



- (51) 국제특허분류:
G01N 33/50 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2019/006699
- (22) 국제출원일: 2019년 6월 4일 (04.06.2019)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2018-0141315 2018년 11월 16일 (16.11.2018) KR
- (71) 출원인: 서울대학교산학협력단 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) [KR/KR]; 08826 서울시 관악구 관악로 1, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 백성희 (BAEK, Sung Hee); 06276 서울시 강남구 선릉로 221, 405-304, Seoul (KR). 김동하 (KIM, Dong-ha); 10099 경기도 김포시 경포1로 11, 101-203, Gyeonggi-do (KR). 김현경 (KIM, Hyunkyoung); 06599 서울시 서초구 서초중앙로 220, 109-3101, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 박원미 (PARK, Weonmee); 06228 서울시 강남구 논현로 318, 4층, 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, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

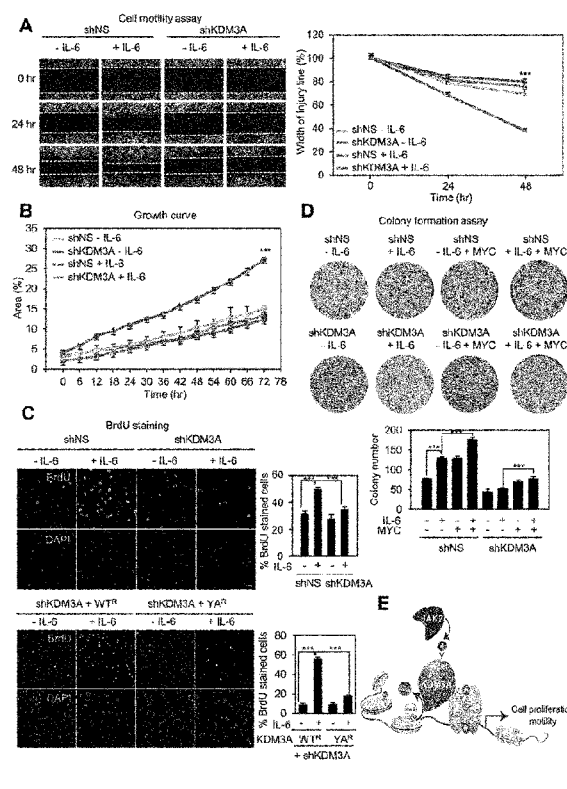
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO,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

규칙 4.17에 의한 선언서:

- 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

(54) Title: SCREENING METHOD FOR CANCER THERAPEUTIC AGENT TARGETING JAK2-STAT3-KDM3A SIGNALING PATHWAY

(54) 발명의 명칭: JAK2-STAT3-KDM3A 신호전달 경로를 표적으로 하는 암치료제 스크리닝 방법



(57) Abstract: The present invention provides a screening method for a cancer therapeutic agent targeting a JAK2-STAT3-KDM3A signaling pathway. The method according to the present invention can control a JAK2-STAT3 signaling pathway which is closely related to development and progression of malignant tumors through inhibition of KDM3A phosphorylation, thereby enabling the development of an effective new cancer therapeutic agent.

(57) 요약서: 본원은 JAK2-STAT3-KDM3A 신호 전달 경로를 표적으로 하는 암 치료제 스크리닝 방법을 제공한다. 본원에 따른 방법은 KDM3A 인산화의 저해를 통해 악성 종양의 발생 및 진행과 밀접한 연관이 있는 JAK2-STAT3 신호 전달 경로를 제어할 수 있어 효과적인 새로운 암 치료제 개발을 가능하게 한다.

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: JAK2-STAT3-KDM3A 신호전달 경로를 표적으로 하는 암치료제 스크리닝 방법

기술분야

- [1] JAK2-STAT3 특이적 신호전달 경로에서 작용하는 분자 기전에 근거한 암치료 개발과 관련된 것이다.

배경기술

- [2] JAK2(Janus tyrosine kinase 2)-신호 전달자(transducer) 및 STAT3(activator of transcription 3) 신호전달 경로는 세포 발생, 세포 분화 및 항상성 조절에 필수적인 경로로서, JAK2-STAT3 경로 조절 장애는 암의 발생과 깊은 연관성이 있는 것으로 알려져 있다. 구체적으로 JAK2는 세포질 신호 전달 과정을 유도하는 비수용체 타이로신 인산화 효소이며 JAK2는 인간 조혈 세포의 핵에도 존재하여 히스톤 H3Y41의 직접적인 인산화 효소로 작용하는 것으로 알려져 있다. JAK2가 활성화되면 전사 인자 STAT3를 활성화시킨다. STAT3은 JAK2에 의해 인산화되고 안정적인 동종 이량체 또는 이종 이량체를 형성하여 표적 유전자의 국지적 활성화를 유도한다. 이러한 JAK2-STAT3 신호 전달 경로의 비정상적 반응은 다양한 종류의 암에서 비정상적인 세포 증식, 이동 및 항-세포 사멸을 유도하는 것으로 나타났다(Griffiths DS, *et al.* (2011) LIF-independent JAK signalling to chromatin in embryonic stem cells uncovered from an adult stem cell disease. *Nature cell biology* 13(1):13-21.; Marotta LL, *et al.* (2011) The JAK2/STAT3 signaling pathway is required for growth of CD44(+)CD24(-) stem cell-like breast cancer cells in human tumors. *The Journal of clinical investigation* 121(7):2723-2735.; Yu H, Kortylewski M, & Pardoll D (2007) Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nature reviews. Immunology* 7(1):41-51.).
- [3] 따라서 JAK2-STAT3 신호 전달 축의 억제제는 암 치료의 표적이 될 수 있지만, 보다 효과적인 치료제의 개발을 위해서는 상기 신호 전달 경로에서 특이적으로 작용하는 하위 조절자 및 그 기전의 규명이 필요하다. KDM3A는 신진 대사와 정자 형성에서 전사 활성화 과정을 조절하는 것으로 *PSA*와 *NKX3.1*과 같은 안드로젠 수용체 표적 유전자를 활성화시키는 것으로 알려져 있고, 대한민국 공개특허 2017-0112755는 KDM3A 유전자의 혈액암 진단용 마커로서의 용도를 개시한다.
- [4] 하지만 KDM3A의 JAK2-STAT3 신호 전달과의 관련성에 대해서는 알려진 바 없다. 나아가 암의 발생 또는 진행 과정에서 JAK2-STAT3 신호 전달 경로와 관련된 KDM3A 전사 활성화 및 억제에 대한 조절 기전에 대해서는 전혀 규명된 바 없다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [5] 본원에서는 JAK2-STAT3 신호 전달 경로의 활성화와 관련된 암의 치료제 개발에 필요한 필수 후성 유전인자를 규명하고자 한다.

과제 해결 수단

- [6] 한 양태에서 본원은 KDM3A(lysine-specific demethylase 3A)을 경유하는 JAK2(Janus tyrosine kinase 2)-STAT3(Signal Transducer and Activator of Transcription 3) 신호전달 경로 이상과 관련된 암 치료용 물질의 스크리닝 방법을 개시한다.
- [7] 일 구현예에서 상기 방법은 JAK2 단백질 및 상기 JAK2 단백질에 의해 인산화될 수 있는 서열번호 1의 서열을 기준으로 1101번째 타이로신 잔기를 포함하는 KDM3A 단백질을 상기 JAK2에 의한 상기 타이로신 잔기의 인산화를 억제할 것으로 기대되는 시험물질의 존재 중에서 배양하는 제1 단계; 상기 KDM3A 단백질의 타이로신 잔기의 인산화 정도를 측정하는 제2 단계; 및 상기 측정결과 시험물질로 처리되지 않은 대조군과 비교하여, 시험물질로 처리된 경우 상기 KDM3A 단백질의 인산화가 감소한 경우, 이를 암 세포의 성장을 억제할 수 있는 후보물질로 선별하는 제3 단계를 포함한다.
- [8] 본원에서 서열번호는 인산화되는 잔기를 표시하기 위한 기준으로 사용된 것으로 본원에 따른 방법에 사용되는 구체적 종(species)에 따라서 실제 잔기 번호는 달라질 수 있으나, 당업자라면 중간에서 상응하는 잔기를 용이하게 특정할 수 있을 것이다.
- [9] 다른 구현예에서 상기 방법은 상기 제1 단계가 STAT3 단백질을 추가로 포함하며, 상기 제2 단계에서 상기 KDM3A 단백질의 상기 STAT2 단백질에 대한 보조인자로서의 활성을 측정하는 것을 추가로 포함하며, 그리고 상기 3 단계에서, 상기 측정결과 시험물질로 처리되지 않은 대조군과 비교하여, 시험물질로 처리된 경우 상기 KDM3A 단백질의 상기 STAT3 단백질에 대한 보조인자로서의 활성으로서, 상기 STAT3 단백질의 전사 활성이 감소된 경우, 이를 암 세포의 성장을 억제하는 후보물질로 선별하는 것을 추가로 포함한다.
- [10] 또 다른 구현예에서 상기 모든 방법에 있어서, 상기 제1 단계에서 서열번호 4를 기준으로 9번째 라이신 잔기가 메틸화된 히스톤 3 단백질(H3K9, Histone 3 Lysine 9)을 추가로 포함하며, 상기 제2 단계에서 상기 KDM3A 단백질의 H3K9에 대한 탈메틸화 활성을 측정하는 것을 추가로 포함하며, 그리고 상기 3 단계에서 상기 측정결과 시험물질로 처리되지 않은 대조군과 비교하여, 시험물질로 처리된 경우 상기 H3K9 단백질의 탈메틸화가 감소된 경우, 이를 암 세포의 성장을 억제하는 후보물질로 선별하는 것을 추가로 포함한다.
- [11] 또 다른 구현예에서 상기 모든 방법에 있어서, 상기 제1 및 제2 단계는 상기 각 단백질을 발현하는 진핵세포에서 수행되고, 상기 세포는 상기 JAK2-STAT

신호전달 경로를 활성화 할 수 있는 물질로 추가로 처리된다.

- [12] 또 다른 구현예에서 상기 모든 방법에서 상기 제1 및 제2 단계는 상기 각 단백질을 발현하는 진핵세포, 특히 포유류 진핵세포, 특히 암 유래 포유류 진핵세포 예를 들면 Hela 세포에서 수행되고, 상기 세포는 JAK2-STAT 신호전달 경로를 활성화 할 수 있는 물질로 IL(Interleukin)-6, IL-11 또는 Oncostatin M(OSM)을 포함하는 gp(glycoprotein) 130을 매개 신호 전달 물질로 활성화될 수 있다.
- [13] 일 구현예에서 본원에 따른 방법에 따라 스크리닝된 물질은 고형암 예를 들면 자궁경부암, 난소암, 유방암, 신장암 및 위암을 포함하는 고형암의 치료제로 개발되어 사용될 수 있다.
- [14] 다른 양태에서 본원은 또한 서열번호 1의 서열을 기준으로 1101번째 타이로신 잔기가 인산화된 KDM3A를 특이적으로 인식하는 항체 또는 항원 결합 단편을 제공한다. 본원에서는 처음으로 JAK2-STAT 신호전달 경로에서 특이적으로 작용하는 하위 조절자인 1101번 잔기에서 인산화된 KDM3A를 특이적으로 인식할 수 있는 항체를 개발하였다.
- [15] 또 다른 양태에서 서열번호 1의 서열을 기준으로 KDM3A 단백질 1101번째 타이로신 잔기가 인산화된 KMpYNAYGLI(아미노산 잔기를 나타내는 단문자 코드, 각각 순서대로 라이신, 메티오닌, 인산화된 타이로신, 아스파라진, 알라닌, 타이로신, 글라이신, 루이신 및 아이소루이신을 나타냄) 에피토프를 특이적으로 인식하는 항체 또는 그 항원 결합 단편을 제공한다.
- [16] 일 구현예에서 상기 항체는 폴리클로날 또는 모노클로날 항체 일 수 있다.

발명의 효과

- [17] 본원은 JAK2-STAT3- KDM3A 신호 전달 경로를 표적으로 하는 암 치료제 스크리닝 방법을 제공한다. JAK2-STAT3은 세포 발달, 분화 및 항상성 조절에 필수적이다. 따라서 JAK2-STAT3 신호 전달 체계의 조절 장애는 사람의 악성 종양 형성과 연관되어있다. 본 발명에서는 KDM3A가 JAK2-STAT3 신호 전달 경로의 활성화를 위한 필수 후성 유전인자로서 역할 하는 것을 확인하였다. 구체적으로 KDM3A는 핵에서 JAK2에 의해 인산화 되고, 이는 STAT3 의존성 전사과정에서 보조 활성화 인자로서 기능한다는 것을 규명하였다. IL-6에 의해 유도 된 JAK2-KDM3A 신호 전달 체계는 JAK2-STAT3 신호 전달 경로의 활성화와 후성 유전 제어 사이의 기능적 및 물리적으로 연결하고, 이를 통해서 후성 유전 현상으로서 히스톤 H3K9 메틸화의 변화를 유도함을 발견하였다. 이는 본 발명은 KDM3A 인산화의 저해가 JAK2-STAT3 신호 전달 경로의 발암 효과를 제어하는 강력한 치료 전략이 될 수 있음을 보여준다.

도면의 간단한 설명

- [18] 도 1은 JAK2는 타이로신 1101 잔기에 KDM3A를 인산화시키는 것을 나타내는 결과이다. (A) LC-MS/MS에 의한 KDM3A상의 타이로신 인산화 부위의 동정. (B)

징크 핑거(ZF) 및 주만지(JmjC) 도메인을 나타내는 KDM3A의 개략도. 타이로신 잔기(Y, 적색으로 표시) 주변의 서열은 초파리(d), 쥐(m) 및 사람(h) 사이에서 보존됨. (C) HeLa 세포로부터 얻은 단백질을 추출물을 타이로신 인산화 항체로 풀다운 시키고, KDM3A의 인산화를 KDM3A 항체로 면역블롯하여 확인함. (D) 비변형된 KDM3A와 인산화 된 KDM3A 펩타이드의 도트블롯팅을 통하여 KDM3A (KDM3A-Y1101p) 인산화 항체의 작용을 확인함. (E) HeLa 세포에서 shRNA를 이용하여 KDM3A를 knock-down하고, shRNA에 내성을 갖는 HA-KDM3A WT (WT^R) 또는 HA-KDM3A Y1101A 돌연변이체 (YA^R)를 트랜스펙션함. KDM3A는 HA 항체를 사용하여 면역 침전시키고 KDM3A 인산화 항체로 면역블롯하여 분석함. (F 및 G) HeLa 세포에서 JAK1 (F) 또는 JAK2 (G)와 KDM3A의 면역침강법(Co-IP) 분석은 2시간 동안 IL-6 처리(50 ng/ml)의 유무에 따라 수행함. (H) JAK1 또는 JAK2와 인산화 된 KDM3A의 Co-IP 분석은 2시간 동안 IL-6로 처리 된 HeLa 세포에서 수행함. KDM3A의 인산화 정도는 KDM3A 인산화 항체를 이용한 면역블롯 분석에 의해 확인함. (I) shRNA를 이용하여 JAK2를 knock-down시킨 후, 2시간 동안 IL-6 처리를 하거나 하지않은 HeLa 세포에서 KDM3A 인산화 항체를 이용한 면역블롯 분석을 통해 KDM3A의 인산화 정도를 확인함. (J) JAK2의 야생형(WT), 지속적으로 활성화된 돌연변이체(CA) 또는 기능적으로 작동하지 않는 돌연변이체(DN)를 HeLa 세포에 트랜스펙션함. 세포 용해물을 KDM3A 항체로 면역 침강시킨 후 KDM3A 인산화 항체로 면역블롯 분석하여 인산화 된 KDM3A를 확인함. (K) 제조한 KDM3A 단백질을 이용한 JAK2 CA 또는 DN 돌연변이체를 이용한 in vitro 인산화 분석. (L-0) HeLa 세포를 IL-6(50 ng/ml)로 표시된 시간 동안 처리 하고, KDM3A의 인산화 수준을 JAK2 활성 억제제인 AG490(10 μ M) (L) 또는 TG101348(2.5 μ M) (M)와 Src 계열 억제제 PP2(10 μ M) (N) 또는 Abl 억제제 Asciminib(250nM) (O)의 처리 유무에 따라 KDM3A 인산화 항체로 면역블롯하여 확인함.

- [19] 도 2는 JAK2에 의한 KDM3A 인산화는 KDM3A의 탈메틸화 효소 활성을 증가시키는 것을 나타내는 결과이다. (A) IL-6 처리 후 HeLa 및 HEK293T 세포에서 H3K9me2의 정도를 분석함. (B) shRNA로 JAK2를 knock-down하고, IL-6의 처리 유무에 따른 H3K9me2의 정도를 면역블롯으로 확인함. (C) shRNA로 JAK2를 knock-down하고, IL-6의 처리 유무에 따른 H3K9me2의 정도를 면역염색법으로 확인한 대표적인 이미지. 세포를 H3K9me2 또는 JAK2 항체로 염색함. 핵은 DAPI로 표시함. 스케일 바, 10 μ m. (D) H3K9me2의 탈메틸화는 JAK2에 의해 유도되었고, KDM3A의 knock-down은 IL-6를 처리하였을 때 JAK2 의존적 H3K9me2의 탈메틸화가 망가지는 것을 확인함. (E) HeLa 세포를 KDM3A shRNA에 의해 knock-down시키고 shRNA 내성 형태의 KDM3A WT (WT^R) 또는 Y1101A (YA^R)를 트랜스펙션함. 트랜스펙션된 세포는 H3K9me2 및 Flag 항체로 염색함. 세포핵은 DAPI로 염색함. 화살표는 KDM3A를 발현하는 세포 및

H3K9me2의 정도를 나타냄. 스케일 바, 10 μ m. (F) IL-6에 의해 유도된 H3K9me2의 탈메틸화는 KDM3A에 의존함. HeLa 세포의 단백질을 추출물을 KDM3A shRNA로 knock-down시키고, KDM3A WTR 또는 YAR를 트랜스팩션하여 IL-6의 처리 유무에 따른 H3K9me2의 정도를 면역블롯으로 확인함. (G 및 H) 세포에서 gp130 매개 신호 전달 분자를 공유하는 IL-6를 제외한 Oncostatin M (OSM) (20 ng/ml) (G) 또는 IL-11 (5 ng/ml) (H), 등의 다른 사이토카인의 처리 후 H3K9me2의 정도를 HeLa 세포에서 확인 함.

- [20] 도 3은 KDM3A는 JAK-STAT 신호 전달 경로에서 STAT3의 전사적 보조 활성화인자로서 기능하는 것을 나타내는 결과이다. (A) IL-6 처리 유무에 따른 STAT3와 KDM3A 간의 상호작용을 HeLa 세포에서 공동 면역침강법으로 확인함. (B) ChIP 분석은 HeLa 세포에서 IL-6 처리 후 JAK2, STAT3 인산화, KDM3A 인산화 및 H3K9me2 항체를 사용하여 MYC 프로모터상에서 수행함. ** P <0.01, *** P <0.001 (Student's *t*-test). (C) HeLa 세포에서 IL-6 처리 후 shRNA로 KDM3A를 knock-down 후 MYC mRNA 발현의 정량적 RT-PCR 분석. *** P <0.001 (Student's *t*-test). (D) HeLa 세포에서 IL-6 처리 후 shRNA로 KDM3A를 knock-down 후 MYC 단백질의 면역블롯 분석. (E) HeLa 세포에서 IL-6의 처리 후 shRNA로 KDM3A를 knock-down 후 내성 형태의 KDM3A WTR 또는 YAR를 트랜스팩션하여 MYC mRNA 레벨을 정량적 RT-PCR로 확인함. * P <0.05 (Student's *t*-test). (F) HeLa 세포에서 IL-6의 처리 후 shRNA로 KDM3A를 knock-down 후 내성 형태의 KDM3A WTR 또는 YAR를 트랜스팩션하여 MYC 단백질 레벨을 면역블롯으로 확인함. (G-I) STAT에 반응하는 M67 프로모터-루시퍼레이즈 리포터 플라스미드로 HEK293T 세포에 표시와 같이 트랜스팩션함. 루시퍼레이즈 리포터 활성은 트랜스팩션 후 48시간에 측정되었고 β -갈락토시다아제 활성에 의해 표준화함. 세 번의 독립적인 실험을 진행. * P <0.05, ** P <0.01 (Student's *t*-test).

- [21] 도 4는 KDM3A 인산화는 세포 증식 및 이동성을 증가 시키는 것을 나타내는 결과이다. (A) HeLa 세포에서 shRNA로 KDM3A를 knock-down하고, IL-6의 처리 유무에 따른 스크래치-이동성 분석을 수행한 현미경 사진. 스크래치 봉합은 HeLa 세포에서 48시간 동안 24시간 간격으로 모니터링함. 세포 이동(%)은 우측 패널 그래프에 나타낸 바와 같이 스크래치 폭을 계산하여 정량화함. *** P <0.001 (Student's *t*-test). (B) HeLa 세포에서 shRNA로 KDM3A를 knock-down하고, IL-6의 처리 유무에 따른 세포증식을 6시간 간격으로 모니터링하여 확인함. 세포 배양 면적을 그래프에 나타낸 바와 같이 계산하여 증식 효율(%)을 정량화 하였다. *** P <0.001 (Student's *t*-test). (C) BrdU로 염색 된 세포의 대표적인 이미지. IL-6 처리 후 증가 된 BrdU 양성 (BrdU +) 세포의 비율은 shRNA에 의한 KDM3A의 knock-down 후 감소함. HeLa 세포에서 shRNA로 KDM3A를 knock-down 후 내성 형태의 KDM3A WTR 또는 YAR를 트랜스팩션한 후 IL-6의 처리 유무에 따른 BrdU 양성 (BrdU +) 세포를 면역염색법으로 확인함. 핵은 DAPI로 염색함.

스케일 바, 10 μ m. *** P < 0.001 (Student's *t*-test). (D) HeLa 세포에서 shRNA로 KDM3A를 knock-down하고, MYC을 함께 트랜스팩션하는 것의 유무와 IL-6의 처리 유무에 따른 세포의 콜로니 형성 분석. 세포를 고정시키고 크리스탈 바이올렛 용액으로 염색함. 콜로니 수는 그래프와 같이 정량화함. *** P < 0.001 (Student's *t*-test). (E) JAK2-KDM3A-STAT3 신호 전달 축을 묘사한 도식 모델. JAK2에 의한 KDM3A 인산화로 유도되는 H3K9 탈메틸화의 조절은 STAT3 표적 유전자의 전사 조절에서 가장 중요한 후성 유전 현상 중 하나임.

발명의 실시를 위한 형태

- [22] 본원은 KDM3A가 암세포에서 JAK2-STAT3 활성화를 위한 주요 후성 인자로 작용한다는 발견에 근거한 것이다. 구체적으로 KDM3A는 JAK2에 의해 1101 잔기에서 인산화되며, 인산화된 KDM3A는 히스톤 3 단백질(H3K9me2)에 대한 탈메틸화 활성의 감소와 함께 MYC과 같은 STAT3 표적 유전자의 전사 활성화를 위한 공동 활성인자로서 작용하여 암세포의 증식을 증가시킨다는 것을 규명하였다.
- [23] 이는 KDM3A 인산화의 저해가 JAK2-STAT3 신호 전달 경로의 발암 효과를 제어하는 암 발생 및/또는 진행을 억제하는 새로운 치료제 개발의 표적으로 작용할 수 있음을 나타낸다.
- [24] 따라서 한 양태에서 본원은 본원에서 규명된, 암의 발생 및/또는 진행에서 중요한 역할을 하는 JAK2-STAT3 경로에 작용하는 암 치료제 또는 세포 증식 억제제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.
- [25] 일 구현예에서 상기 방법은 JAK2(Janus tyrosine kinase 2)-STAT(Signal Transducer and Activator of Transcription 3) 신호전달 경로 이상과 관련된 암 치료용 물질 스크리닝 방법으로, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다: JAK2 단백질 및 상기 JAK2 단백질에 의해 인산화 될 수 있는 서열번호 1의 서열을 기준으로 1101번째 타이로신 잔기를 포함하는 KDM3A(lysine-specific demethylase 3A) 단백질을 상기 JAK2에 의한 상기 타이로신 잔기의 인산화를 억제할 것으로 기대되는 시험물질의 존재 중에서 배양하는 제1 단계; 상기 KDM3A 단백질의 타이로신 잔기의 인산화 정도를 측정하는 제2 단계; 및 상기 측정결과 시험물질로 처리되지 않은 대조군과 비교하여, 시험물질로 처리된 경우 상기 KDM3A 단백질의 인산화가 감소한 경우, 이를 암 세포의 성장을 억제할 수 있는 후보물질로 선별하는 제3 단계.
- [26] JAK2-STAT3 경로의 암과의 관련성 및 KDM3A과 암과의 관련성은 알려져 있으나 JAK2-STAT3 신호 전달 경로의 활성화를 위한 필수 후성 유전자로서의 KDM3A의 기능은 본원에서 처음 규명된 것이다. 구체적으로 활성화된 JAK2-KDM3A 신호 전달 캐스케이드는 주요한 후성적 이벤트인 H3K9 메틸화에 변화를 가져옴으로써 JAK2-STAT3 신호 전달 경로의 활성화와 후성 유전 제어 사이의 기능적 및 기계적 연결을 제공한다.

- [27] JAK2(Janus tyrosine kinase 2) 신호 전달자(transducer) 및 STAT3(activator of transcription 3) 신호전달 경로는 세포 발생, 세포 분화 및 항상성 조절에 필수적인 경로이다. 구체적으로 JAK2는 세포질 신호 전달 과정을 유도하는 비 수용체 타이로신 인산화 효소이며 JAK2는 인간 조혈 세포의 핵에도 존재하여 히스톤 H3Y41(히스톤 3의 41번 타이로신 잔기)의 직접적인 인산화 효소로 작용하는 것으로 알려져 있다. JAK2가 활성화되면 이는 전사 인자 STAT3를 활성화시킨다. STAT3은 JAK2에 의해 인산화되고 안정적인 동중 이량체 또는 이중 이량체를 형성하여 표적 유전자의 국지적 전사 활성화를 유도한다. 이러한 JAK2-STAT3 신호 전달 경로의 비정상적 반응은 자궁경부암, 난소암, 위암 및 유방암 등 다양한 종류의 암에서 비정상적인 세포 증식, 이동 및 항-세포 사멸을 유도하는 것으로 나타났다(Griffiths DS, *et al.* (2011) LIF-independent JAK signalling to chromatin in embryonic stem cells uncovered from an adult stem cell disease. *Nature cell biology* 13(1):13-21.; Marotta LL, *et al.* (2011) The JAK2/STAT3 signaling pathway is required for growth of CD44(+)CD24(-) stem cell-like breast cancer cells in human tumors. *The Journal of clinical investigation* 121(7):2723-2735.; Yu H, Kortylewski M, & Pardoll D (2007) Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nature reviews. Immunology* 7(1):41-51.).
- [28] 본원에서는 KDM3A가 JAK2-STAT3 신호 전달 경로의 활성화를 위해 필수적인 후성 유전인자로서 역할하는 것을 규명하였다. 구체적으로 KDM3A는 JAK2에 의해 서열번호 1의 서열을 기준으로 1101 번째 타이로신 잔기에서 인산화되며, 인산화된 KDM3A는 H3K9me2(9번째 잔기의 라이신이 메틸화된 히스톤 3)의 감소와 함께 MYC과 같은 STAT3 표적 유전자의 전사 활성화를 위해 STAT3-의존성 공동 활성인자로서 작용하여 암세포의 증식을 증가시킨다는 것을 규명하였다.
- [29] KDM3A(Lysine(K)-Specific Demethylase 3A)는 H3K9me1 또는 H3K9me2(히스톤 3의 9번째 라이신 잔기에 한 개 또는 두 개의 메틸화)를 탈메틸화(demethylation)시키는 단백질로서, 방광암이나 폐암을 포함한 여러 암에서 과발현되어 있다고 알려져 있다(Hyun-Soo Cho *et al.* International Journal of Cancer Int. J. Cancer: 131, E179-E189 (2012) VC 2011 UICC).
- [30] 본원에 따른 방법에 사용되는 JAK2, STAT3 및 KDM3A 유전자 및 단백질 서열은 공지된 것으로 예를 들면 인간 단백질 서열은 KDM3A: NP_060903.2; JAK2: NP_001309123.1; STAT3: NP_644805.1; HISTONE 3: AAN39284.1로 NCBI에 공지되어 있다. 단백질 서열이 알려지면, 핵산 서열은 이로부터 용이하게 도출될 수 있음은 당업자에게 자명한 것이다.
- [31] 일 구현예에서 상기 각 단백질 서열은 본원에서 각각 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3 및 서열번호 4로 개시된다.
- [32] 본원에 따른 방법에서는 상기와 같은 기능을 갖는 한 다양한 유래, 그리고 각

유래의 단백질 서열 및 이와 실질적으로 동일한 서열을 갖는 전장 또는 단편이 사용될 수 있다. 실질적으로 동일한 이란, 단백질 및 핵산 서열 수준에 모두 적용되며, 참조 또는 기준이 되는 서열과 비교하여, 염기 또는 아미노산 잔기에 하나 이상의 치환, 결손, 또는 부가가 있을 수 있으나, 전체적으로 볼 때 기능에 차이가 없거나 기능을 나쁘게하지 않는 수준의 기능을 갖는 것을 의미한다. 상동성은 대상이 되는 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 61%의 상동성, 보다 바람직하게는 70%의 상동성, 보다 더 바람직하게는 80%의 상동성, 가장 바람직하게는 90% 이상, 특히 95% 이상의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다. 서열비교를 위한 얼라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들면 Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* (1981) 2:482; Needleman and Wunsch, *J. Mol. Bio.* (1970) 48:443; Pearson and Lipman, *Methods in Mol. Biol.* (1988) 24: 307-31; Higgins and Sharp, *Gene* (1988) 73:237-44; Higgins and Sharp, *CABIOS* (1989) 5:151-3; Corpet et al., *Nuc. Acids Res.* (1988) 16:10881-90; Huang et al., *Comp. Appl. BioSci.* (1992) 8:155-65 및 Pearson et al., *Meth. Mol. Biol.* (1994) 24:307-31에 개시되어 있다. NCBI Basic Local Alignment Search Tool(BLAST)(Altschul et al., *J. Mol. Biol.* (1990) 215:403-10)은 NBCI 등에서 접근 가능하며, blast, blastp, blastm, blastx, tblastn 및 tblastx와 같은 서열 분석 프로그램과 연동되어 이용할 수 있다. BLSAT는 www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/에서 접속 가능하며, 이 프로그램을 이용한 서열 상동성 비교 방법은 www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_help.html에서 확인할 수 있다.

- [33] 일 구현예에서 상기 단백질은 이를 발현하는 세포의 형태로 제공될 수 있다.
- [34] 예를 들면 단백질을 발현(Transient 또는 Stable 전달이입 또는 내인성 발현)하는 포유류 세포, 예를 들면 이로 제한하는 것은 아니나, 상기 단백질이 발현되며, 작용할 수 있는 암 세포가 사용될 수 있으며 예를 들면 인간을 포함한 포유류와 같은 동물에서 채취한 것 또는 확립된 세포주를 사용할 수 있다.
- [35] 일 구현예에서는 진핵세포가 사용된다. 다른 구현예에서는 암세포 또는 암세포주가 사용되며, 예를 들면 Hela 또는 HEK293 세포주가 사용될 수 있다. 상기 세포주는 상기 단백질을 발현하는 플라스미드를 공지된 방법 또는 본원의 실시에 기재된 방법을 이용하여 전달이입하여 사용할 수 있다.
- [36] 본원에 따른 상기 방법에서 자극 존재시 JAK2-STAT 경로가 활성화되면, JAK2는 KDM3A 단백질의 1101 잔기를 인산화시킨다. 따라서, 일 구현예에서 본원에 따른 방법에서, JAK2-STAT3 신호전달 경로의 억제는 상기 JAK2에 의한 KDM3A 단백질의 인산화 감소 또는 억제로 측정될 수 있다.
- [37] 본원에 따른 방법에서 인산화 억제 정도는 공지된 방법을 이용하여 측정될 수 있으며, 예를 들면 단백질 블랏 방법을 이용하여 확인할 수 있다. 일 구현예에서는 항체가 사용될 수 있다. KDM3A 단백질의 인산화된 1101 잔기를

특이적으로 인식할 수 있는 항체가 사용될 수 있다. 또한 대조군 또는 비교군으로서 상기 인산화된 1101 잔기를 특이적으로 인식하지 않는 공지의 항체가 사용될 수 있다. 대조군(시험물질을 처리하지 않은 경우)와 비교하여, KDM3A 단백질의 인산화 정도를 억제한 것을 치료제 후보물질로 선별할 수 있다. 이 경우 단백질은 검출의 편이를 위해 다양한 표식물질, 예를 들면 단백질 태그, 바이오틴, 형광물질, 아세틸화, 방사선 동위원소와 같은 것으로 공지된 방법 또는 시중의 단백질 표지 키트를 사용하여 표지될 수 있으며, 표지된 물질에 적합한 검출기기를 사용하여 검출될 수 있다.

- [38] 또한 상기 KDM3A는 H3K9을 탈메틸화 시키기 때문에, 상기 JAK2-STAT 신호전달 신호 전달 경로의 억제는 또한 KDM3A의 메틸화된 H3K9에 대한 탈메틸화 활성 감소, 즉 메틸화된 H3K9의 탈메틸화 감소로 측정될 수 있다.
- [39] 본원에 따른 방법에서 메틸화 또는 탈메틸화의 검출은 공지된 방법을 이용하여 수행될 수 있으며, 예를 메틸화된 단백질 또는 탈메틸화된 단백질을 특이적으로 인식하는 항체의 사용을 포함하나 이로 제한하는 것은 아니며, 또한 본원 실시예를 참조할 수 있다.
- [40] 또한 상기 JAK2에 의해 인산화된 KDM3A는 STAT3 단백질에 대한 보조인자로서의 활성을 갖기 때문에, 상기 JAK2-STAT 신호전달 신호 전달 경로의 억제는 또한 상기 STAT3 단백질의 전사 활성의 감소로 측정될 수 있다. STAT3 단백질은 전사인자(Transcription Factor)로서 STAT이 결합할 수 있는 프로모터에 결합하여 이에 작동가능하게 연결된 유전자의 전사 RNA로의 발현을 촉진하며, 인산화된 KDM3A 이 과정에서 보조인자(cofactor)로 작용한다.
- [41] 본원에 따른 방법에서 STAT3 단백질에 대한 보조인자로서의 활성은 따라서 STAT3 단백질의 전사 활성으로 측정될 수 있으며, 이러한 방법은 본원 실시예 및 기술분야의 지식을 고려하여 수행될 수 있다. 예를 들면 STAT3 프로모터를 표적 유전자 예를 들면 Myc에 작동가능하게 연결된 플라스미드가 사용될 수 있으며, 상기 플라스미드로부터의 전사 활성은 표적 mRNA의 양을 결정하는 다양한 방법 예를 들면 역전사 PCR 방법 등을 통해 검출될 수 있으나, 이로 제한하는 것은 아니다.
- [42] 본원에 따른 방법에서 JAK2-STAT 신호전달 경로는 활성화될 수 있다. 특히 본원에 따른 방법이 세포에서 수행될 때, JAK2-STAT 신호전달 경로는 활성화될 수 있다. 일 구현예에서는 glycoprotein 130(gp130) 수용체를 매개로 하는 JAK2-STAT 신호전달 경로의 활성화에 작용하는 물질이 사용되며, gp130 매개 신호 전달 분자를 공유하는 물질은 JAK2-STAT 신호전달 경로를 활성화에 유사한 기능을 나타낸다(Sriram K *et al.*, The Journal of Biological Chemistry 279, 19936-19947, 2004). 따라서 상기 효과를 갖는 공지된 다양한 물질이 활성화에 사용될 수 있으며, IL(Interleukin)-6, IL-11 또는 Oncostatin M(Osm)이 사용될 수 있다. 다른 구현예에서는 IL-6가 사용될 수 있다.
- [43] 본원에 따른 방법에서는 KDM3A를 경유하는 JAK2-STAT 경로를 억제할

것으로 기대되는 시험물질로 처리된다. 상기 경로의 억제는 상술한 바와 같은, KDM3A 단백질의 인산화 감소 또는 억제, STAT3 단백질의 전사 활성이 감소 또는 억제, H3K9 단백질의 탈메틸화 감소 또는 억제의 하나 이상의 방법으로 측정될 수 있다. 시험물질로 처리되지 않은 대조군과 비교하여 억제 또는 감소를 의미하며, 당업자라면 본원에 개시된 내용 및/또는 당업계의 상식을 근거로 억제 또는 감소된 정도를 쉽게 결정할 수 있을 것이다.

- [44] 본원의 방법에 사용되는 시험물질은 JAK2-STAT 경로 신호전달시스템에 작용하여 KDM3A의 인산화를 감소시켜 H3K9의 탈메틸화를 조절 특히 억제할 것으로 기대되는 물질 또는 STAT3 단백질의 보조인자로서의 활성을 억제할 것으로 기대되는 저분자량 화합물, 고분자량 화합물, 화합물들의 혼합물(예컨대, 천연 추출물 또는 세포 또는 조직 배양물), 또는 바이오의약품(예컨대, 단백질, 항체, 펩타이드, DNA, RNA, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, RNAi, 앵타머, RNAzyme 및 DNAzyme) 또는 당 및 지질 등을 포함하나 이로 한정하는 것은 아니다.
- [45] 본원에 따른 일 구현예에서는 저분자화합물이 시험물질로 사용될 수 있다. 상기 시험 물질은 합성 또는 천연 화합물의 라이브러리로부터 얻을 수 있으며 이러한 화합물의 라이브러리를 얻는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 합성 화합물 라이브러리는 Maybridge Chemical Co.(UK), Comgenex(USA), Brandon Associates(USA), Microsource(USA) 및 Sigma-Aldrich(USA)에서 구입 가능하며, 천연 화합물의 라이브러리는 Pan Laboratories(USA) 및 MycoSearch(USA)에서 구입 가능하다. 시험 물질은 당업계에 공지된 다양한 조합 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있으며, 예를 들어, 생물학적 라이브러리, 공간 어드레서블 패러렐 고상 또는 액상 라이브러리(spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries), 디컨볼루션이 요구되는 합성 라이브러리 방법, "1-비드 1-화합물" 라이브러리 방법, 그리고 친화성 크로마토그래피 선별을 이용하는 합성 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있다. 분자 라이브러리의 합성 방법은 DeWitt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 6909, 1993; Erb et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91, 11422, 1994; Zuckermann et al., J. Med. Chem. 37, 2678, 1994; Cho et al., Science 261, 1303, 1993; Carell et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33, 2059, 1994; Carell et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33, 2061; Gallop et al., J. Med. Chem. 37, 1233, 1994 등에 개시되어 있다. 예를 들면 약물의 스크리닝 목적을 위해서는 화합물은 저분자량의 치료효과를 갖는 것이 사용될 수 있다. 예를 들면 중량이 400 Da, 600 Da 또는 800 Da과 같은 약 1000 Da 내외의 화합물이 사용될 수 있다. 목적에 따라 이러한 화합물은 화합물 라이브러리의 일부를 구성할 수 있으며, 라이브러리를 구성하는 화합물의 숫자도 수십개부터 수백만개까지 다양하다. 이러한 화합물 라이브러리는 펩타이드, 펩토이드 및 기타 환형 또는 선형의 올리고머성 화합물, 및 주형을 기본으로 하는 저분자 화합물, 예컨대 벤조디아제핀, 하이단토인, 바이아릴, 카보사이클 및 폴리사이클 화합물(예컨대

나프탈렌, 페노티아진, 아크리딘, 스테로이드 등), 카보하이드레이트 및 아미노산 유도체, 디하이드로피리딘, 벤즈하이드릴 및 헤테로사이클(예컨대 트리아진, 인돌, 티아졸리딘 등)을 포함하는 것일 수 있으나, 이는 단지 예시적인 것으로 이로 한정되는 것은 아니다.

[46] 또한 예를 들면 바이올로지스가 스크리닝에 사용될 수 있다. 바이올로지스는 세포 또는 바이오분자를 일컫는 것으로, 바이오분자란, 단백질, 핵산, 탄수화물, 지질 또는 생체내 및 생체외에서 세포 시스템 등을 이용하여 생산된 물질을 일컫는 것이다. 바이오분자를 단독으로 또는 다른 바이오분자 또는 세포와 조합으로 제공될 수 있다. 바이오분자는 예를 들면, 폴리뉴클레오타이드, 펩타이드, 항체, 또는 기타 혈장에서 발견되는 단백질 또는 생물학적 유기물질을 포함하는 것이다.

[47] 실험결과 시험물질과 접촉되지 않은 대조군과 비교하여 시험물질의 존재하에서 KDM3A의 인산화 감소, H3K9의 탈메틸화를 억제하는 물질 또는 STAT3 단백질의 보조인자로서의 활성을 억제하는 물질을 후보 물질로 선별한다. 대조군과 비교 약 10% 이상, 약 20% 이상, 약 30% 이상, 약 40% 이상, 약 50% 이상, 약 60% 이상, 약 70% 이상, 약 80% 이상, 약 90% 이상, 또는 약 100% 이상, 또는 이 이상이 감소된 것을 후보물질로 선별할 수 있다.

[48] 본원에 사용되는 단백질은 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 특히 유전자 재조합 기술을 이용하는 것이다. 예를 들면 상기 단백질을 코딩하는 상응하는 유전자를 포함하는 플라스미드를 원핵 또는 진핵세포 세포 예를 들면 곤충세포, 포유류 세포에 전달하여 과발현시킨 후 정제하여 사용할 수 있다. 상기 플라스미드는 예를 들면 본원의 예시적 구현예에서 사용한 것과 같은 동물 세포주에 트랜스팩션한 후, 발현된 단백질을 정제하여 사용할 수 있으나, 이로 제한하는 것은 아니다. 이 경우 단백질은 검출의 편이를 위해 다양한 표식물질, 예를 들면 바이오틴, 형광물질, 아세틸화, 방사선 동위원소와 같은 것으로 공지된 방법 또는 시중의 단백질 표지 키트를 사용하여 표지될 수 있으며, 표지된 물질에 적합한 검출기기를 사용하여 검출될 수 있다.

[49] 또는 스크리닝 단백질을 암호화하는 DNA 또는 RNA 서열을 적당한 숙주 세포에서 발현시켜 그 세포 파쇄물을 만들거나 상기 스크리닝 단백질의 mRNA를 시험관내에서 번역한 후 당업계에 공지된 단백질 분리 방법에 의해 스크리닝 단백질을 정제할 수 있다. 통상, 세포잔여물(cell debris) 등을 제거하기 위해 상기 세포 파쇄물 또는 시험관내 번역한 결과물을 원심분리한 후, 침전, 투석, 각종 컬럼 크로마토그래피 등을 적용한다. 이온교환 크로마토그래피, 겔-퍼미에이션 크로마토그래피, HPLC, 역상-HPLC, 프렘용 SDS-PAGE, 친화성 컬럼 등은 컬럼 크로마토그래피의 예이다. 친화성 컬럼은, 예를 들어, 항-스크리닝 단백질 항체를 이용하여 만들 수 있다.

[50] 그 외 상기 방법에 사용되는 시험물질의 종류 등은 앞서 언급한 바를 참조할 수 있다.

- [51] 본원에 따른 방법에 의해 선별된 후보물질은 조절되지 않은 세포 성장의 억제 또는 암 치료제로 개발/사용될 수 있다.
- [52] 본원에서는 JAK-STAT 신호전달 이상에 의한 암은 이로 제한하는 것은 아니지만, 고형암, 특히 자궁경부암이다.
- [53] 본원에서 사용된 용어 "치료"란 질환, 또는 질환으로 인한 증상 또는 상태의 억제, 제거, 경감, 완화, 개선, 및/또는 예방을 포함하는 개념이다.
- [54] 또 다른 양태에서 본원은 1101번째 타이로신 잔기가 인산화된 KDM3A를 특이적으로 인식하는 항체에 관한 것이다.
- [55] 본원에서는 본원 도 1의 D 등에 나타난 바와 같이 KDM3A가 1101번 라이신 잔기에서 특이적으로 인산화되고, 본원에 따른 항체는 교차 반응성이 없이, 상기 인산화된 KDM3A를 특이적으로 인식하는 것으로 나타났으며, 상기 잔기가 타이로신으로 변이된 KDM3A는 인식하지 않아, 특이성이 매우 뛰어나다.
- [56] 본 발명의 항체는 완전한 항체, 항체분자의 항원결합 단편 및 이들과 기능적으로 동등한 항체 또는 단편을 포함하는 것이다. 또한 본 발명의 항체는 IgG, IgM, IgD, IgE, IgA 또는 IgY 타입일 수 있으며, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 또는 IgA2 클래스 또는 그 하부클래스일 수 있다. 본 발명의 항체는 모노클로날, 폴리클로날, 키메라, 단쇄, 이특이성, 유인원화 및 인간화된 항체 및 이의 활성 단편을 포함하는 것이다.
- [57] 완전한 항체는 2개의 경쇄 및 2개의 중쇄를 가지는 구조이며 각각의 경쇄는 중쇄와 다이설파이드 결합으로 연결되어 있다. 중쇄 불변 영역은 감마(γ), 뮤(μ), 알파(α), 델타(δ) 및 엡실론(ϵ) 타입을 가지고 서브클래스로 감마1(γ 1), 감마2(γ 2), 감마3(γ 3), 감마4(γ 4), 알파1(α 1) 및 알파2(α 2)를 가진다. 경쇄의 불변영역은 카파(κ) 및 람다(λ) 타입을 가진다(Cellular and Molecular Immunology, Wonsiewicz, M. J., Ed., Chapter 45, pp. 41-50, W. B. Saunders Co. Philadelphia, PA(1991); Nisonoff, A., Introduction to Molecular Immunology, 2nd Ed., Chapter 4, pp. 45-65, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA (1984)).
- [58] 항원에 결합하는, 항체의 항원 결합 단편 또는 활성 단편의 예는 Fv, ScFv, Fab, Fab' 및 F(ab')₂를 포함한다. 항체 단편 중 Fab는 경쇄 및 중쇄의 가변영역과 경쇄의 불변 영역 및 중쇄의 첫 번째 불변영역(CH1)을 가지는 구조로 1개의 항원 결합 부위를 가진다. Fab'는 중쇄 CH1 도메인의 C-말단에 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 힌지 영역을 가진다는 점에서 Fab와 차이가 있다. F(ab')₂ 항체는 Fab'의 힌지 영역의 시스테인 잔기가 다이설파이드 결합을 이루면서 생성된다. sFv는 중쇄 가변부위 및 경쇄 가변부위만을 가지고 있는 최소의 항체조각으로 Fv 단편을 생성하는 제조합 기술은 PCT 국제 공개특허출원 WO 88/10649, WO 88/106630 등에 개시되어 있다. 이중쇄 Fv(two-chain Fv)는 비공유 결합으로 중쇄 가변부위와 경쇄 가변부위가 연결되어 있고 sFv(single-chain Fv)는 일반적으로 펩타이드 링커를 통하여 중쇄의 가변 영역과 단쇄의 가변 영역이 공유 결합으로 연결되거나 또는 C-말단에서 바로 연결되어 있어서

이중쇄 Fv와 같이 다이머 구조를 이룰 수 있다. 이러한 항체 단편은 단백질 가수분해 효소를 이용해서 얻을 수 있고(예를 들어, 전체 항체를 파파인으로 제한 절단하면 Fab를 얻을 수 있고 펩신으로 절단하면 F(ab')₂ 단편을 얻을 수 있다), 유전자 재조합 기술을 통하여 제작할 수 있다. 이러한 방법에 관한 자세한 사항은 예를 들면 Khaw, B. A. *et al.* J. Nucl. Med. 23:1011-1019 (1982); Rousseaux *et al.* Methods Enzymology, 121:663-69, Academic Press (1986)에 기재된 것을 참조할 수 있다.

- [59] 용어 “기능적으로 동등한 항체”는 적어도 하나의 주요한 기능적 특성, 즉 1101번째 잔기가 인산화된 KDM3A 효과를 나타내는 기타 변이를 포함하는 인산화된 KDM3A를 특이적으로 인식할 수 있는 항체로 상기 언급한 임의의 타입, 클래스 또는 단편을 포함하며, 다양한 방법 예컨대 파아지 디스플레이, 임의의 개체 및 세포 예를 들면 박테리아, 곤충세포, 포유류 세포 등 목적하는 항체를 생산할 수 있는 다양한 방법에 의해 생산되는 항체를 포함하는 것이다.
- [60] 본 발명의 항체는 동물 혈청, 세포배양물 또는 재조합 DNA 기술로 수득될 수 있다.
- [61] 본 발명의 한 구현예에서 본 발명의 항체는 폴리클론 항체로, 폴리클론 항체의 제조방법은 기술분야에 공지되어 있다.
- [62] 본 발명의 한 구현예에서 본 발명의 항체는 모노클론 항체이다. 모노클론 항체의 제조방법은 기술분야에 공지되어 있으며 전통적인 클로닝 및 세포융합 방법을 통하여 제조될 수 있다. 통상적으로 항원을 야생형 마우스 또는 인브리드 마우스(BALB/c 또는 C57BL/6), 래트, 토끼 또는 기타 포유류 또는 야생형 또는 인간 항체를 제조할 수 있도록 조작된 형질전환 마우스에 투여(예를 들면 피하 또는 복강투여)한다. 항원은 단독으로 또는 애주번트와 함께 투여할 수 있으며, 항원은 벡터에서 발현되도록 하거나, DNA 또는 면역반응을 유도할 수 있는 융합단백질의 형태로 도입될 수 있다. 융합단백질은 면역반응을 유도할 수 있는 펩타이드를 포함하며, 예를 들면 베타갈락토사이드이즈, 글루타치온, S-트랜스퍼라제, 키홀림펩토헤모시아닌(KLH) 및 소태아혈청과 같은 담체 단백질을 포함한다. 동물을 이러한 항체로 2-3회 부스트 한 후에 지라를 추출하고 이를 미엘로마 세포주(예를 들면 미국 ATCC사의 SP2/O)와 폴리에틸렌글리콜과 같은 융합촉진제의 존재하에서 융합하여 하이브리도마 세포주를 생성할 수 있으며, 보다 자세한 방법은 Kohler and Milstein. Nature 256: 495-497 (1975) 및 Harlow and Lane. Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1988)을 참조할 수 있다.
- [63] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위해서 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐 본 발명이 하기의 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [64] 실시예
- [65] 실험방법 및 재료

[66] 세포 배양 및 시약

[67] 세포를 37°C, 5% (v/v) CO₂의 환경에서 배양 하였다. HEK293T와 HeLa 세포는 페니실린(100 U/mL) 및 스트렙토 마이신(100 µg/mL)로 Dulbecco's modified Eagle's 배지(DMEM, Welgene)에 10% FBS(Gibco)로 배양하였다. IL-6(R&D system, 50 NG/mL), OSM(R&D system, 20 NG/mL), IL-11(R&D system, 5 NG/mL) AG490(Sigma 10µM) TG101348(Selleckchem, 2.5µM), Asciminib(Selleckchem, 250 nM) 또는 PP2(Sigma, 10µM)를 지시 된 시간 동안 처리하였다. JAK1(# 3332), JAK2(# 3230), phospho-STAT3(# 9131) 및 H3K9me2(# 9753, # 4658, ab1220) (Cell Signaling Technology, Abcam); STAT3(sc-8019) (Santa Cruz); KDM3A(nb100-77282) (Novus); phospho-Tyrosine 4G10(05-1050) (Millipore); HA(MMS-101R) (Covance); 및 FLAG(F3165, Sigma).

[68] 본원에서 1101번째 잔기가 인산화된 KDM3A를 특이적으로 인식하는 항체는 본원에서 처음으로 제조되었다. 상기 항체는 4mg의 펩타이드 KM-pY-NAYGLI (서열번호 1을 기준으로 1101번째 타이로신 잔기가 인산화된 펩타이드)를 항원으로 하여 토끼에서 제조되었으며 Peptron(대한민국)에 의뢰하여 제작하였다.

[69] 리포터 분석

[70] 루시퍼 레이즈 시스템(Promega)을 사용하여, M67 (4X-STAT 반응 요소)-루시퍼 레이즈 활성을 트랜스팩션 후 48시간에 루미노미터를 사용하여 측정하고 β-갈락토시다아제 활성으로 표준화시켰다. 최소 3회 독립적인 실험을 수행하였다.

[71] Quantitative RT-PCR

[72] qRT-PCR 분석을 위해 Trizol(Invitrogen)을 사용하여 총 RNA를 추출하고 RevertAid™ Reverse Transcriptase(Enzymomics)를 사용하여 역전사 시켰다. 하기 프라이머를 PCR 반응에 사용 하였다: hMYC: 정방향 5'-GAAGACGGGCTCCTTTGA-3', 역방향 5'-CAGCACTAAGCTCTGATACA-3'; hHPRT; 정방향 5'-TGACACTGGCAAAACAATGCA-3', 역방향 5'-GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT-3'; SYBR Green(Molecular Probes)을 갖는 ABI 프리즘 7300 시스템에 의해 mRNA를 검출하여 분석하였다.

[73] ChIP assay

[74] hMYC의 STAT 결합 요소에 대한 다음 ChIP 프라이머를 PCR 반응에 사용하였다: 정방향 5'-GCCTCTGGCCAGCCCTCCCGCTGAT-3', 역방향 5'-GCAAAGTGCCCGCCCGCTGCTATGG-3'.

[75] LC-MS/MS에 의한 인산화 부위의 동정

[76] KDM3A의 Tryptic digest는 nanoelectrospray LC-MS/MS로 분석하였다. 고압 액체 크로마토 그래피 분리는 Famous Autosampler(LC Packings)가 장착된 Ultimate 기기에서 수행되었다. 컬럼은 외경이 360µm 이고 내경이 75µm 인 용융 실리카 모세관으로 구성되었으며 직경이 5µm 인 300-Å C18 구슬(Grace Vydac)을

사용하여 길이 15cm를 사용하였다. 나노 컬럼의 출구는 원위 코팅 된 실리카 PicoTip 바늘에 인라인으로 연결되었다(New Objective). 용매 시스템은 용매 A(0.1% 포름산 및 5% 아세트 니트릴) 및 용매 B(0.1% 포름산 및 90% 아세트 니트릴)로 구성되었다. 구배는 50분에 걸쳐 0~40% 용매 B, 이어서 5분 동안 90% 용매 B에서 선형이었다. 탠덤 질량 스펙트럼은 정보 의존적 획득 모드에서 API QSTAR Pulsar Q-TOF 질량 분석기(Applied Biosystems)에 기록되었다. MS/MS 스펙트럼은 마스코트(Matrix Science)를 사용하여 National Center for Biotechnology Information 및 발현 된 서열 태그 데이터베이스를 검색하기 위해 사용되었다. 확인 된 인산화 펩타이드는 수동으로 검증하였다.

[77] 면역 세포 염색법

[78] HeLa 세포를 커버 슬립상에서 배양시키고 PBS로 세척하였다. 세포를 실온에서 10분간 2% 파라포름 알데히드로 고정시키고 0.5% Triton X-100으로 3회 투과성을 만들었다. Blocking 후, Flag, JAK2 및 H3K9me2 항체를 각각 Alexa Fluor 594 및 488 마우스 및 토끼 IgG 표지 키트(Molecular Probe)로 표지하였다.

[79] In vitro cell motility assay

[80] Wound healing scratching motility assay는 pLKO.1 대조군 벡터 또는 pLKO.1-shKDM3A로 트랜스펙션된 HeLa 세포에서 수행하였다. 세포를 6-well 배양 플레이트에 접종하고 합류 할 때까지 배양하였다. 세포를 200 μ l 마이크로 피펫 팁으로 긁어내고 37°C에서 48시간 동안 배양했다. EVOS xl 투과광 현미경(AMG, Bothell, WA)을 사용하여 0시간, 24시간 및 48시간에 폐쇄 된 갭의 현미경 사진을 촬영하였다. 세포의 이동 거리는 그래프 프리즘 소프트웨어를 사용하여 갭 거리에 의해 정량화 하였다.

[81] 세포 증식 분석

[82] pLKO.1 벡터 또는 pLKO.1-shKDM3A를 lipofectamine 시약에 의해 HeLa 세포로 트랜스펙션시켰다. 트랜스펙션 하루 뒤에 IL-6의 처리 유무를 구분하고, 세포를 분리하여 24-well 플레이트에서 계대 배양하였다. JuLiTM stage 라이브 영상 장비(NanoEnTek Inc)를 사용하여 각 6시간 동안 세포 증식정도를 계수하고 제조사 가이드에 따라 JuLiTM STAT 소프트웨어로 분석하였다.

[83] 통계분석

[84] 시험 샘플과 대조 샘플 사이의 통계적 차이는 Student's *t*-test에 의해 결정되었다. ANOVA는 여러 샘플의 비교를 수행했다. 그래프의 막대 그래프는 평균 $\pm$ s.e.m을 나타낸다. Graphpad Prism software가 모든 분석에 사용되었다.

[85] **실시예 1. JAK2에 의한 KDM3A의 타이로신 1101 잔기의 인산화**

[86] 액체 크로마토 그래피-질량 분석/질량 분석(LC-MS/MS) 분석에 따르면 KDM3A는 타이로신 1101(Y1101) 잔기에 인산화되었다(도 1A). 흥미롭게도, Y1101 잔기와 KDM3A의 주변 아미노산은 중간에 잘 보존되어있다(도 1B). 인산화 타이로신 특이적 항체를 이용한 공동면역침강(Co-IP) 분석은 KDM3A가 타이로신 잔기에 인산화됨을 보여준다(도 1C). 따라서 우리는 Y1101

잔기(KDM3A-Y1101p)에서 인산화된 KDM3A에 특이적 항체를 제작하고 면역블롯 분석(도 1D)에 의해 교차 반응이 일어나지 않는 것과 효능을 확인하였다. KDM3A-Y1101 인산화 항체를 이용하여 우리는 1101번째 아미노산 잔기 타이로신이 알라닌으로 대체 된 KDM3A의 Y1101A(YA) 돌연변이 형태의 경우 KDM3A의 타이로신 인산화가 나타나지 않는 것을 발견했다(도 1E). 이들 데이터는 KDM3A가 Y1101 타이로신 잔기에서 인산화됨을 나타낸다.

- [87] 다음으로 우리는 KDM3A 인산화를 담당하는 상위 타이로신 인산화 효소들을 탐색하기로 결정했다. KDM3A가 주로 핵 내에 국한되어 존재하기 때문에 우리는 핵 내에 존재하는 타이로신 인산화 효소들을 모색했다. JAK1, JAK2, Src, Abl1이 핵과 세포질에 존재하기 때문에 핵에서 KDM3A를 인산화시킬 수 있다는 가설을 세웠다. 면역침강 데이터는 KDM3A가 JAK 활성화 및 핵으로의 이동에 대한 잘 알려진 상위 생리학적 신호인 IL-6의 존재 하에 JAK1 및 JAK2 둘 모두에 결합함을 확인하였다(도 1F 및 G). 다음으로 우리는 IL-6 처리에 의해 활성화 된 JAK1 또는 JAK2가 KDM3A 인산화를 유도하는지 조사하였다. 우리는 JAK2가 IL-6 처리 후에 KDM3A 타이로신 인산화를 증가시키는 것을 발견했지만 JAK1에 의해서는 KDM3A 인산화가 증가되지 못하는 것을 확인하였다(도 1H). 이는 KDM3A Y1101 타이로신 잔기의 인산화가 JAK2 특이적인 작용이라는 것을 나타낸다. 또한 IL-6 처리 후에 KDM3A-Y1101 인산화 항체로 확인하였을 때 KDM3A의 인산화가 유도되었지만, JAK2를 knock-down하게 되면 IL-6 처리하여 JAK2에 의해 유도되는 KDM3A 인산화가 망가지는 것을 확인하였다(도 1I).

- [88] JAK2 효소 활성이 KDM3A 인산화에 중요한지 알아보기 위해 HeLa 세포에서 JAK2의 야생형(WT), 지속적으로 활성화 된 V617F 돌연변이체(CA) 및 인산화-비활성 돌연변이체(DN)를 비교하여 분석하였다. JAK2 WT 및 CA 돌연변이체는 *in vivo*(도 1J) 및 *in vitro*(도 1K) 모두에서 KDM3A에 대해 인산화 활성을 나타낸 반면, DN 돌연변이체에서는 인산화 활성이 나타나지 않았다. 실제로 IL-6에 의해 유도된 KDM3A 인산화는 JAK2 저해제 인 AG490 및 TG101348(도 1L 및 M)를 처리하였을 때 사라지는 것을 확인하였지만, Src 계열 저해제 인 PP2(도 1N) 또는 Abl 저해제 인 Asciminib(도 1O)등의 다른 저해제로는 인산화가 거의 사라지지 않았다. 종합해 보면, 이 데이터를 통해서 핵 내에서 KDM3A가 JAK2에 의해 타이로신에 인산화되는 것을 *in vivo* 및 *in vitro* 모두에서 확인하였다.

- [89] 실시예 2. IL-6에 의해 유도 된 KDM3A 인산화에 의한 탈메틸화 효소 활성 증가

- [90] JAK2가 인간 조혈 세포에서 전사 활성화를 위한 STAT 표적 유전자로부터 HP-1 α 를 배제하는 것으로 알려져 있지만 JAK2 신호 전달이 KDM3A-의존성 H3K9 탈메틸화(전사적 활성 마커)를 조절하는지 여부는 아직 밝혀지지 않았다. 따라서 본 발명에서는 IL-6 처리 시 H3K9me2의 메틸화 정도가 변화하는지 여부를 확인하기 위해 IL-6 처리에 의해 KDM3A의 JAK2 의존성 인산화가

유도된다는 사실을 확인하였다. 실제로, H3K9me2는 증가된 KDM3A 인산화 및 STAT3 인산화와 함께 HeLa 및 HEK293T 세포에서 IL-6 처리 동안 감소되었다(도 2A). 다음으로, IL-6에 의해 활성화가 유도된 JAK2가 H3K9me2 레벨 감소의 원인인지 여부를 조사하였다. 실제로, IL-6 처리하면 H3K9me2 레벨이 감소했지만, shRNA에 의해 JAK2를 knock-down한 경우에는 IL-6 처리를 하여도 H3K9me2 레벨의 감소가 나타나지 않는 것을 면역침강법(도 2B) 및 면역염색 분석법(도 2C)으로 확인하였다.

[91] 또한 JAK2에 의해 매개되는 H3K9의 탈메틸화가 KDM3A에 의존하는지 여부를 조사하였다. IL-6 처리에 의해서 JAK2 의존적인 H3K9me2 레벨의 감소는 KDM3A를 knock-down한 경우에는 나타나지 않았다(도 2D). JAK2에 의한 KDM3A의 인산화가 본질적인 히스톤 탈메틸화 활성화에 영향을 미치는지 여부를 시험하기 위해, KDM3A knock-down한 세포에서 shRNA 내성 형태의 KDM3A WT^R 또는 YA^R 돌연변이를 트랜스팩션했다. 흥미롭게도, KDM3A의 YA 돌연변이체는 KDM3A의 WT에 비해 H3K9me2에 대한 효소 활성이 현저히 감소하는 것을 면역 염색 분석법으로 확인하였다(도 2E). 또한, KDM3A WT^R 또는 YA^R 돌연변이를 IL-6 처리 여부에 따라 KDM3A knock-down 세포에 도입시켰을 때, H3K9me2의 레벨은 IL-6 처리 한 경우에만 KDM3A WT에서 감소했지만 YA 돌연변이체에서는 감소하지 않았다(도 2F).

[92] 또한 IL-6 외에 다른 사이토카인을 세포에 처리하여 H3K9me2 레벨의 감소와 함께 KDM3A 인산화를 유도하는지 여부를 조사했다. 실제로, KDM3A 인산화는 STAT3 활성화의 다른 자극 신호인 Oncostatin M(OSM) 및 IL-11에 의해서도 H3K9me2의 탈메틸화와 함께 유도되었다(도 2G 및 H). IL-6, IL-11 및 OSM은 수용체로서 gp130 매개 신호 전달 분자를 공유하므로, 이들은 KDM3A 인산화에 유사한 효과를 나타내는 것으로 나타났다. 그러나 각 STAT3 활성화 자극에 의해 특정한 작용 방식과 하위 표적 유전자가 차별적으로 조절 될 수 있는 가능성을 배제 할 수 없다. 이러한 데이터는 KDM3A의 JAK2 의존적인 타이로신 인산화가 향상된 효소 활성을 유도하여 H3K9me2 레벨을 감소시킨다는 것을 나타낸다.

[93] 실시예 3. JAK2-STAT3 신호 전달 경로에서 KDM3A의 전사 보조 활성화 인자로서의 기능 규명

[94] JAK2는 STAT3와 상호작용을 통해 STAT3 표적 유전자를 활성화 시킨다. 활성화된 JAK2는 핵으로 이동하여 전사 활성화를 위해 STAT3 인산화를 유도한다. 또한, 핵으로 들어간 JAK2는 핵 내의 STAT3 이외에 히스톤과 같은 다른 특정 기질에 작용함으로써 종양유발 인자로서 기능하는 것으로 알려져 있다. 인산화된 KDM3A가 JAK2-STAT3 신호 전달 경로의 전사 보조 활성화제로서 기능할 수 있는지를 시험하기 위해, 먼저 KDM3A가 STAT3에 결합하는지 여부를 조사하였다. 면역침강법을 통해 KDM3A와 STAT3 사이의 결합이 IL-6 처리에 의해 유의하게 향상되었음을 확인하였다(도 3A).

[95] KDM3A가 STAT3를 통해 JAK2-STAT3 표적 프로모터에 결합되는지 여부를

조사하기 위해, 기능적 STAT 결합 부위를 포함하는 *MYC* 프로모터에서 염색질 면역 침전(ChIP) 분석을 수행하였다. ChIP 분석을 통해 IL-6 처리에 따른 H3K9me2 레벨의 감소와 함께 *MYC* 프로모터에서 JAK2, 인산화된 STAT3 및 인산화된 KDM3A가 모두 함께 나타나는 것을 확인하였다(도 3B). 이러한 결과는 인산화된 KDM3A가 IL-6에 의해 유도된 JAK2-STAT3 표적 유전자의 전사 활성화에 직접 관여함을 나타낸다. 또한, shRNA에 의한 KDM3A의 knock-down을 통해 IL-6에 의해 유도된 *MYC* mRNA 및 단백질 레벨을 유의하게 감소시키는 것을 확인하였다(도 3C 및 D). 뿐만 아니라, KDM3A의 knock-down 후 shRNA 내성 형태의 KDM3A WT와 YA 돌연변이체를 도입한 경우 KDM3A WT를 도입한 경우에만 IL-6 처리 시 STAT3의 표적인 *MYC* mRNA 및 단백질 레벨을 증가시키는 것을 확인하였다(도 3E 및 F).

[96] 또한, 기능적 STAT3 반응 요소를 포함하는 *M67* 프로모터-루시퍼레이즈 리포터를 사용한 분석에서 KDM3A 인산화가 STAT3의 지속적 활성 형태(STAT3 CA)의 존재 하에서 *M67* 프로모터-루시퍼레이즈 리포터 활성을 증가시키지만, STAT3의 활성이 나타나지 않는 형태(STAT3 DN)에서는 STAT3 응답 요소에 결합하지 못하였다(도 3G). STAT3 의존적인 루시퍼레이즈 리포터 활성은 KDM3A knock-down에 의해 약화되었지만(도 3H), KDM3A 과발현에 의해 상승하였다(도 3I). 종합해 보면, 이들 데이터는 KDM3A 기능이 STAT3의 전사 보조 활성인자로서 IL-6에 의해 활성화되는 JAK2-STAT3의 표적 유전자 발현에 중요하다는 것을 나타낸다.

[97] 실시예 4. KDM3A 인산화에 의한 세포 증식 및 이동성 증가 및 KDM3A 낙다운에 의한 효과 상쇄

[98] JAK2-STAT3 신호 전달 체계의 조절 장애가 사람의 악성 종양유발과 관련이 있기 때문에 IL-6로 활성화된 JAK2에 의한 KDM3A 인산화가 암세포 성장, 증식, 이동성 및 콜로니 형성을 조절하는데 관여 하는지를 조사하였다. KDM3A 인산화를 유도하는 IL-6의 처리 유무에 따른 세포 이동성 분석을 수행하였다. IL-6 처리에 의해 세포의 이동성이 증가하여 48시간 정도 후에 간격이 좁혀지는 것을 확인하였다. 반면, KDM3A shRNA에 의해 KDM3A가 knock-down된 세포는 세포의 이동성이 현저히 감소되는 것을 확인하였다(도 4A). 이 데이터는 KDM3A가 IL-6의 처리 시 세포 이동성의 증진에 관여한다는 것을 나타낸다.

[99] 다음으로 세포의 성장 곡선 분석과 BrdU 염색 및 콜로니 형성 분석을 통해 세포 증식 효율을 측정하였다. 세포 증식 효율에서도 세포의 이동성 분석의 경우에서와 유사한 결과를 얻게 되었다. IL-6 처리한 경우 세포 성장과 BrdU 결합이 증가 되었으나, KDM3A를 낙다운한 경우에는 IL-6를 처리하였음에도 세포 성장과 BrdU 결합이 유의하게 감소하는 것을 확인하였다(도 4B 및 C). KDM3A 낙다운 세포에서 KDM3A WT^R과 YA^R 돌연변이를 도입하였을 때, KDM3A WT^R의 경우에서만 IL-6 처리 시에 BrdU 결합의 증가가 회복되는 것을 확인하였다(도 4C). IL-6 처리 유무와 KDM3A 낙다운의 유무에 따른 *MYC*의

도입이 콜로니 형성에 미치는 영향을 분석하였다. KDM3A knock-down 세포에서 MYC을 도입한 경우에는 IL-6 처리 시 콜로니 형성 능력이 감소되었다(도 4D).

[100] 이러한 데이터는 IL-6 처리에 따라 KDM3A에 의해 활성화된 MYC의 발현이 암 진행을 유도할 수 있다는 것을 콜로니 형성 증가를 통해 잠재적으로 암시한다. 종합적으로, 이 데이터는 인산화된 KDM3A가 IL-6에 의해 매개되는 세포 성장을 촉진시켜 세포 생존과 암 진행을 조절함을 나타낸다(도 4E).

[101] 본 발명에서는 상위 자극신호에 대한 세포 내 JAK2-STAT3 신호 전달과 하위 후성 유전적 기작 사이에서 KDM3A가 기능적 및 기계적 연결을 제공한다는 것을 밝혔다. 또한 JAK2에 의해 유도된 타이로신 인산화된 KDM3A에 의해 H3K9 탈메틸화의 조절이 암세포의 증식과 이동성을 유도하는 주된 후성 유전 현상 중 하나임을 제안하였다. 본원의 결과는 이전에 보고된 적이 없는 IL-6에 의해 유도된 핵에서의 JAK2-KDM3A-H3K9me2 신호 전달 축을 규명하였고, 이러한 신호전달 경로가 암세포 이동성, 증식 및 성장을 증가 시킨다는 것을 규명하였다. JAK2 활성화는 인산화된 KDM3A가 STAT3와 강하게 결합하고, H3K9 탈메틸화효소 기능의 증가를 통해 STAT3의 보조 활성화인자로서 작용하도록 한다. JAK2-STAT3 신호 전달 경로가 세포 항상성 유지에 진화적으로 잘 보존되어 있기 때문에 JAK2-STAT3 신호 전달 체계의 조절 장애는 퇴행성 질환 및 암과 같은 심각한 결과를 초래하는 것으로 알려져 있다. 따라서 KDM3A와 같은 후성 유전 조절인자의 신호 의존적 조절과 그 조절 장애의 규명은 암 진행 기작에 대한 새로운 통찰력을 제공하고 신약 개발을 위한 도전적인 길을 열어 줄 수 있다.

[102] 주만지(JmjC) 도메인을 보유한 KDM 패밀리는 30가지 이상이 알려져 있다. 지난 10년 동안 주만지(JmjC) 도메인을 함유한 KDM의 경우 임상 표적 후보 물질의 개발이 두드러지지 않았지만, LSD1과 같은 다른 탈메틸화 효소에 대해서는 4가지 화합물이 이미 임상 시험 중에 있다. 주만지(JmjC) 도메인 함유 KDM을 조절하는 선택적 화합물의 개발에 대한 큰 장애물은 높은 구조적 유사성 및 패밀리 구성원 간의 잠재적인 기능적 중복성이다. 우리가 JAK2-KDM3A-H3K9me2의 새로운 신호 전달 축을 제시하였기 때문에, JAK2에 의한 KDM3A 인산화를 표적으로 하는 중요한 발암 신호 전달 계통의 조절을 통해 새로운 치료 전략을 제공할 수 있을 것이다.

[103]

[104] 연구비 사사

[105] This work was supported by Creative Research Initiatives Program (Research Center for Epigenetic Code and Diseases, NRF-2017R1A3B1023387).

[106]

[107] 이상에서 본원의 예시적인 실시예에 대하여 상세하게 설명하였지만 본원의 권리범위는 이에 한정되는 것은 아니고 다음의 청구범위에서 정의하고 있는 본원의 기본 개념을 이용한 당업자의 여러 변형 및 개량 형태 또한 본원의

권리범위에 속하는 것이다.

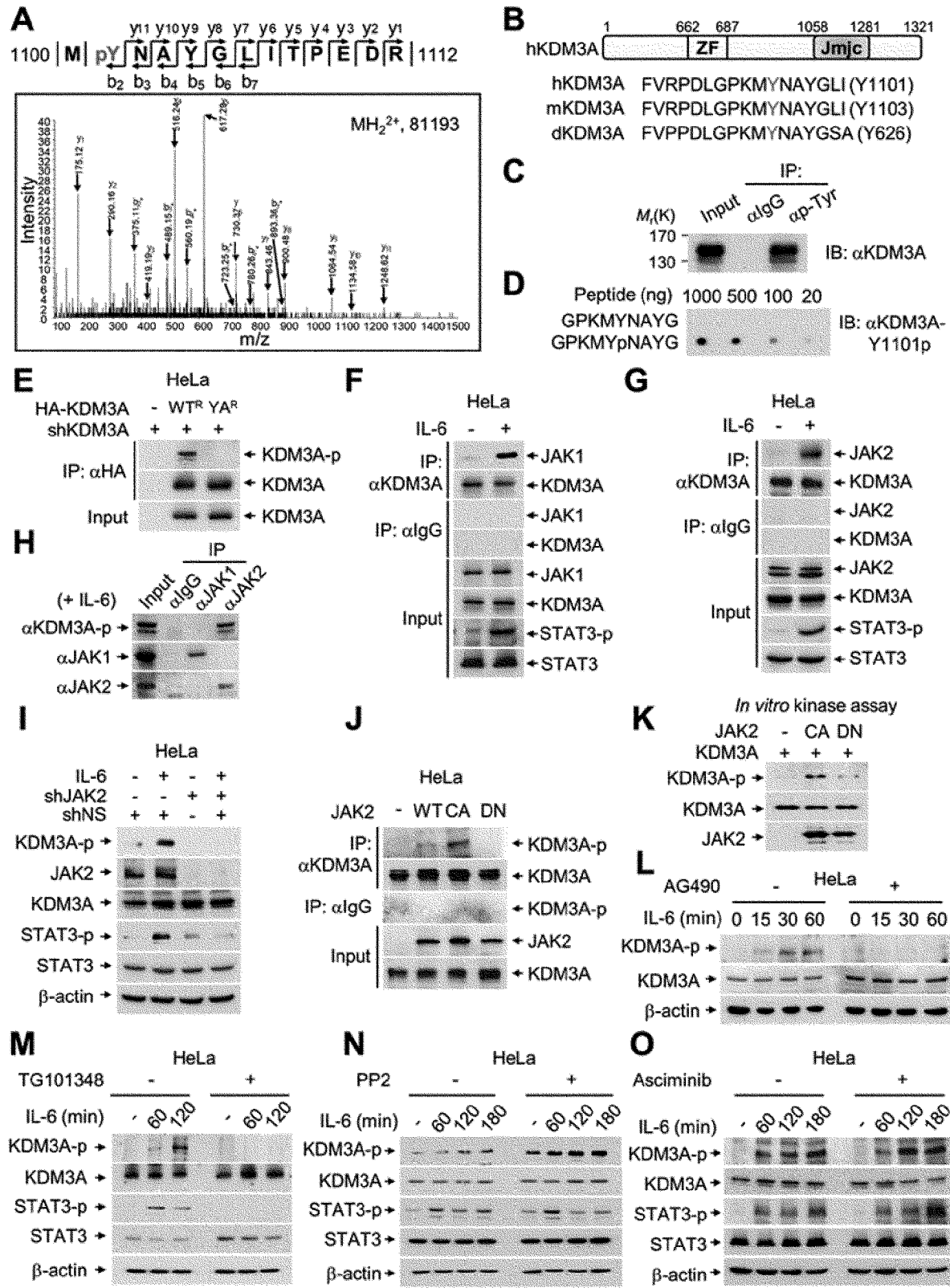
- [108] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 도입된다.

청구범위

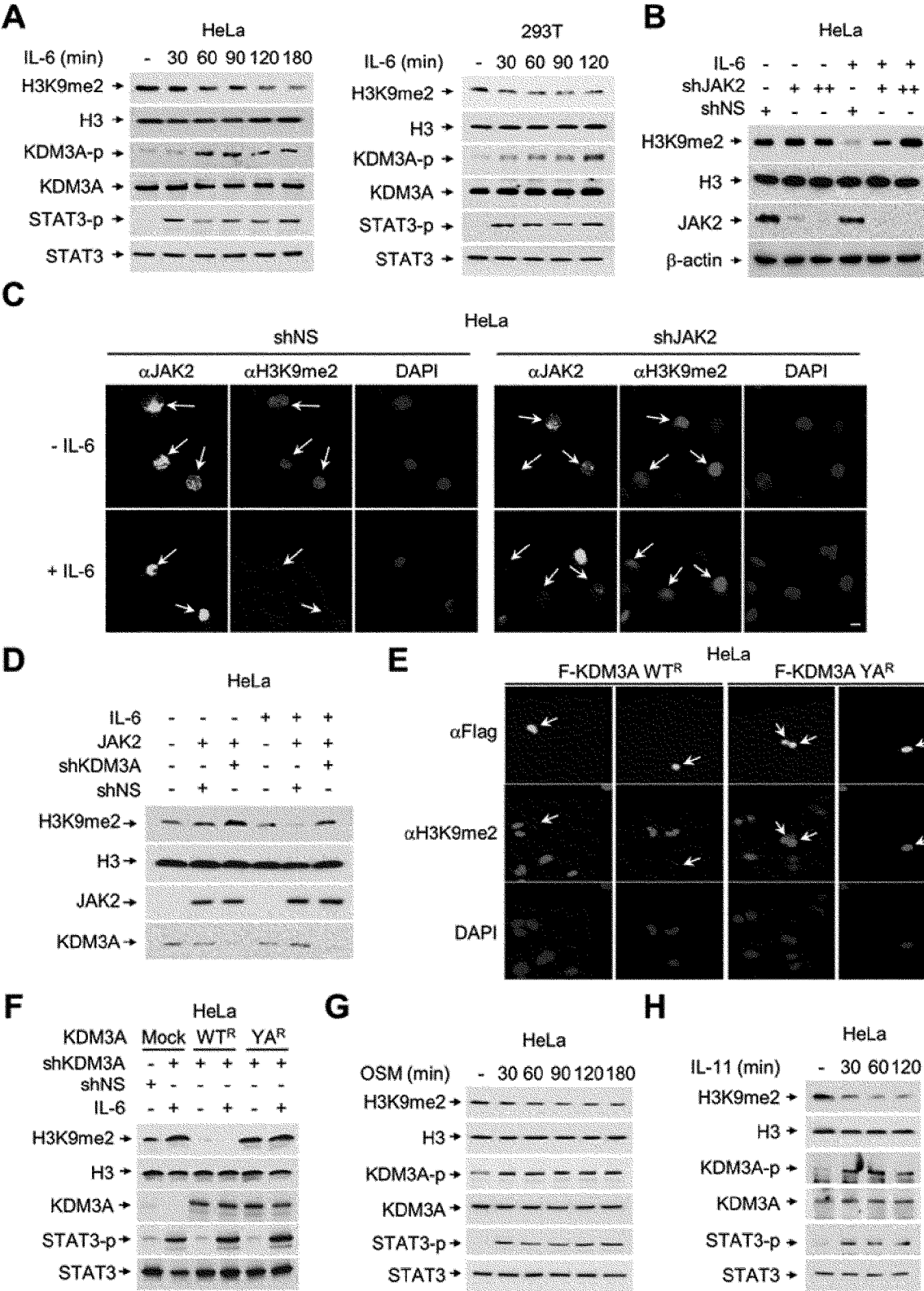
- [청구항 1] KDM3A(lysine-specific demethylase 3A)을 경유하는 JAK2(Janus tyrosine kinase 2)-STAT3(Signal Transducer and Activator of Transcription 3) 신호전달 경로 이상과 관련된 암 치료용 물질의 스크리닝 방법으로, 상기 방법은
- JAK2 단백질 및 상기 JAK2 단백질에 의해 인산화 될 수 있는 서열번호 1의 서열을 기준으로 1101번째 타이로신 잔기를 포함하는 KDM3A 단백질을 상기 JAK2에 의한 상기 타이로신 잔기의 인산화를 억제할 것으로 기대되는 시험물질의 존재 중에서 배양하는 제 1 단계;
- 상기 KDM3A 단백질의 타이로신 잔기의 인산화 정도를 측정하는 제2 단계; 및
- 상기 측정결과 시험물질로 처리되지 않은 대조군과 비교하여, 시험물질로 처리된 경우 상기 KDM3A 단백질의 인산화가 감소한 경우, 이를 암 세포의 성장을 억제할 수 있는 후보물질로 선별하는 제 3 단계를 포함하는, JAK2-STAT3 신호전달 이상에 의한 암 치료용 물질 스크리닝 방법.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서,
- 상기 제 1 단계는 STAT3 단백질을 추가로 포함하며,
- 상기 제 2 단계에서 상기 KDM3A 단백질의 상기 STAT2 단백질에 대한 보조인자로서의 활성을 측정하는 것을 추가로 포함하며,
- 상기 3 단계에서, 상기 측정결과 시험물질로 처리되지 않은 대조군과 비교하여, 시험물질로 처리된 경우 상기 KDM3A 단백질의 상기 STAT3 단백질에 대한 보조인자로서의 활성으로서, 상기 STAT3 단백질의 전사 활성이 감소된 경우, 이를 암 세포의 성장을 억제하는 후보물질로 선별하는 것을 추가로 포함하는, 방법.
- [청구항 3] 제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,
- 상기 제 1 단계는 서열번호 4를 기준으로 9번째 라이신 잔기가 메틸화된 히스톤 3 단백질(H3K9, Histone 3 Lysine 9)을 추가로 포함하며,
- 상기 제 2 단계에서 상기 KDM3A 단백질의 H3K9에 대한 탈메틸화 활성을 측정하는 것을 추가로 포함하며,
- 상기 3 단계에서 상기 측정결과 시험물질로 처리되지 않은 대조군과 비교하여, 시험물질로 처리된 경우 상기 H3K9 단백질의 탈메틸화가 감소된 경우, 이를 암 세포의 성장을 억제하는 후보물질로 선별하는 것을 추가로 포함하는, 방법.
- [청구항 4] 제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서,
- 상기 제 1 및 제 2 단계는 상기 각 단백질을 발현하는 진핵세포에서 수행되고, 상기 세포는 상기 JAK2-STAT 신호전달 경로를 활성화 할 수

- 있는 물질로 추가로 처리되는 것인, 방법.
- [청구항 5] 제 4 항에 있어서,
상기 JAK2-STAT 신호전달 경로를 활성화 할 수 있는 물질은 IL(Interleukin)-6, IL-11 또는 Oncostatin M(OSM)을 포함하는 gp(glycoprotein) 130을 매개 신호 전달 분자인, 방법.
- [청구항 6] 제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 암은 자궁경부암, 난소암, 유방암, 신장암 및 위암을 포함하는 고형암인, 방법.
- [청구항 7] 서열번호 1의 서열을 기준으로 1101번째 타이로신 잔기가 인산화된 KDM3A를 특이적으로 인식하는 항체 또는 그 항원결합 단편.
- [청구항 8] 서열번호 1의 서열을 기준으로 KDM3A 단백질 1101번째 타이로신 잔기가 인산화된 KMPYNAYGLI 에피토프를 특이적으로 인식하는 항체 또는 그 항원결합 단편.
- [청구항 9] 제 7 항 또는 제 8 항에 있어서,
상기 항체는 폴리클로날 또는 모노클로날인, 항체 또는 항원 결합 단편.
- [청구항 10] 제 7 항 또는 제 8 항에 있어서,
상기 항원 결합 단편은 Fv, ScFv, Fab, Fab' 및 F(ab')₂인, 항체 또는 항원 결합 단편.

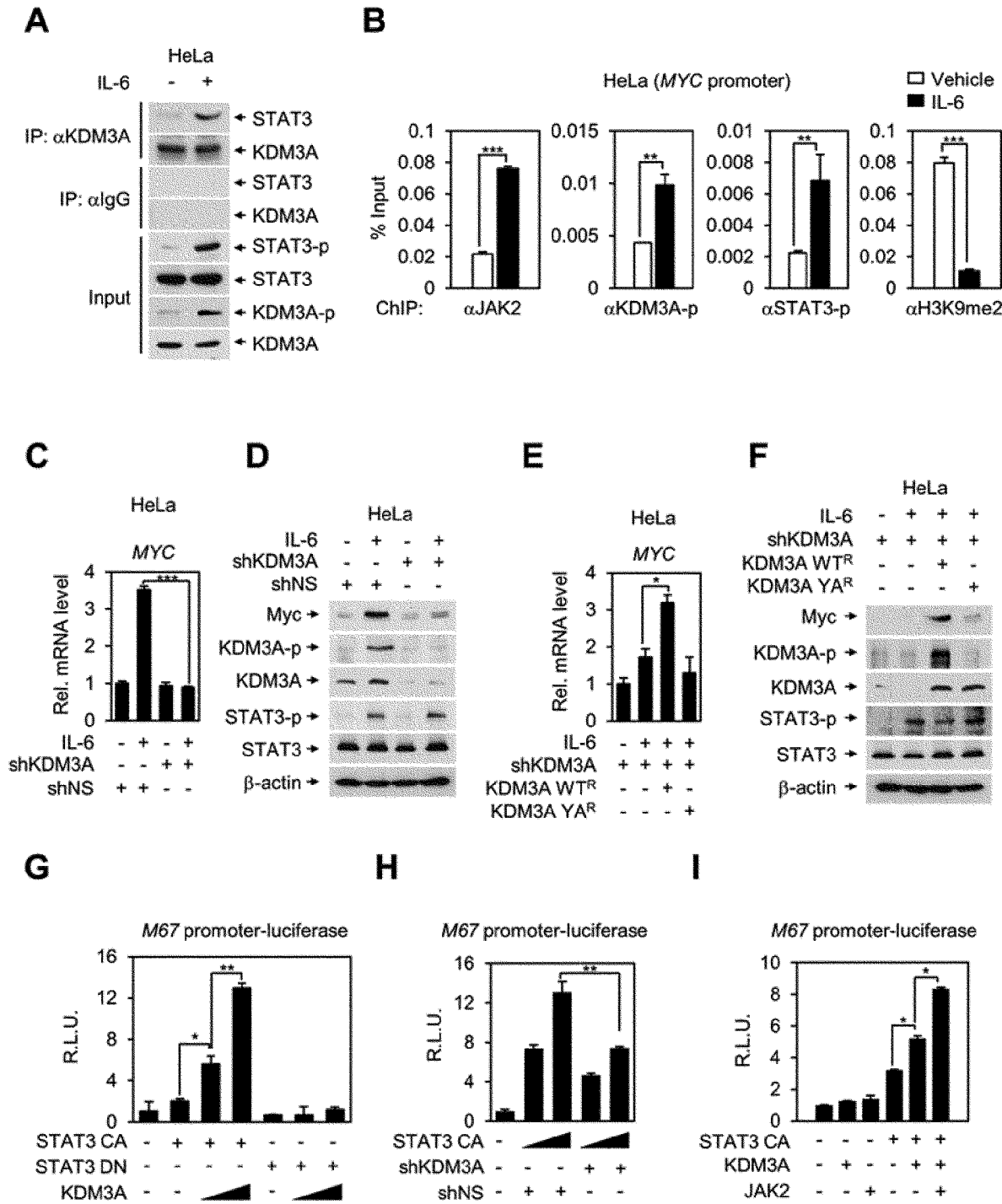
[도 1]



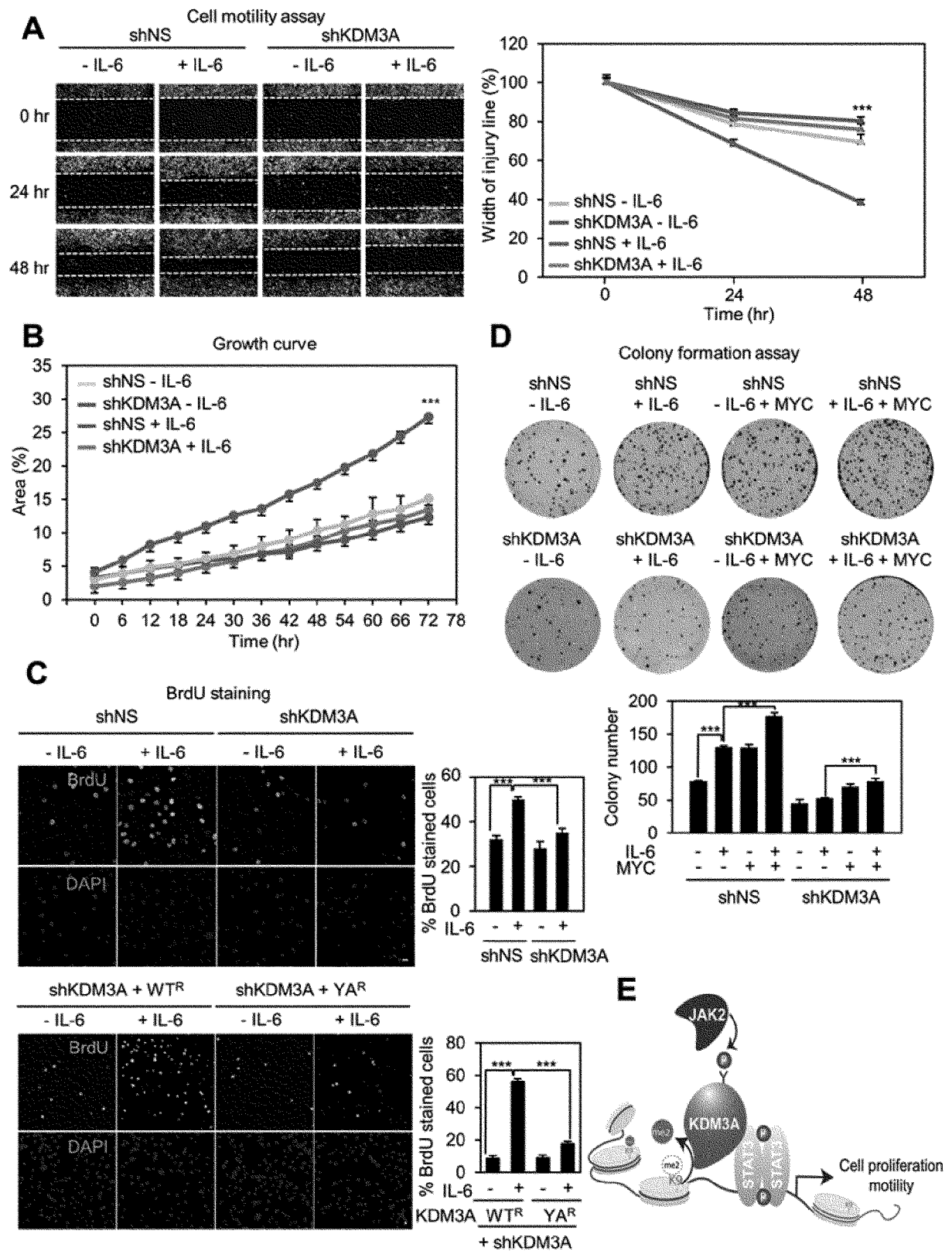
[도2]



[도3]



[도4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/006699

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.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 5
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:
Claim 5 refers to a dependent claim not meeting the requirement of PCT Rule 6.4(a).

3. ☒ Claims Nos.: 4, 6
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/006699

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/50(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)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)

G01N 33/50; A61K 38/18; A61P 35/00; G01N 33/68

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: KDM3A, JAK2, STAT3, cancer, tyrosine residue, phosphorylation, H3K9, antibody

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2012-0004169 A1 (SEBTL, Said M. et al.) 05 January 2012 See claims 1, 4 and 19; paragraphs [0071], [0072], [0083], [0084] and [0107]-[0109].	1-3
A		7-10
Y	KIM, Hyunkyung. Studies on physiological roles and epigenetic regulatory mechanism of RORα and JHDM2A. Doctoral Thesis, School of Biological Sciences, Graduate School of Seoul National University. 2013, pages 1-147 See pages 87-98 and 144-147.	1-3,7-10
Y	NCBI, GenBank accession no. NP_001140160.1 (12 November 2018) See all sequences.	1-3,7-10
Y	NCBI, GenBank accession no. NP_003484.1 (10 November 2018) See all sequence.	3
A	WILSON, S. et al. The histone demethylase KDM3A regulates the transcriptional program of the androgen receptor in prostate cancer cells. Oncotarget. 03 March 2017, vol. 8, no. 18, pages 30328-30343 See the entire document.	1-3,7-10



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

“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

16 SEPTEMBER 2019 (16.09.2019)

Date of mailing of the international search report

16 SEPTEMBER 2019 (16.09.2019)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/006699

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE LIMA MAIA, L. et al. JMJD1A, H3K9me1, H3K9me2 and ADM expression as prognostic markers in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. Plos One. 28 March 2018, vol. 13, no. 3, e0194884, (pages 1-16) See the entire document.	1-3,7-10
A	BRAUCHLE, M. et al. Protein complex interactor analysis and differential activity of KDM3 subfamily members towards H3K9 methylation. Plos One. 11 April 2013, vol. 8, no. 4, e60549 (pages 1-12) See the entire document.	1-3,7-10
X	KIM, H. et al. KDM3A histone demethylase functions as an essential factor for activation of JAK2-STAT3 signaling pathway. PNAS. 13 November 2018, vol. 115, no. 46, pages 11766-11770 See abstract; pages 11766-11770. ※ The above document is a document declaring non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty by the applicant.	1-3,7-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/006699

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2012-0004169 A1	05/01/2012	AU 2002-307217 A1	15/10/2002
		US 2004-0138189 A1	15/07/2004
		US 2014-0296128 A1	02/10/2014
		US 7998947 B2	16/08/2011
		US 8691799 B2	08/04/2014
		WO 02-078617 A2	10/10/2002
		WO 02-078617 A3	09/01/2003

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

G01N 33/50(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

G01N 33/50; A61K 38/18; A61P 35/00; G01N 33/68

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:KDM3A, JAK2, STAT3, 암(cancer), 타이로신 잔기(tyrosine residue), 인산화(phosphorylation), H3K9, 항체(antibody)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	US 2012-0004169 A1 (SEBTI, SAID M. 등) 2012.01.05	1-3
A	청구항 1, 4 및 19; 단락 [0071], [0072], [0083], [0084] 및 [0107]-[0109] 참조.	7-10
Y	김현경, 'Studies on physiological roles and epigenetic regulatory mechanism of RORa and JHDM2A', 박사논문, 서울대학교 대학원, 생명과학부, 2013, 1-147 페이지	1-3, 7-10
	페이지 87-98 및 144-147 참조.	
Y	NCBI, GenBank accession no. NP_001140160.1 (2018.11.12)	1-3, 7-10
	전체 서열 참조.	
Y	NCBI, GenBank accession no. NP_003484.1 (2018.11.10)	3
	전체 서열 참조.	
A	WILSON, S. 등, 'The histone demethylase KDM3A regulates the transcriptional program of the androgen receptor in prostate cancer cells', Oncotarget, 2017.03.03, 제8권, 제18호, 30328-30343 페이지	1-3, 7-10
	전체 문헌 참조.	

☒ 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

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

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

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

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

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

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

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2019년 09월 16일 (16.09.2019)

국제조사보고서 발송일

2019년 09월 16일 (16.09.2019)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



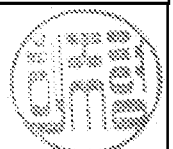
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	DE LIMA MAIA, L. 등, 'JMJD1A, H3K9me1, H3K9me2 and ADM expression as prognostic markers in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma' , Plos One, 2018.03.28, 제13권, 제3호, e0194884, (1-16 페이지) 전체 문헌 참조.	1-3,7-10
A	BRAUCHLE, M. 등, 'Protein complex interactor analysis and differential activity of KDM3 subfamily members towards H3K9 methylation' , Plos One, 2013.04.11, 제8권, 제4호, e60549 (1-12 페이지) 전체 문헌 참조.	1-3,7-10
X	KIM, H. 등, 'KDM3A histone demethylase functions as an essential factor for activation of JAK2-STAT3 signaling pathway' , PNAS, 2018.11.13, 제115권, 제46호, 11766-11771 페이지 초록; 페이지 11766-11770. ※ 위 문헌은 출원인에 의해 `신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외`가 선언된 문헌임.	1-3,7-10

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:
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
2. ☒ 청구항: 5
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
청구항 5는 PCT 규칙 6.4(a)의 규정을 충족하지 않는 종속항을 인용하고 있습니다.
3. ☒ 청구항: 4, 6
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2012-0004169 A1	2012/01/05	AU 2002-307217 A1	2002/10/15
		US 2004-0138189 A1	2004/07/15
		US 2014-0296128 A1	2014/10/02
		US 7998947 B2	2011/08/16
		US 8691799 B2	2014/04/08
		WO 02-078617 A2	2002/10/10
		WO 02-078617 A3	2003/01/09