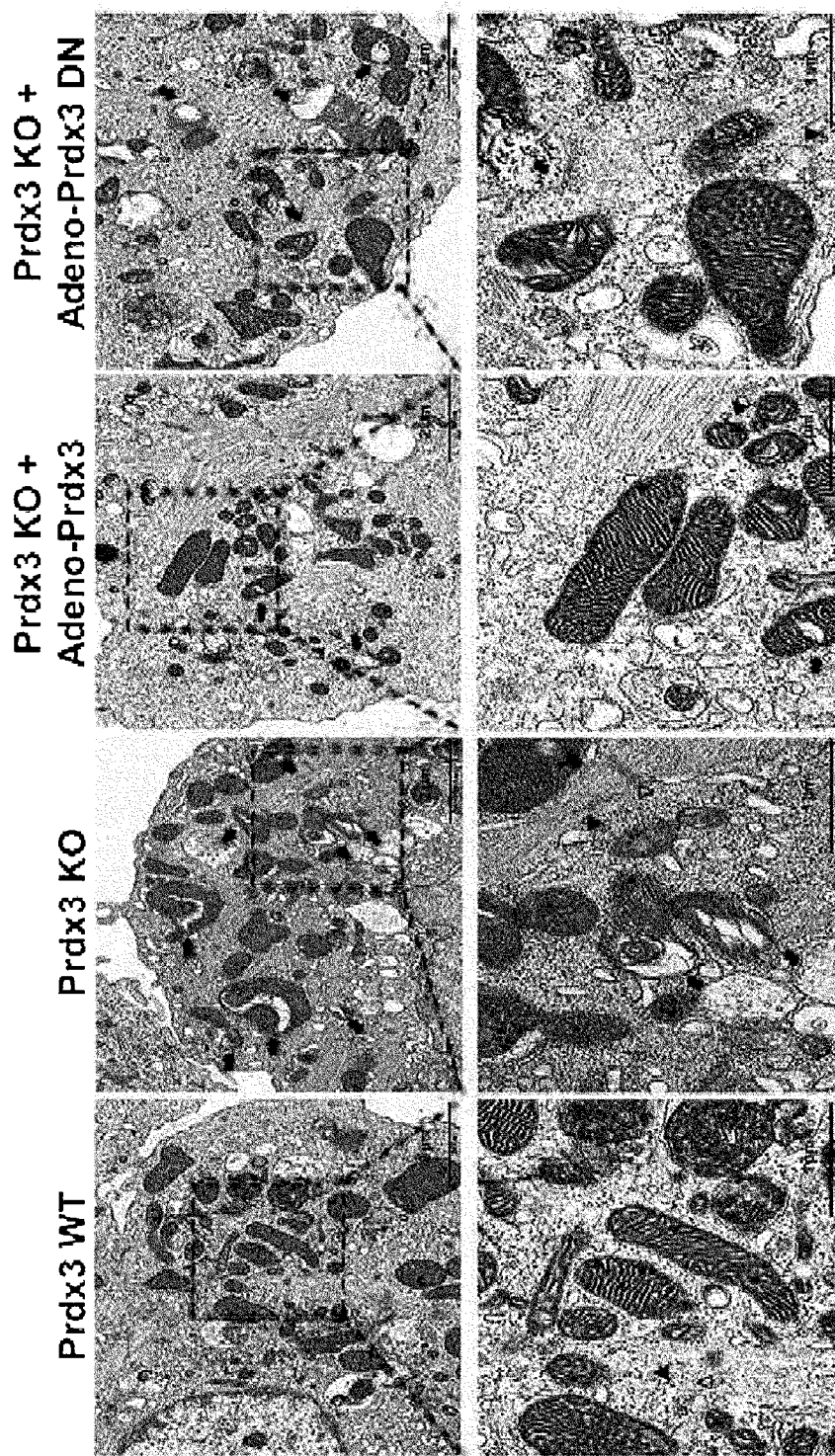
[도 17b]



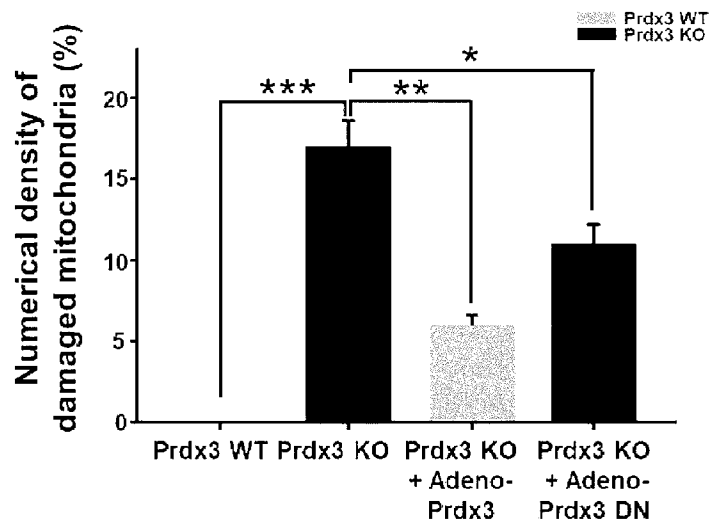
[도 17c]



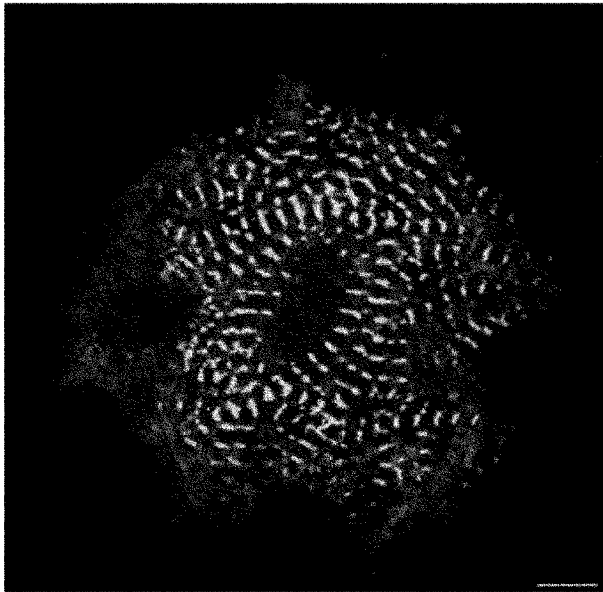
[도 17d]



[도17e]



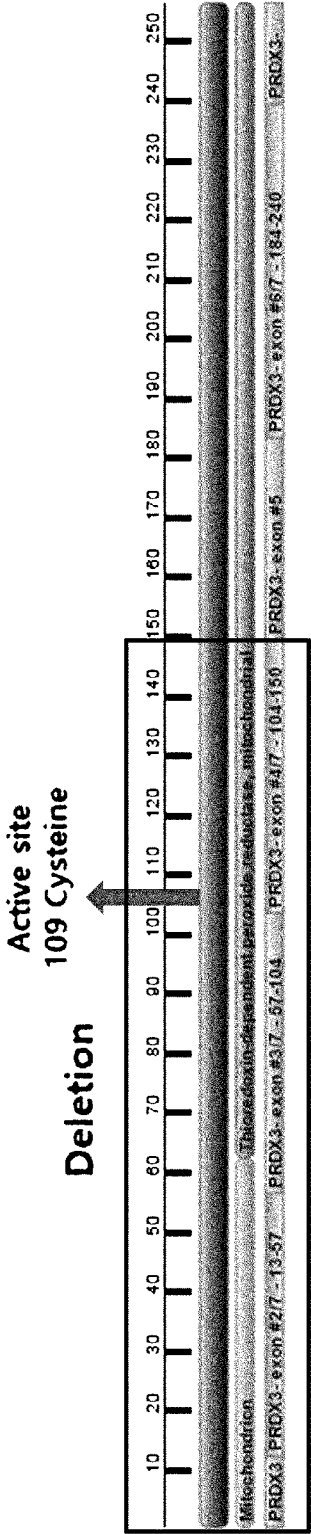
[도18]

Myomesin MitoTracker**Myomesin: cardiomyocyte marker**

[도19]

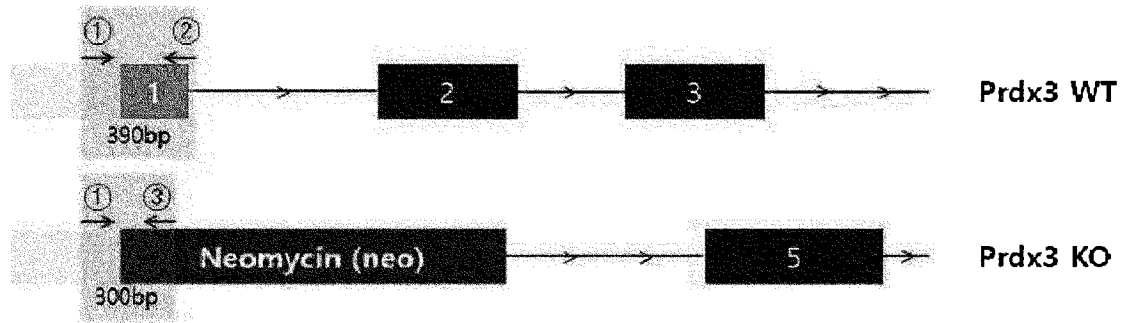
Peroxisedoxin 3 Conventional Knock Out (KO) Mouse

- It deleted the region of Prdx3 gene to exon1 from exon 4(~5.1kb)



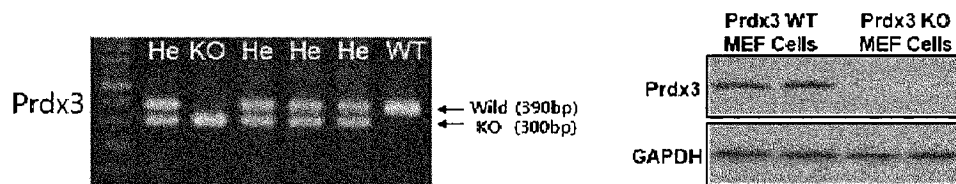
[도20]

- Prdx3 Wild Type (WT) and Conventional Knock Out (KO) Mouse

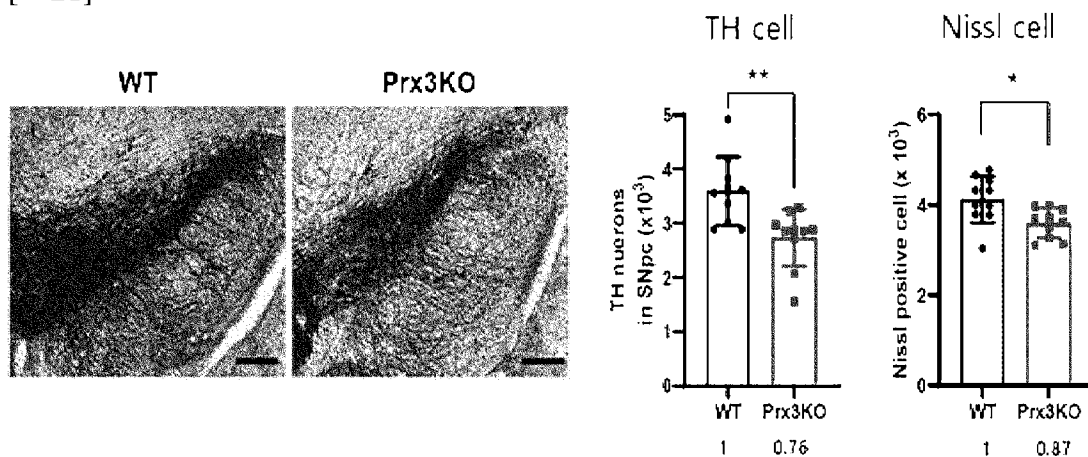


- ① Prdx3-Foward primer cag gaa atg tca ata agt gtc tac
 ② Prdx3-Reverse primer2 cca gag gcc act tgt gta gc
 ③ Prdx3-neo-Reverse primer3 cga gga cca gag caa cct tc

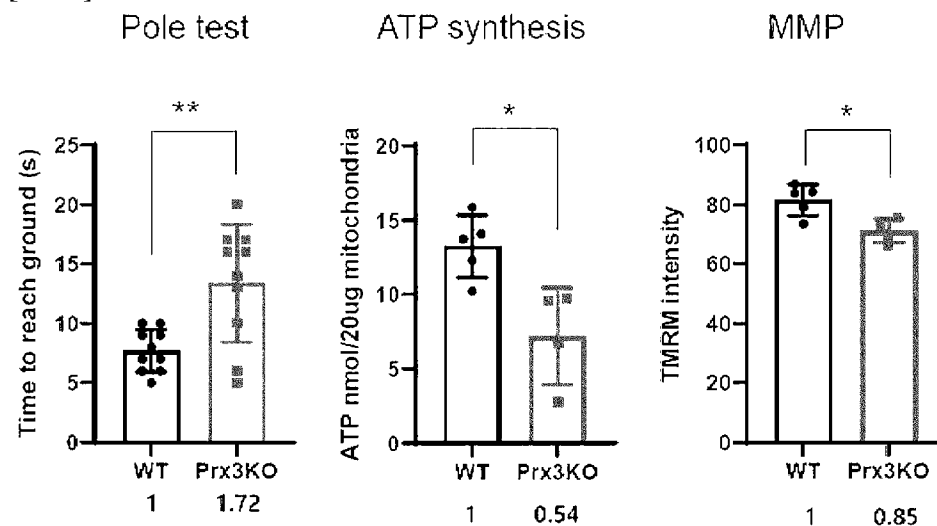
	WT	KO	Hetero (He)	PCR condition (30 cycles)				
① + ②	390		390	94 °C	94 °C	58 °C	72 °C	72 °C
① + ③		300	300	5min	30sec	30sec	1min	7min



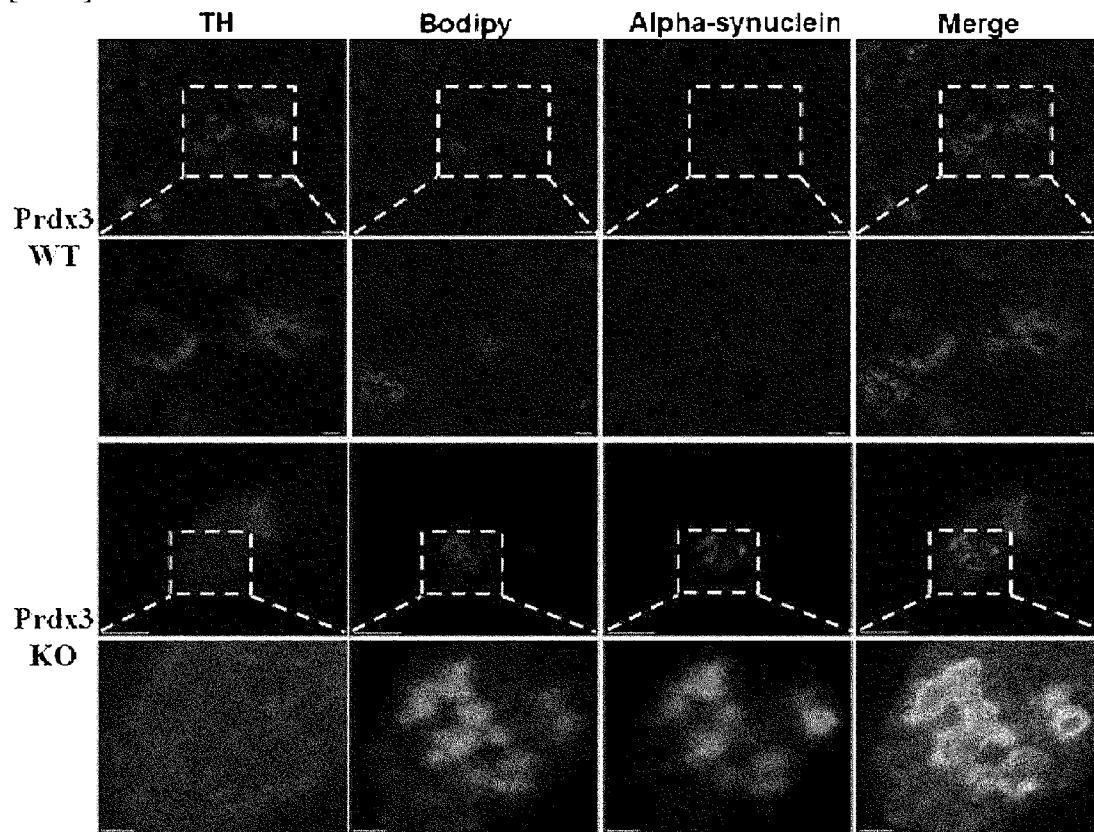
[도21]



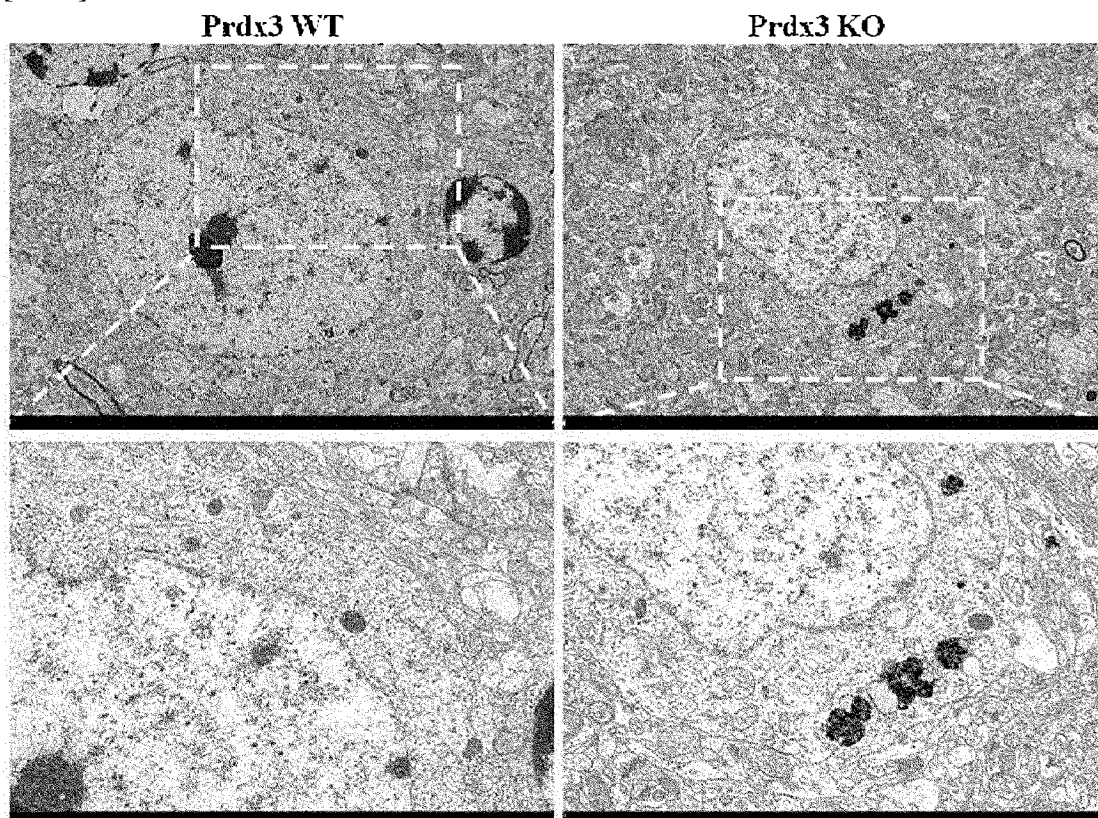
[도22]



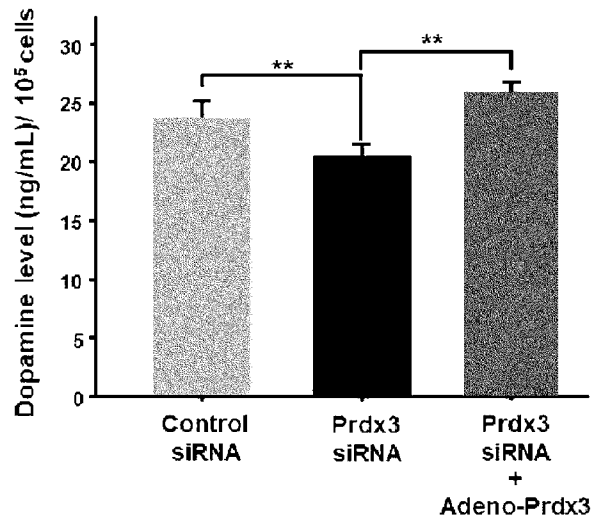
[도23]



[도24]

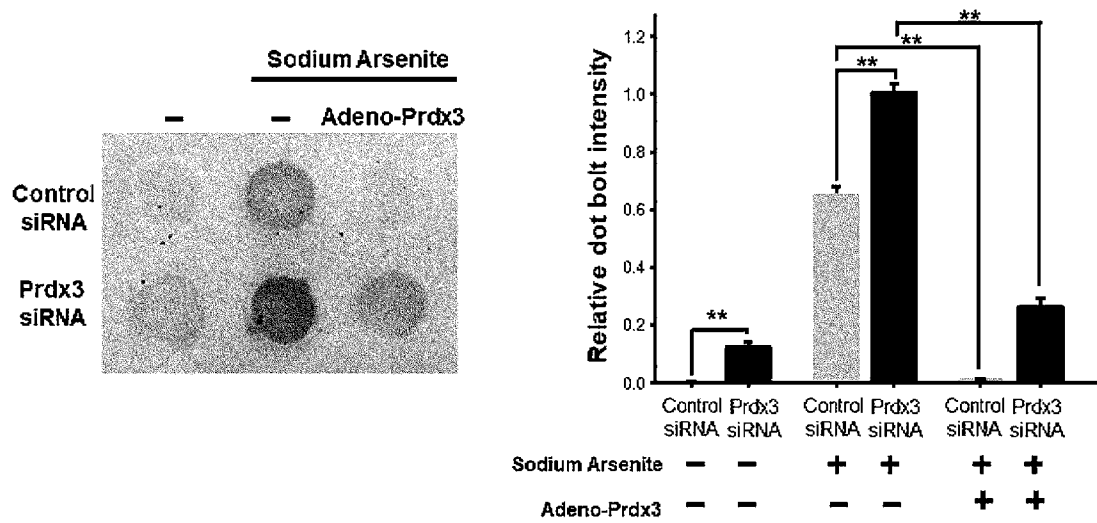


[도25]

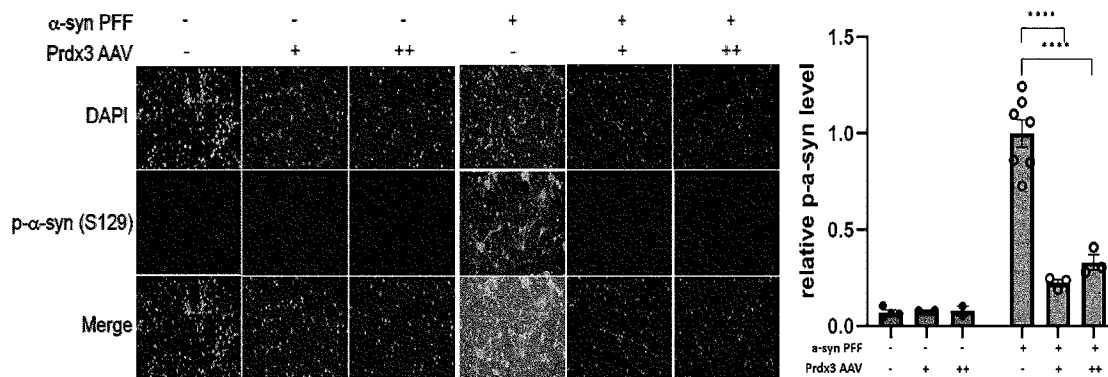


[도26]

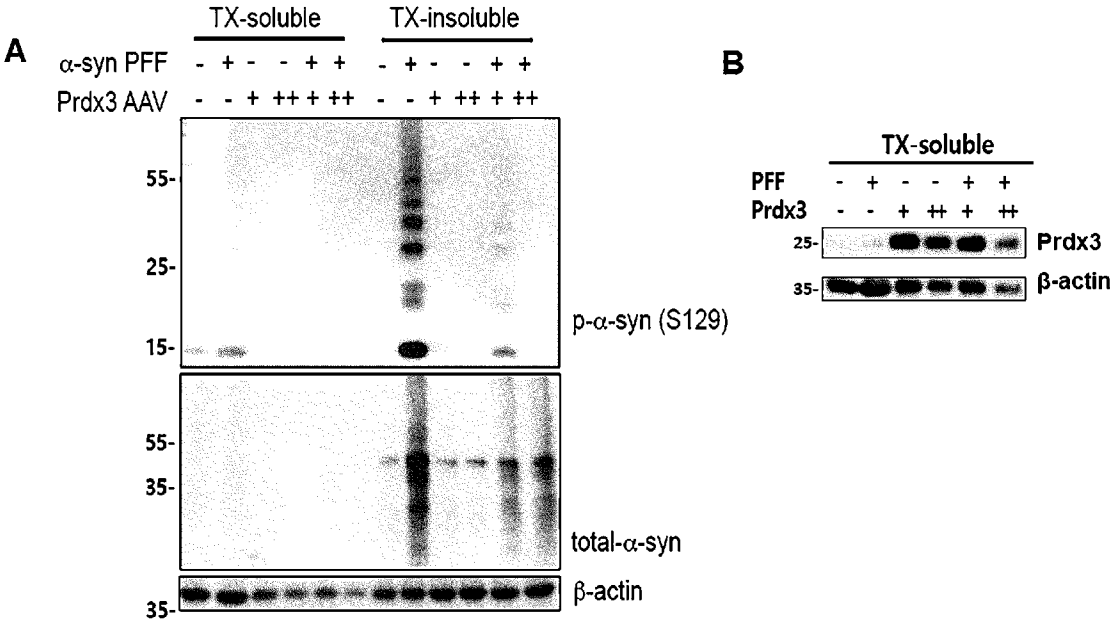
Alpha-synuclein stable SHSY-5Y cell line



[도27]



[도28]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/005477

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 38/44(2006.01)i; A61P 9/00(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 25/28(2006.01)i; A23L 33/18(2016.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 38/44(2006.01); A61K 31/7052(2006.01); A61K 35/12(2006.01); G01N 33/15(2006.01); G01N 33/53(2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above

Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: prdx3 (peroxiredoxin 3), 미토콘드리아 질환 (mitochondrial disease), 미토콘드리아 품질 제어 (mitochondrial quality control), 마이토파지 (mitophagy), 파킨슨 병 (Parkinson's disease)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	SONN, S. K. et al. Peroxiredoxin 3 deficiency induces cardiac hypertrophy and dysfunction by impaired mitochondrial quality control. Redox Biology. 28 February 2022 (publication date), vol. 51, article no. 102275, inner pp. 1-14. See abstract; and inner pages 2, 12 and 13.	1-8 11 10,12-15
X Y	HUH, J. Y. et al. Peroxiredoxin 3 is a key molecule regulating adipocyte oxidative stress, mitochondrial biogenesis, and adipokine expression. Antioxidants & Redox Signaling. 2012, vol. 16, no. 3, pp. 229-243. See abstract; and supplementary methods.	10,12-15 11
A	LEE, K.-P. et al. Peroxiredoxin 3 has a crucial role in the contractile function of skeletal muscle by regulating mitochondrial homeostasis. Free Radical Biology and Medicine. 2014, vol. 77, pp. 298-306. See entire document.	1-8,10-15



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“D” document cited by the applicant in the international application

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

05 August 2024

Date of mailing of the international search report

07 August 2024

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/005477

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2013-0005900 A (EWHA UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION) 16 January 2013 (2013-01-16) See entire document.	1-8,10-15
A	US 2011-0177038 A1 (DANG, C. V. et al.) 21 July 2011 (2011-07-21) See entire document.	1-8,10-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/005477

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/005477

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **9**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 9 pertains to a method for treatment of the human body by surgery or therapy, as well as a diagnostic method (PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv)).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2024/005477

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-2013-0005900	A	16 January 2013	KR	10-1352932	B1	22 January 2014
US	2011-0177038	A1	21 July 2011	AU	2003-228450	A1	27 October 2003
				AU	2003-228450	A8	27 October 2003
				US	2003-0228294	A1	11 December 2003
				WO	2003-087312	A2	04 March 2004
				WO	2003-087312	A3	04 March 2004

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 38/44(2006.01)i; A61P 9/00(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 25/28(2006.01)i; A23L 33/18(2016.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 38/44(2006.01); A61K 31/7052(2006.01); A61K 35/12(2006.01); G01N 33/15(2006.01); G01N 33/53(2006.01)

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: prdx3 (peroxiredoxin 3), 미토콘드리아 질환 (mitochondrial disease), 미토콘드리아 품질 제어 (mitochondrial quality control), 마이토파지 (mitophagy), 파킨슨 병 (Parkinson's disease)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X Y A	SONN, S. K. 등, "Peroxioredoxin 3 deficiency induces cardiac hypertrophy and dysfunction by impaired mitochondrial quality control", Redox Biology, 2022년 02월 28일(공개일), 51권, 기사번호 102275, 내부페이지 1-14 요약; 내부페이지 2, 12, 13	1-8 11 10,12-15
X Y	HUH, J. Y. 등, "Peroxioredoxin 3 is a key molecule regulating adipocyte oxidative stress, mitochondrial biogenesis, and adipokine expression", Antioxidants & Redox Signaling, 2012년, 16권, 3호, 페이지 229-243 요약; supplementary methods	10,12-15 11
A	LEE, K-P. 등, "Peroxioredoxin 3 has a crucial role in the contractile function of skeletal muscle by regulating mitochondrial homeostasis", Free Radical Biology and Medicine, 2014년, 77권, 페이지 298-306 문헌 전체	1-8,10-15

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일

2024년08월05일(05.08.2024)

국제조사보고서 발송일

2024년08월07일(07.08.2024)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동,
정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-5373

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2013-0005900 A (이화여자대학교 산학협력단) 2013.01.16 문헌 전체	1-8,10-15
A	US 2011-0177038 A1 (DANG, C. V. 등) 2011.07.21 문헌 전체	1-8,10-15

제1기제란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.
 - a. ☒ 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - b. ☐ 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))

☐ 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부
2. ☐ 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다
3. 추가 의견:

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 9
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 9는 수술 또는 치료에 의한 사람의 처치방법 및 진단방법에 관한 것입니다(PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)).
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2013-0005900 A	2013/01/16	KR 10-1352932 B1	2014/01/22
US 2011-0177038 A1	2011/07/21	AU 2003-228450 A1	2003/10/27
		AU 2003-228450 A8	2003/10/27
		US 2003-0228294 A1	2003/12/11
		WO 2003-087312 A2	2004/03/04
		WO 2003-087312 A3	2004/03/04