(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0028520
(43) 공개일자 2022년03월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/50 (2006.01) *A61K 38/18* (2006.01)
A61K 8/64 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/50 (2013.01)
A61K 38/1825 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0109618
(22) 출원일자 2020년08월28일
심사청구일자 2021년10월18일

(71) 출원인
한국해양과학기술원
부산광역시 영도구 해양로 385(동삼동)
재단법인 오송첨단의료산업진흥재단
충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명로 123
(72) 발명자
이정현
부산광역시 수영구 수영로741번길 20, 111동 204호(수영동, 현대아파트)
임형순
서울특별시 서대문구 북아현로 29, 302동 1302호(북아현동, e편한세상신촌 3단지)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
유미특허법인

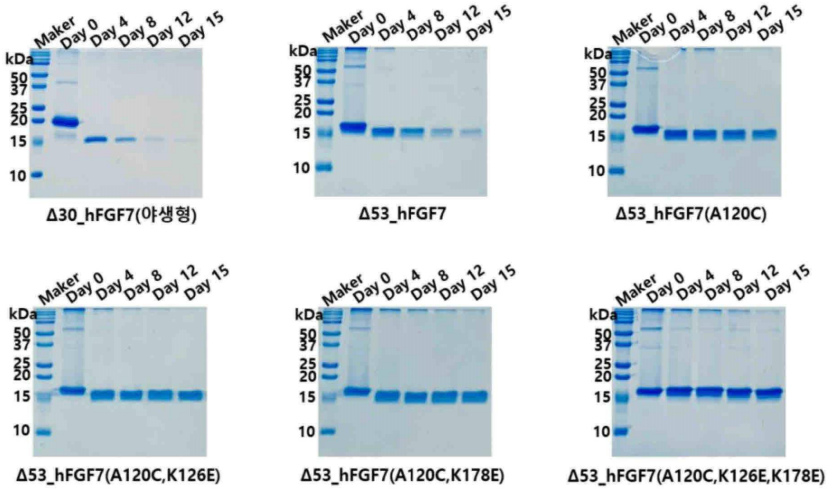
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **온도안정성을 향상시킨 FGF7 폴리펩타이드 및 그 용도**

(57) 요 약

FGF7 활성을 가지며 온도안정성이 향상된 폴리펩타이드가 제공된다. 폴리펩타이드는 서열번호 1에서 120번째 알라닌(A)이 시스테인(C)으로 치환되거나, 126번째 리신(K)이 글루탐산(E) 또는 아스파르트산(D)으로 치환되거나, 178번째 리신(K)이 글루탐산(E) 또는 아스파르트산(D)으로 치환되는 것 중에서 선택된 적어도 하나 이상의 치환을 포함하고, FGF7 고유의 활성을 가지는 온도안정성을 향상시킨(thermally stable) 폴리펩타이드이다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61K 8/64 (2013.01)
(72) 발명자
안영준
경기도 안산시 상록구 초당1안길 6, 202호(사동, 우드그린빌라)
이경원
부산광역시 영도구 태종로 260, 105동 102호(청학동, 영도신도브래뉴)
정예은
부산광역시 영도구 본산남길 13-3, 201호(동삼동)
차기원
충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 만수1길 40-10, 201호
이원규
경기도 고양시 덕양구 푸른마을로 54, 404동 1602호(고양동, 푸른마을4단지아파트)

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1에서 120번째 알라닌(A)이 시스테인(C)으로 치환되거나,

126번째 리신(K)이 글루탐산(E) 또는 아스파르트산(D)으로 치환되거나,

178번째 리신(K)이 글루탐산(E) 또는 아스파르트산(D)으로 치환되거나 하는 것 중에서 선택된 적어도 하나 이상의 치환을 포함하고,

FGF7 활성을 가지는 온도안정성이 향상된(thermally stable) 폴리펩타이드.

청구항 2

제1 항에 있어서,

상기 치환은 2개 또는 3개인 온도안정성이 향상된 폴리펩타이드.

청구항 3

제2 항에 있어서,

120번째 알라닌(A)이 시스테인(C)으로 치환되고,

상기 126번째 리신(K)이 글루탐산(E) 또는 아스파르트산(D)으로 치환되거나 상기 178번째 리신(K)이 글루탐산(E) 또는 아스파르트산(D)으로 치환된 것 중에서 선택된 적어도 하나 이상의 치환을 포함하는 온도안정성이 향상된 폴리펩타이드.

청구항 4

제3 항에 있어서,

상기 120번째 알라닌(A)이 시스테인(C)으로 치환되고,

상기 126번째 리신(K)이 글루탐산(E)으로 치환되고,

상기 178번째 리신(K)이 글루탐산(E)으로 치환된 온도안정성이 향상된 폴리펩타이드.

청구항 5

제1 항에 있어서,

상기 온도안정성이 향상된 폴리펩타이드는 상기 서열번호 1의 N 말단에서 서열번호 2 내지 54의 아미노산이 결실된(△53N) 온도안정성이 향상된 폴리펩타이드.

청구항 6

제1 항에 있어서,

상기 온도안정성이 향상된 폴리펩타이드는 상기 서열번호 1의 N 말단에서 서열번호 2 내지 54의 아미노산이 결실되고(△53N) 결실 부위에 메티오닌(M)이 결합된 온도안정성이 향상된 폴리펩타이드.

청구항 7

제1 항에 있어서,

상기 온도안정성이 향상된 폴리펩타이드는 상기 서열번호 1의 N 말단에서 서열번호 1 내지 30의 아미노산이 결실된(△30N) 온도안정성이 향상된 폴리펩타이드.

청구항 8

제1 항 내지 제7 항 중 어느 한 항에 따른 온도안정성이 향상된 폴리펩타이드; 및

약제학적으로 또는 화장용으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 기재는 온도 안정성을 향상시킨 FGF7 폴리펩타이드 및 그 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] FGF(Fibroblast Growth Factor)는 세포의 성장, 증식, 분화를 조절하는 중요한 역할을 수행하는 인자이다. 인체의 각 조직의 기능을 유지하기 위해 다양한 종류의 FGF들이 생성되며, 이들은 세포의 분화와 증식에 고유의 기능을 수행하고 있다. 그러나, 노화가 진행됨에 따라 피부 등 각 조직에서 FGF들의 농도는 점진적으로 낮아지며, 이에 따라 세포의 재생 및 분열 기능이 약화되어 피부에 주름이 형성되고 탄력이 감소하게 된다.

[0003] 다양한 FGF 중에서 FGF7(Fibroblast Growth Factor 7)는 케라티노사이트 성장 인자라고도 불리우며, 이는 포유류 세포에서 강한 상피세포-특이적 성장인자로 알려져 있다. 또한 FGF7은 피부 재생, 세포 증식 및 세포 분화를 조절하는데 있어서 중요한 역할을 한다.

[0004] FGF7은 방사선 치료후 구강염 치료제로 이미 시판되고 있을 뿐만 아니라 상처 치유를 촉진시키는 의약품으로 개발되고 있을 뿐만 아니라 피부 재생, 주름 제거 또는 탄력 증가를 위한 화장품 원료로도 널리 사용되고 있다.

[0005] FGF1, FGF2, FGF7 그리고, FGF10을 비롯한 FGF family들은 온도에 대한 안정성이 매우 낮아 24시간 수용액 상태로 정치시 상온 이상의 온도조건에서 그 활성이 급격히 소실되어 활성 손실이 심각하게 발생함이 보고되고 있다.

[0006] 따라서, 인체 내에서 다양한 기능을 갖는 FGF7이 산업적인 용도에 적합하게 사용되기 위해서는 FGF7의 열역학적 안정성이 담보되는 것이 필수적인 조건이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 개시는 온도 안정성을 향상시킨 FGF7 폴리펩타이드를 제공하고자 한다.

[0008] 본 개시는 온도 안정성을 향상시킨 FGF7 폴리펩타이드를 포함하는 약제학적 또는 화장용 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 실시예들에 따른 온도 안정성을 향상시킨 FGF7 폴리펩타이드는 서열번호 1에서 120번째 알라닌(A)이 시스테인(C)으로 치환되거나, 126번째 리신(K)이 글루탐산(E) 또는 아스파르트산(D)으로 치환되거나, 178번째 리신(K)이 글루탐산(E) 또는 아스파르트산(D)으로 치환되는 것 중에서 선택된 적어도 하나 이상의 치환을 포함하고, FGF7 고유의 활성을 가지는 온도안정성을 향상시킨(thermally stable) 폴리펩타이드이다.

[0010] 실시예들에 따른 조성물은 온도안정성을 향상시킨 폴리펩타이드 및 약제학적으로 또는 화장용으로 허용가능한 담체를 포함한다.

발명의 효과

[0011] 실시예들에 따른 FGF7 폴리펩타이드는 제품제조 후 야생형 인간 FGF7 폴리펩타이드와 비교시 향상된 온도안정성을 나타낸다.

[0012] 온도안정성을 향상시킨 폴리펩타이드는 유통과 보관 과정 중에도 기존의 야생 인간 FGF7 제품과 달리 활성 유지가 가능하다. 따라서, 이를 약제학적 또는 화장용 조성물의 유효성분으로 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 야생형 FGF7의 폴리펩타이드(서열번호 1)이다.

도 2는 야생형 FGF7에서 서열번호 2~54를 결실시키고 pCold I site를 포함하는 △53N-hFGF7 서열을 나타낸다.

도 3은 야생형 FGF7(△30N_hFGF7) 및 △53N_hFGF7(palifermin)과 FGF7 변이체(△53N_hFGF7(A120C), △53N_hFGF7(A120C, K126E), △53N_hFGF7(A120C, K178E), △53N_hFGF7(A120C, K126E, K178E))의 37℃에서의 안정성을 측정하기 위한 SDS-PAGE를 나타낸다.

도 4는 야생형 FGF7(△30N_hFGF7) 및 △53N_hFGF7(palifermin)과 FGF7 변이체(△53N_hFGF7(A120C), △53N_hFGF7(A120C, K126E), △53N_hFGF7(A120C, K178E), △53N_hFGF7(A120C, K126E, K178E))의 SDS-PAGE에 남아있는 단백질 밴드들의 밀도를 시간에 따라 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 5는 야생형 FGF7(△30N_hFGF7) 및 △53N_hFGF7(palifermin)과 FGF7 변이체(△53N_hFGF7(A120C), △53N_hFGF7(A120C, K126E), △53N_hFGF7(A120C, K178E), △53N_hFGF7(A120C, K126E, K178E))의 45℃에서의 안정성을 측정하기 위한 SDS-PAGE를 나타낸다.

도 6은 야생형 FGF7(△30N_hFGF7) 및 △53N_hFGF7(palifermin)과 FGF7 변이체(△53N_hFGF7(A120C), △53N_hFGF7(A120C, K126E), △53N_hFGF7(A120C, K178E), △53N_hFGF7(A120C, K126E, K178E))의 45℃에서의 안정성을 측정하기 위한 SDS-PAGE에 남아있는 단백질 밴드들의 밀도를 시간에 따라 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 7은 야생형 FGF7(△30N_hFGF7) 및 △53N_hFGF7(palifermin)과 FGF7 변이체(△53N_hFGF7(A120C), △53N_hFGF7(A120C, K126E), △53N_hFGF7(A120C, K178E), △53N_hFGF7(A120C, K126E, K178E))의 45℃에서의 세포증식활성 변화를 측정한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 이하 본 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 실시예들에 대하여 상세히 설명한다. 실시예는 여러가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며, 여기에서 설명하는 구체적인 실시예로만 한정되지 않는다.

[0015] 본 개시에서 사용되는 일부 용어들의 정의가 아래에 달리 정의되지 않은 한, 본원에 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자가 통상적으로 이해하는 바와 동일한 의미를 가진다.

[0016] 본 개시에서 기술된 기법 및 공정들은 일반적으로 통례적인 방법에 따라 수행되며, 이는 본원 전체에 제시된다. 일반적으로, 본 개시에 사용된 명명 및 분자 생물학, 생화학, 분석 화학 및 세포 배양에서의 실험 절차들은 당해 기술 분야에서 널리 공지되어 있으며 통상적으로 사용되는 바와 동일하다.

[0017] **변이체**

[0018] 본 개시는 부위 특이적인 돌연변이 유발에 의해 열적으로 안정화된 FGF7 폴리펩타이드를 제공한다. 본 개시에서는 생물정보 분석 및 컴퓨터를 이용한 단백질 설계를 통해 기존에 알려져 있지 않던 신규 위치에서 가장 최적의 아미노산을 합리적으로 예측한 후 부위-특이적인 돌연변이 유발에 의해 돌연변이를 제조하였다.

[0019] 도 1은 야생형 인간 FGF7 폴리펩타이드 서열을 나타낸다.

[0020] 본 개시에서 용어 '야생형'은 종의 구성원들에서 가장 공통적인 아미노산 서열을 가진 천연형 FGF7를 의미한다. 본 개시에서, 야생형 FGF7는 아미노산 194개 길이의 (서열번호 1, 도 1) 단백질인 인간 FGF7이다.

[0021] 본 개시에서 '단편'은 FGF7 활성을 가진 FGF7 폴리펩타이드의 기능성 단편을 지칭한다. 또한, 서열번호 1의 서열과 85% 이상의 서열 동일성을 가진 FGF7 폴리펩타이드의 기능성 단편을 지칭한다. FGF7 폴리펩타이드의 단편은 또한 본 발명에 따른 하나 이상의 치환을 적어도 가진다. 적어도 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성이 바람직하다. 단편은 온전한 폴리펩타이드 서열 및 구조의 일부로만 구성되는 폴리펩타이드로 의도되며, 변이체의 C-말단 결손 또는 N-말단 결손이 존재할 수 있다. 이러한 기능성 단편은 본 발명에 따른 대상 FGF7 단백질의 세포 결합 영역과 헤파린 결합 세그먼트를 보유할 수 있다.

[0022] 본 개시에서 '서열 동일성'은 동일한 아미노산 잔기가 전술한 바와 같은 본 발명에 따른 FGF7 폴리펩타이드에서 발견되는 것을 의미한다. FGF7 폴리펩타이드의 아미노산 서열의 명시된 연속 세그먼트를 정렬하여 기준 분자에

해당되는 특정 아미노산 서열과 비교하였을 때, 야생형 인간 FGF7 폴리펩타이드가 기준으로서 사용된다. 서열 동일성의 %는, 양쪽 서열에서 동일한 아미노산 잔기가 존재하는 위치의 수를 측정함으로써 일치된 위치의 수를 산정하고, 이를 기준 분자와 비교하는 세그먼트의 전체 위치 개수로 나누고, 이에 100을 곱하여, 서열 동일성의 %를 산출함으로써, 계산한다. 서열 정렬 방법은 당해 기술 분야에 잘 공지되어 있다. 본원에 사용되는 기준 서열은 본 발명에 따른 특정 대응되는 인간 야생형 FGF7 단백질을 지칭한다. 예를 들어, 마우스, 랫, 토끼, 영장류, 돼지, 개, 소, 말 및 인간 등의 포유류 종의 경우, FGF7는 고도로 보존되어 있으며, 광범위한 종들에서 85% 이상의 서열 동일성을 나타낸다. 바람직하게는 서열 동일성은 적어도 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상 또는 100%이다. 당해 기술 분야의 당업자라면, 본 발명에 따른 FGF7 단백질의 전장에서 나머지 15% 이하의 아미노산은 예를 들어 FGF7 종의 다른 소스를 이용하거나 또는 당해 기술 분야에 일반적으로 공지된 적합한 비-FGF7 펩타이드 서열 또는 태그의 부가로 인해, 가변적일 수 있음을, 이해할 것이다. 야생형 FGF7에 대해 85% 이상의 동일성을 가진 본 발명의 구현예에 따른 FGF7 단백질은, FGF 패밀리의 다른 멤버들은 일반적으로 매우 낮은 서열 동일성을 가지므로, 비슷한 FGF7 이외의 다른 단백질을 포함할 가능성은 낮다.

[0023] 본 발명자는 야생형 인간 FGF7에서 120번째 위치, 126번째 위치와 178번째 위치가 각각 FGF7 폴리펩타이드의 열적 안정성과 연관된 위치임을 확인하였다.

[0024] 열적 안정성과 연관된 위치에서 가장 적절한 아미노산으로 바꾸는 것은 발명자의 창의적 노력(inventive step)을 요하는 것이다.

[0025] 본 발명자는 120번째 위치의 알라닌(A)을 시스테인(C)로 치환함으로써 분자간 이황화 결합(intramolecular disulfide bond)을 유도함으로써 열적 안정성을 향상시킬 수 있음을 확인하였다.

[0026] 또한, 126번째 위치의 리신(K)을 글루탐산(E) 또는 아스파르트산(D)으로 치환하여 175번째 위치의 아르기닌(R)과 이온 결합을 유도하여 열적 안정성을 보다 더 향상시킬 수 있음을 확인하였다.

[0027] 또한, 178번째 위치의 리신(K)을 글루탐산(E) 또는 아스파르트산(D)으로 치환하여 175번째 위치의 아르기닌(R)과 이온 결합을 유도하여 열적 안정성을 보다 더 향상시킬 수 있음을 확인하였다.

[0028] 본 개시에서 가능한 변이체는 아래 표 1에 개시된 다양한 변이체중 어느 하나일 수 있다.

표 1

[0029]

#	변이체
1	(A120C)
2	(K126E)
3	(K126D)
4	(K178E)
5	(K178D)
6	(A120C, K126E)
7	(A120C, K126D)
8	(A120C, K178E)
9	(A120C, K178D)
10	(K126E, K178E)
11	(K126E, K178D)
12	(K126D, K178E)
13	(K126D, K178D)
14	(A120C, K126E, K178E)
15	(A120C, K126D, K178E)
16	(A120C, K126E, K178D)
17	(A120C, K126D, K178D)

[0030] 위의 다양한 변이체들 중, 단일 위치의 돌연변이도 열적 안정성을 향상시킬 수 있지만, 2개 이상의 돌연변이가 열적 안정성 향상에 바람직할 수 있다. 나아가서, 3개의 돌연변이가 보다 열적 안정성 향상에 바람직할 수 있다.

[0031] 일반적으로, FGF7의 코딩 유전자를 클로닝한 다음 형질전환된 유기체, 바람직하게는 미생물에서 발현시킨다. 숙주 유기체는 발현 조건에서 FGF7를 생산하도록 외래 유전자를 발현한다. 또한, 합성 재조합 FGF7는 진핵 생물,

예를 들어, 효모 또는 인간 세포에서 만들어질 수 있다. FGF7는 재조합 생산 방법에 따라 194개 아미노산 형태, 2~54번을 결실시킨 141개의 아미노산 형태, 1~30번을 결실시킨 164개의 아미노산 형태 또는 이의 혼합 형태일 수 있다. 도 2에는 서열번호 2~54를 결실시키고 pCold I site를 포함하는 △53N-hFGF7 서열이 예시되어 있다. 이 때 합성되는 아미노산은 2~54번이 결실된 141개의 아미노산 또는 pCold I site 중 첫번째 서열인 메티오닌(M)이 남은 142개의 아미노산 형태일 수 있다.

[0032] 본원에 제시된 설명은, 야생형 FGF7에서의 일부 변화가 야생형 단백질 보다 높은 온도안정성과 긴 반감기를 가진 FGF7 돌연변이를 구축함을 최초로 입증해준다.

[0033] 본원에 기술된 치환을 삽입하기 위해 사용되는 본 발명에 따른 FGF7 단백질은, 본원에 지정된 기준을 충족하는 한, 즉, 야생형 FGF7의 바람직한 생물 활성을 보유하면서 열-안정화되는 한, 예를 들어, 마우스, 랫, 토끼, 영장류, 돼지, 개, 소, 말, 고래 및 인간 등의 임의의 포유류에서 유래될 수 있다. 바람직하게는, 대상 FGF7 단백질은 인간 소스로부터 유래된다. 그러나, 비교의 기준으로 사용되는 서열번호 1의 인간 FGF7 단백질의 아미노산 서열에 대해 85% 이상, 가장 바람직하게는 약 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상 또는 99% 이상의 서열 동일성을 가진, 포유류 FGF7에 대한 모든 생물학적으로 활성인 변이체들이, 본 발명에서 이용될 수 있다.

[0034] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 본 발명에 따른 안정적인 FGF7 폴리펩타이드는, 검출, 정제, 특정 조직 또는 세포에의 태깅, 개선된 안정성, 연장된 활성, 개선된 발현 등을 용이하게 수행하기 위해 사용될 수 있는, 당해 기술 분야에 공지된 임의의 부가적인 FGF 펩타이드 이외의 서열 또는 태그를 더 포함할 수 있다.

[0035] **약제학적 및 화장품 조성물**

[0036] 표 1에 개시되어 있는 다양한 변이체는 약제학적으로 또는 화장용으로 허용가능한 담체와 함께 약제학적 및/또는 화장품 조성물로 제공될 수 있다.

[0037] 표 1에 개시되어 있는 다양한 변이체는 혈관신생 촉진, 상처 치유 촉진, 연골형성 또는 골형성의 촉진, 또는 신경발생 촉진을 필요로 하는 대상체 또는 주름개선, 피부탄력 개선, 피부노화 방지, 탈모 방지 또는 발모촉진, 피부보습 개선, 검버섯 제거 또는 여드름 치료와 같은 피부 상태의 개선을 필요로 하는 대상체에 투여될 수 있다. 또한 방사선 치료후 구강염 치료제, 두경부암 치료제, 이식편대숙주질환 치료제 등으로 대상체에 투여될 수 있다. 표 1에 개시되어 있는 다양한 변이체는 "원상태" 형태 또는, 원한다면, 염, 에스테르, 아미드, 전구약물, 유도체, 등의 형태로 투여될 수 있으며, 단, 상기 염, 에스테르, 아미드, 전구약물 또는 유도체는 약리적으로 적합하고, 즉, 본 방법(들)에 효과적인 물질에서 선택될 수 있다. 펩타이드의 염, 에스테르, 아미드, 전구약물 및 다른 유도체는 합성 유기 화학 분야의 숙련가에게 공지되고, 예를 들면, 공지의 표준 절차를 사용하여 제조될 수 있다.

[0038] 표 1에 개시되어 있는 다양한 변이체들은 피하, 비경구, 국소, 경구, 코 (또는 그렇지 않으면 흡입된), 직장, 또는 국소 투여를 위해, 예컨대 에어로졸, 크림, 세럼 그리고 패취형태의 경피투여형 제품으로 제형화될 수 있다. 조성물은 투여 방법에 따라서 다양한 단위 복용 형태로 투여될 수 있다. 적합한 단위 복용 형태는, 비제한적으로 분말, 정제, 알약, 캡슐, 로젠지, 좌약, 패치, 비강 스프레이, 주사제, 이식가능 지속 방출 제형, 지질 복합체, 등을 포함할 수 있다.

[0039] 표 1에 개시되어 있는 다양한 변이체들이 화장용으로 허용가능한 담체와 조합되어 화장품 조성물을 형성할 경우 충전제(예를 들면 히알루론 충전제, 폴리메틸메타크릴레이트(PMMA) 마이크로구형체 및 콜라겐 충전제) 등을 추가로 포함할 수 있다. 본 조성물은 바람직하게는 국소, 피하, 또는 경피 투여용일 수 있다.

[0040] 본 조성물은 주사용 조성물일 수 있다.

[0041] 본 조성물은 콜라겐 (예를 들면, 소, 돼지, 또는 인간 콜라겐)히알루론산을 추가로 포함할 수 있다. 콜라겐은 합성 콜라겐일 수 있으며, 히알루론산은 닭벼슬 또는 미생물의 발효 산물일 수 있다.

[0042] 본 조성물은 마취제 (예를 들면, 리도카인)을 추가로 포함할 수 있다.

[0043] 본 조성물은 피부 크림(예를 들면, 얼굴 크림, 목크림, 바디크림)일 수 있다.

[0044] 본 조성물은 세럼 또는 토너형태의 액상형 제제일 수 있다.

[0045] 본 조성물은 겔상태의 반고형 제제 일 수 있다.

[0046] 약제학적으로 허용가능한 담체는 연방 또는 주 정부의 관리 기관에 의해 승인되거나 U.S. 약전 또는 동물, 더

상세하게는 인간에서 또는 동물, 더 상세하게는 인간에 대해 사용하기 위한 다른 일반적으로 인식된 약전에서 열거된 것을 포함한다. "담체"는, 예를 들면, 본 개시에서 기재된 1 이상의 펩타이드와 함께 투여되는 희석제, 아쥬반트, 부형제, 보조제 또는 비히클을 의미한다.

[0047] 약제학적으로 허용가능한 담체는, 예를 들면, 조성물을 안정화시키거나 표 1에 개시되어 있는 다양한 변이체들의 흡수를 증가 또는 감소시키는 것으로 작용하는 1 이상의 생리적으로 허용가능한 화합물을 함유할 수 있다. 생리적으로 허용가능한 화합물은 하기를 포함할 수 있다: 예를 들면, 탄수화물, 예컨대 글루코오스, 수크로오스, 락토스, 말토스, 트레할로스, 만니톨, 레반 또는 덱스트란, 항산화제, 예컨대 아스코르브산 또는 글루타티온, 킬레이트제, 저분자량 단백질, 보호 및 흡수 증강제 예컨대 지질, 펩타이드의 청소능 또는 가수분해를 감소시키는 화합물, 또는 다른 부형제, 안정제 및/또는 pH 조절 완충제일 수 있다.

[0048] 특히 정제, 캡슐, 겔 캡, 등의 제조에서 사용되는 다른 생리적으로 허용가능한 화합물은, 비제한적으로 결합제, 희석제/충전제, 붕해제, 윤활유, 및 현탁화제를 포함할 수 있다.

[0049] 경구 복용 형태(예를 들면, 정제)를 제조하기 위해서 부형제, 임의의 붕해제, 결합제 및 임의의 윤활유 등이 표 1에 개시되어 있는 다양한 변이체들에 부가되고 수득한 조성물은 압축될 수 있다. 필요한 경우, 압축된 생성물은 맛을 차단하거나 장의 용해 또는 지속 방출을 위해 공지된 방법을 사용하여 코팅될 수 있다.

[0050] 표 1에 개시되어 있는 다양한 변이체들과 제형화될 수 있는 다른 생리적으로 허용가능한 화합물은 미생물의 성장 또는 작용을 방지하는데 특히 유용한 습윤제, 유화제, 분산제 또는 보존제를 포함할 수 있다. 부형제는 멸균되고 오염물질이 없는 상태로 사용될 수 있다.

[0051] 표 1에 개시되어 있는 다양한 변이체들은 화장품 용도를 위한 제형에 편입되어 국소로 도포될 수 있고 피부 크림 (예를 들면, 얼굴 크림, 목크림, 바디크림) 또는 바디 로션, 주름-제거 크림, 보습크림, 아이크림, 미백크림으로서 제형될 수 있거나 화장품, 햇볕차단제, 또는 보습제에 편입될 수 있다.

[0052] 또한 표 1에 개시되어 있는 다양한 변이체들은 충전제, 보습제, 비타민 (예를 들면, 비타민 E, 비타민 C), 및/또는 착색제/염색약을 임의로 추가로 포함하는 제형에 편입될 수 있다.

[0053] 적합한 주사가능 화장품 제형은 1 이상의 충전제 물질과 함께 표 1에 개시되어 있는 다양한 변이체들을 편입하는 제형을 비제한적으로 포함할 수 있다. 주사가능 화장품 주름 충전제로서 사용가능한 예시적인 물질은, 비제한적으로, 일시적 (흡수성) 충전제 예컨대 콜라겐 (예를 들면, 합성 콜라겐, 소 콜라겐, 돼지 콜라겐, 인간 콜라겐, 등), 히알루론산 겔, 칼슘 하이드록실인회석 (전형적으로 겔의 형태로 이식됨), 또는 폴리-L-락트산 (PLLA) 등을 포함할 수 있다. 펩타이드는 영구적 (비-흡수성) 충전제를 함유하는 주사가능 화장품 제형에 또한 편입될 수 있다. 예증적인 "영구적" 충전제는, 비제한적으로, 폴리메틸메타크릴레이트 비드 (PMMA 마이크로구형체)를 포함할 수 있다.

[0054] 표 1에 개시되어 있는 다양한 변이체들은 진피 충전제, 주사가능 제형 등에 편입되거나 함께 투여될 수 있다: 그와 같은 주사가능 제형은 마취제 (예를 들면, 리도카인 또는 그것의 유사체)를 추가로 포함할 수 있다. 주사가능 제형은 실질적으로 멸균되거나 멸균되고/거나 피하 주사가능 충전제용 관리 기관 지침에 부합한다

[0055] 표 1에 개시되어 있는 다양한 변이체들은 당해기술에서 공지된 임의의 경로를 사용하여 대상체에게 투여될 수 있고, 그 경로는 예를 들면, 주사로 (예를 들면, 정맥내, 복강내, 피하, 근육내, 또는 진피내), 흡입, 경피 적용, 직장 투여, 질 투여, 또는 경구 투여를 포함한다. 바람직한 투여 경로는 피하, 경피, 또는 국소 적용을 포함한다.

[0056] 효과적인 양의 표 1에 개시되어 있는 다양한 변이체들은 국소 (즉, 비-전신) 투여를 통해, 예컨대 말초 근육내, 선상내, 및 피하 투여를 비제한적으로 포함하는 말초 투여에 의해 투여될 수 있다.

[0057] 표 1에 개시되어 있는 다양한 변이체들의 투여는 임의의 편리한 방식, 예를 들면, 주사로, 정맥내 및 동맥 스텐트 (용출 스텐트 포함), 카테터, 경구 투여, 흡입, 경피 적용, 직장 투여, 등일 수 있다.

[0058] 표 1에 개시되어 있는 다양한 변이체들은 투여 전에 예를 들면, 상기에서 기재된 바와 같이, 약제학적으로 허용가능한 담체와 함께 제형화될 수 있다. 약제학적으로 허용가능한 담체는 투여될 특정한 조성물에 의해서, 뿐만 아니라 조성물을 투여하기 위해 사용된 특정한 방법에 의해서 부분적으로 결정된다.

[0059] 대상체에서 투여된 용량은, 본원에서 기재된 방법의 맥락에서, 경시적으로 상기 대상체에서 유익한 치료적 반응 (예를 들면, 증가된 피하 지방생성)에 영향을 미치기에 충분해야 한다. 용량은 이용된 특정한 비히클/전달 방법

의 효능, 투여 부위, 투여 경로, 및 상기 대상체의 상태, 뿐만 아니라 치료될 대상체의 체중 또는 표면적에 의해 결정될 것이다. 용량의 크기는 또한, 특정한 대상체에서 특정한 펩타이드의 투여를 동반하는 임의의 부정적인 부작용의 존재, 성, 및 정도에 의해 결정될 것이다.

[0060] 표 1에 개시되어 있는 다양한 변이체들은 당해분야의 숙련가에게 잘 알려진 표준 방법에 따라 전신으로(예를 들면, 경구로, 또는 주사제로서) 투여될 수 있다. 펩타이드는 로젠지, 에어로졸 스프레이, 구강청결제, 코팅된 면봉 등과 같은 다양한 형태로 구강에 투여될 수 있다. 다양한 구강, 및 설하 제형 역시 고려될 수 있다. 표 1에 개시되어 있는 다양한 변이체들은 일정 기간에 걸쳐 치료를 제공하기 위해 주사제로서 제형화될 때 데포(depot) 제형으로 투여될 수 있다.

[0061] 표 1에 개시되어 있는 다양한 변이체들은 예를 들면, 피부 표면에, 국소 병변 또는 창상에, 수술 부위 등에 국소로 투여될 수 있다.

[0062] 표 1에 개시되어 있는 다양한 변이체들은 종래의 경피 약물 전달 시스템, 즉, 경피 "패치"를 이용하여 피부를 통해 전달될 수 있고, 표 1에 개시되어 있는 다양한 변이체들은 전형적으로 피부에 부착될 약물 전달 장치로서 제공되는 적층된 구조 내에 함유될 수 있다.

[0063] 국소 전달을 위한 다른 제형은, 비제한적으로, 연고, 겔, 스프레이, 유체, 및 크림을 포함한다. 연고는 전형적으로 바셀린 또는 다른 석유 유도체에 기초한 반고형 조제물일 수 있다. 다른 담체 또는 비히클과 마찬가지로, 연고 기제는 불활성이고, 안정하고, 무자극이고 비감작이어야 한다. 선택된 표 1에 개시되어 있는 다양한 변이체들을 함유하는 크림은 전형적으로 점성 액체 또는 반고체 에멀젼, 종종 수중유 또는 유중수일 수 있다. 크림 기제는 전형적으로 수세척성이고, 오일상, 유화제 및 수성상을 함유한다. 사용될 특정 연고 또는 크림 기제는, 당해분야의 숙련가에게 의해 인정될 바와 같이, 최적의 약물 전달을 위해 제공될 기제이다.

[0064] 표 1에 개시되어 있는 다양한 변이체들은 희석을 위해 준비된 저장 용기(예를 들면, 미리측정된 부피로), 또는 다량의 물, 알코올, 과산화수소, 또는 다른 희석제에의 첨가를 위해 준비된 가용성 캡슐 내에, "농축물"로서 제공될 수 있다. 예를 들면, 상기 펩타이드는 추후 재구성을 위해 동결건조될 수 있다.

[0065] 표 1에 개시되어 있는 다양한 변이체들은 다양한 용도를 가질 수 있다. 표 1에 개시되어 있는 다양한 변이체들은 많은 적용에서 용도를 가질 수 있다. 예를 들면, 피하 지방은 피부에 풍만함과 견고함을 제공하므로, 피하 지방의 형성을 향상시키는 것은 성형수술 절차에서 용도를 갖는다. 노화하는 피부는 적은 피하 지방을 함유한다. 따라서 본 개시에서 기재된 하나 이상의 표 1에 개시되어 있는 다양한 변이체들을 원하는 부위에 투여하여 피하 지방 형성을 촉진하는 것은 더 풍만하고 더 어려보이는 피부를 야기할 수 있다. 이 접근법은 종종 낮은 성공률을 나타내는 과정인, 신체의 다른 부위(예를 들면, 허벅지 또는 엉덩이)로부터 지방세포를 이식하는 현재의 방법을 대체할 수 있다.

[0066] 표 1에 개시되어 있는 다양한 변이체들은 피하 지방 조직을 선택적으로 향상시키기 위해(예를 들면, 내장 지방 및/또는 다른 지방 조직을 실질적으로 증가시키지 않으면서 피하 지방 조직을 향상시키기 위해) 투여될 수 있다. 표 1에 개시되어 있는 다양한 변이체들의 투여에 반응하여, 지방세포 형성이 진피 섬유아세포에서 일어나고, 대상에서 선택된 피하 부위 안에서 부피가 추가될 수 있다.

[0067] 표 1에 개시되어 있는 다양한 변이체들은 흉터를 줄이는데 사용될 수 있다. 이것은 하나 이상의 표 1에 개시되어 있는 다양한 변이체들을 흉터 부위를 줄이고/거나 흉터 부위의 외관을 개선하는데 충분한 양으로 투여함으로써 달성될 수 있다. 흉터는, 예를 들면, 화상에 의해 생성된 흉터, 수술에 의해 생성된 흉터, 여드름에 의해 생성된 흉터, 생검에 의해 생성된 흉터, 또는 부상으로 생긴 흉터일 수 있다.

[0068] 표 1에 개시되어 있는 다양한 변이체들은 예를 들면, 피부의 외관을 개선하기 위해, 다양한 화장 과정에서 사용될 수 있다. 이것은 하나 이상의 펩타이드를 대상의 부위에 피부의 외관을 개선하는데 충분한 양으로 투여함으로써 달성될 수 있다. 그러한 투여는 입술, 눈꺼풀, 뺨, 이마, 턱, 목 등과 같은 영역에의 피하 투여를 포함할 수 있다. 상기 펩타이드는 주름을 줄이고, 처지는 피부를 줄이고, 피부의 표면 질감을 개선하고, 주름을 줄이거나, 제거하거나, 메우고, 노인 반점을 제거하거나 줄이고, 및/또는 눈 아래의 다크써클을 제거하는 이들 방법 등에 사용될 수 있다. 이들 화장 적용은 예시적이며 제한하고자 하는 것이 아니다.

[0069] 표 1에 개시되어 있는 다양한 변이체들은 대상의 부위에서 조직 부피를 개선하는데 사용될 수 있다. 이것은 본원에 기재된 하나 이상의 펩타이드를 대상의 부위에서 조직 부피를 증가시키는데 충분한 양으로 투여함으로써 달성될 수 있다. 예를 들면, 조직 부피의 증가는 유방 조직을 견고하게 하거나 증대시키는 것 및/또는 엉덩이

조직 또는 신체 또는 얼굴의 다른 부위를 견고하게 하거나 증대시키는 것을 포함할 수 있다.

[0070] 이 때 사용되는 FGF7는 0.01 내지 10ppm의 양으로 사용될 수 있다. 10 ppm 이상에서는 과다한 양으로 이상반응을 유도할 수 있는 부작용의 가능성이 있다. 따라서, 실제적 사용범위는 0.01~10 ppm이며, 바람직하게는 0.01~2 ppm 일 수 있다.

[0071] 표 1에 개시되어 있는 다양한 변이체들은 또한 대상의 부위 내의 피부를 부드럽게 하는데 사용될 수 있다. 이것은 본원에 기재된 하나 이상의 펩타이드를 원하는 부위에서 피부를 부드럽게 하는데 충분한 양으로 투여함으로써 달성될 수 있다. 상기 부드럽게 하는 것은 여드름에 의해 흉터난 피부를 부드럽게 하는 것, 셀룰라이트의 부위를 부드럽게 하는 것, 임신선을 부드럽게 하거나 줄이는 것, 및/또는 주름을 펴는 것을 포함할 수 있다.

[0072] 표 1에 개시되어 있는 다양한 변이체들은 대상에서 줄기세포를 피하 지방의 형성으로 동원하는데 사용될 수 있다. 이것은 표 1에 개시되어 있는 다양한 변이체들을 줄기세포를 피하 지방의 형성으로 동원하는데 충분한 양으로 투여함으로써 달성될 수 있다. 이는, 예를 들면, 다양한 재건 수술 과정 등에서 유용성을 갖는다.

[0073] 표 1에 개시되어 있는 다양한 변이체들은 대상에서 조직을 재건하는데 사용될 수 있다. 그러한 재건은, 예를 들면, 유방재건(예를 들면 종양을 제거하는 수술 후), 또는 얼굴 또는 팔다리 재건(예를 들면 자동차 사고 또는 화상 후)을 포함할 수 있다. 이것은 표 1에 개시되어 있는 다양한 변이체들을 조직 재건 과정 동안 또는 이후에 조직의 부피를 증가시키는 양으로 투여함으로써 달성될 수 있다. 표 1에 개시되어 있는 다양한 변이체들은 조직 이식 물질 또는 피부 또는 부상된 조직의 치유를 향상시키는 다른 절차와 함께 임의로 사용될 수 있다.

[0074] 표 1에 개시되어 있는 다양한 변이체들은 걸을 때 상기 대상에 의해 경험되는 뒷꿈치 통증을 감소시키는데 충분한 양으로 투여함으로써 대상에서 뒷꿈치 통증을 감소시키는데 사용될 수 있다.

[0075] 표 1에 개시되어 있는 다양한 변이체들은 체온조절을 증가시키고/거나 면역 기능을 개선하기 위해 피하 지방의 확대를 위해 투여될 수 있다. 대상은 질환을 예방하거나, 비제한적으로 심혈관 질환을 포함하는 증가된 장기 지방과 연관된 진행중인 질환, 및 다른 비만 연관된 질환을 치료하기 위해 표 1에 개시되어 있는 다양한 변이체들로 처리될 수 있다.

[0076] 이들 방법 중 어느 것에서의 투여는 국소 또는 전신일 수 있고, 본원에 기재된 임의의 경로, 예컨대 국소, 피하, 경피, 경구, 코, 질, 및/또는 직장 투여에 의할 수 있다. 바람직하게는, 표 1에 개시되어 있는 다양한 변이체들은 피하 주사에 의해 투여될 수 있다. 대안적으로, 상기 표 1에 개시되어 있는 다양한 변이체들은 얼굴 크림과 같은 피부 크림의 형태로 국소 투여되거나, 또는 경피 패치를 통해 경피로 투여될 수 있다.

[0077] 상기 용도 및 방법이 인간에서의 용도와 관련하여 기재되어 있음에도 불구하고, 이들은 또한 동물, 예를 들면, 수의적 용도에 적합하다. 따라서 어떤 바람직한 유기체는, 비제한적으로 인간, 비-인간 영장류, 개과, 말, 고양이, 돼지, 유제류, 토끼류 등을 포함한다.

[0078] **배지**

[0079] 표 1에 개시되어 있는 다양한 변이체들은 적어도 5번의 계대 배양 동안에 미분화된 상태로 만능성 줄기 세포를 유지시키는데 필요한 양에 해당하는 '배지학적 유효량'으로 포함되어 인간 만능성 줄기 세포 배지로 제공될 수 있다.

[0080] 인간 배아 줄기 세포 및 유도된 만능성 줄기 세포 둘 다를 포함하는, 본 개시에서, 용어 '인간 만능성 줄기 세포'는, 동일한 자신의 후대와 인간 신체의 실제 모든 세포 타입을 생성할 수 있게 하는 만능성을 형성하는 능력-자가-재생력 (self-renewal capacity) - 을 특징으로 한다.

[0081] 본 개시에서, 용어 '줄기 세포를 만능성 상태로 유지시킨다'는 것은 실제 모든 세포 타입으로 분화할 수 있는 능력을 가진 미-분화된 상태로 세포를 유지시키는 것을 의미한다. 이러한 만능성 상태는 FGF7가 가장 중요한 성장인자인 성장인자들의 줄기성(stemness)-지지 칵테일에 의존한다. FGF7는 여러가지 방식으로 자가-재생을 지원한다: 미토겐-활성화된 단백질 키나제 경로를 직접 활성화하고, 형질전환 성장인자 β1 및 액티빈 신호전달을 간접적으로 촉매한다 (Greber, et al. 2008, Stem Cells25, 455-464). FGF7는, 세포 부착 및 생존 기능을 통해, 인간 PSC의 만능성에 복합적으로 기여한다 (Eisellova, et al. 2009, Stem Cells 27, 1847-1857).

[0082] 본 개시는 조작된 대상 FGF7의 특징 규명, 단백질에서의 치환 효과 입증, 인간 PSC 배양에서 단백질의 이용 방법, 및 인간 PSC를 미분화된 상태로 배양하는데 적합한 본원에 기술된 하나 이상의 내열성 FGF7 단백질을 포함하는 배지를 제공한다. 본원에 제공된 실시예들에서 사용되는 인간 배아 줄기 세포 (ESC)는 의사에 의한 사전동

의 하에 수득된 배반포기 배아로부터 유래되었다. 29-41회 계대의 특징이 잘 규명된 인간 ESC 세포주 (Adewumi, et al. 2007, Nat Biotechnol 25, 803-816) CCTL14 (Centre of Cell Therapy Line)를 사용하였다. 인간 유도된 만능성 줄기 세포 (iPSC)에서와 같이, 야마나카의 칵테일 (Yamanaka's cocktail) 및 센다이 바이러스 형질감염 (Sendai virus transfection)에 의한 피부 섬유모세포의 리프로그래밍을 이용하여 유래된 AM13 세포주는 34-41회 계대 상태를 사용하였다 (Kruta et al. 2014, Stem Cells and Development 23, 2443-2454).

[0083] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실험예들을 제시하나, 하기 실험예들은 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0084] 실험예 1: pCold I 벡터를 이용한 돌연변이체들의 구축, 정제 및 열적 안정성 분석

[0085] FGF7의 1개 위치의 돌연변이(A120C), 2개 위치의 돌연변이(A120C, K126E), 2개 위치의 돌연변이(A120C, K178E), 3개 위치의 돌연변이(A120C, K126E, K178E)를 합성하고, His-Tag를 가진 pCold I 벡터에 서브클로닝하였다. FGF7가 삽입된 재조합 벡터를 BL21(DE3) 세포에 형질전환하여 발현하였다.

[0086] 10ml LB media(Ambrothia) (0.25g 사용)에 접종하고 암피실린(Ampicillin, 50mg/ml)을 10ul을 첨가 후 37℃에서 배양하였다.

[0087] 전배양액 10ml과 암피실린(Ampicillin, 50mg/ml) 1ml을 1L LB media(ambrothia)(25g 사용)에 접종하여 37℃에서 본 배양하였다. OD_{600}의 수치가 0.6일 때 4℃냉장고에서 배양액을 10분간 냉각시켜준 후 베타-디-1-티오갈락토피라노사이드 (β-D-1-thiogalactopyranoside; IPTG) 5mM을 첨가하여 17℃에서 24시간 발현을 유도한 대장균 세포를 얻었다.

[0088] 원심분리 후, 최적으로 용해된 상층액은 Ni-NTA 비즈가 있는 컬럼에 주입하였다. 컬럼에 주입된 pCold I_FGF7 단백질 부피의 3배 되는 첫 번째 세척(wash) 완충용액(20mM Tris pH 8.0, 200mM NaCl)과 두 번째 세척(wash) 완충용액 (20mM Tris pH 8.0, 200mM NaCl, 30mM 이미다졸)로 씻고, 100ml 용리완충용액(elution buffer, 20mM Tris pH 8.0, 200mM NaCl, 1M 이미다졸)을 사용하여 순차적으로 이미다졸 농도를 높이며 FGF7 단백질을 용리하여 1차 정제하였다.

[0089] 1차 친화성 크로마토그래피(Ni-NTA) 실험을 통해 정제된 상층액은 2차로 헤파린(heparin) 비즈가 있는 컬럼에 주입하였다. 컬럼에 주입된 pCold I_hFGF7 단백질 부피의 3배 되는 첫 번째 세척 완충용액(20mM Tris 8.0, 200mM NaCl)으로 씻고, 60ml 용리완충용액(20mM Tris pH 8.0, 1500mM NaCl)으로 용리하여 2차로 정제하였다.

[0090] 마지막으로 pCold I_hFGF7 단백질 분획은 HiLoad™ 16/60 Superdex 75(Amersham Biosciences) 컬럼과 1X PBS 버퍼(137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na_2HPO_4, 2mM KH_2PO_4, pH 7.4), (WELGENE)를 이용한 젤 여과 방법에 의해 정제되었다.

[0091] 37℃안정성 실험

[0092] 정제된 FGF7 단백질 들은 1X PBS 버퍼를 기본 사용하여 0.5mg/ml 농도로 37℃에서 0, 4, 8, 12, 15일 동안 반응하였으며 코마쉬 블루 염색시약으로 염색하여 15% SDS-PAGE 전기영동을 실시하였다. SDS-PAGE GEL에 남아있는 단백질 밴드들은 ImageJ 프로그램(Wayne Rasband, NIH)을 사용하여 정량적으로 밀도(density)를 측정하였다.

[0093] 도 3에 예시되어 있는 바와 같이, 15% SDS-PAGE를 통해 확인된 FGF7 폴리펩타이드 밴드들로부터 변이체들의 열적 안정성이 향상되었음을 알 수 있다.

[0094] 밀도 측정은 imageJ 프로그램(Wanyne Rasband)을 사용하여 SDS-PAGE GEL의 밀도를 측정하였다. 그 결과가 아래 표 2에 기재되어 있으며, 도 4에 그래프로 표시되어 있다.

표 2

[0095]

	0 day	4 day	8 day	12 day	15 day
Δ30_hFGF7(야생형)	100	40	14	4	4
Δ53_hFGF7(palifermin)	100	60	46	23	18
Δ53_hFGF7(A120C)	100	87	77	73	66
Δ53_hFGF7(A120C, K126E)	100	97	89	103	96
Δ53_hFGF7(A120C, K178E)	100	107	94	107	100
Δ53_hFGF7(A120C, K126E, K178E)	100	116	120	112	118

[0096] 단위 %

[0097] 표 2 및 도 4의 결과로부터 △53N_hFGF7(palifermin)은 15일째에 단백질 밴드가 18%로 감소한 반면 이황화 결합을 유도한 △53N_hFGF7(A120C)는 15일째 날에 66%가 남아 있음을 알 수 있다. 이황화 결합과 이온결합을 유도한 △53N_hFGF7(A120C, K126E), △53N_hFGF7(A120C, K178E)는 각각 15일째에 각각 96% 및 100% 단백질이 남아 있음을 알 수 있다. 3개 위치의 돌연변이를 모두 도입한 △53N_hFGF7(A120C, K126E, K178E)은 15일째날 118%로 0일차 보다 늘어나는 오차를 보이나 100% 근처의 밴드들이 15일간은 안정적으로 유지하고 있음을 알 수 있다.

[0098] N-말단(N-terminal)의 길이에 따른 안정성을 확인하기 위한 △30N_hFGF7(wild)와 △53N_hFGF7(palifermin) 안정성 비교 결과 시그날 펩타이드(signal peptide)를 제거한 △30N_hFGF7(야생형)와 N-말단이 더 짧은 △53N_hFGF7(palifermin)의 15일째 되는 날 밀도가 각각 4%와 18%로 N-말단의 길이가 더 짧은 △53N_hFGF7(palifermin)가 37℃ 온도에서 더 안정한 것을 알 수 있다.

[0099] 45℃ 안정성 실험

[0100] 정제된 FGF7 단백질 들은 1X PBS 버퍼를 기본 사용하여 0.5mg/ml 농도로 45℃에서 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7일 동안 반응하였으며 코마쉬 블루 염색시약으로 염색하여 15% SDS-PAGE 전기영동을 실시하였다. 도 5에 그 결과가 예시되어 있다.

[0101] 도 5에 예시되어 있는 바와 같이, 15% SDS-PAGE를 통해 확인된 FGF7 폴리펩타이드 밴드들로부터 변이체들의 열적 안정성이 향상되었음을 알 수 있다.

[0102] 밀도 측정은 imageJ 프로그램(Wanyne Rasband)을 사용하여 SDS-PAGE 젤의 밀도를 측정하였다. 그 결과가 아래 표 3 및 도 6에 기재되어 있다.

표 3

[0103]

	0 day	1 day	2 day	3 day	4 day	5 day	6 day	7 day
Δ30_hFGF7(야생형)	100	0	0	0	0	0	0	0
Δ53_hFGF7(palifermin)	100	0	0	0	0	0	0	0
Δ53_hFGF7(A120C)	100	16	6	0	0	0	0	0
Δ53_hFGF7(A120C, K126E)	100	57	51	42	30	29	19	22
Δ53_hFGF7(A120C, K178E)	100	66	51	43	22	21	10	9
Δ53_hFGF7(A120C, K126E, K178E)	100	84	86	81	74	80	76	79

[0104] 단위 %

[0105] 표 3 및 도 6의 결과로부터 모든 변이체들이 야생형 hFGF7 보다 열적 안정성이 향상되었음을 알 수 있다.

[0106] △53N_hFGF7은 하루 만에 단백질 밴드가 0%가 된 반면 이황화 결합을 유도한 △53N_hFGF7(A120C)는 3일째 0%가 되었음을 알 수 있다. 이황화 결합과 이온결합을 유도한 △53N_hFGF7(A120C, K126E), △53N_hFGF7(A120C, K178E)는 각각 7일째 날 22%, 9% 단백질이 남아 있음을 확인할 수 있었다. 앞서 확인된 돌연변이를 모두 도입한 △53N_hFGF7(A120C, K126E, K178E)은 7일째날 79%의 단백질 밴드를 확인할 수 있었다.

[0107] 또한, 45℃ 온도에서 Δ30_hFGF7(야생형)과 Δ53_hFGF7(palifermin)와 같이 N-terminal의 길이에 따른 차이가 크게 존재하지 않음을 확인할 수 있었다.

[0108] 실험예 3: 돌연변이체들의 세포증식능 확인

[0109] 실험예 1과 동일한 방법으로 제조한 돌연변이체들에 대해서 HaCaT 세포를 사용하였고, 10% 소 태아 혈청(fetal bovine serum을 포함한 DMEM 배지에서 배양 및 유지하였다. FGF7에 의한 세포증식활성을 확인하기 위해서 세포는 0.03% BSA를 포함하는 무혈청(serum-free) DMEM 배지를 사용하였다.

[0110] 96 웰 플레이트에 세포수 0.6x 10^4 /well 로 배양하였고, 헤파린(heparin) (10 ug/ml) 과 함께 FGF7 (300 ng/ml)로 40시간 처리하였다. 세포수 증가는 WST-8 [2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt]를 사용하여, 전자 매개체(electron mediator)와 세포내 탈

수소효소(dehydrogenases)에 의해 형성되는 WST-8 포르마잔(formazan) 생성 정도를 측정함으로써 확인하였다. WST-8 포르마잔 생성 정도는 흡광도 (450 nm)을 통하여 확인할 수 있다. 실험은 4번 반복하였고, '평균 ± 표준편차' 방식으로 표현하였다.

[0111] FGF7 단백질들은 45℃에서 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8일 동안 각각 보관한 후, 세포증식활성 변화를 확인하였다.

[0112] 그 결과가 표 4 및 도 7에 예시되어 있다.

표 4

[0113]

구분	50% 활성(ED50)
Δ30_hFGF7(야생형)	0.8일
Δ53_hFGF7(palifermin)	1.7일
Δ53_hFGF7(A120C)	8.0일
Δ53_hFGF7(A120C, K126E)	1107일
Δ53_hFGF7(A120C, K178E)	33.9일
Δ53_hFGF7(A120C, K126E, K178E)	

[0114] 표 4 및 도 7를 참조하면, △30N_hFGF7 (야생형)의 경우 45도에서 단백질을 보관하는 시간이 길어짐에 따라 세포증식 활성이 감소하게 되어 50% 활성 (ED50)을 가지는 시점이 0.8일인 반면에, △53N_hFGF7 (palifermin)의 경우는 ED50가 1.7일까지 증가된 단백질임을 확인하였다. 반면, △53N_hFGF7 (A120C)는 ED50가 8일까지 증가되고, △53N_hFGF7 (A120C, K178E)의 ED50는 33.9일, △53N_hFGF7(A120C, K126E)는 1107일 까지 증가됨을 확인하였다. 또한, △53N_hFGF7 (A120C, K126E, K178E)는 45도에서 8일간 보관하였음에도 세포증식활성 감소가 관찰되지 않음을 통해서, △53N_hFGF7(A120C, K126E, K178E)가 열에 대한 안정성이 가장 증가된 변이단백질임을 확인하였다.

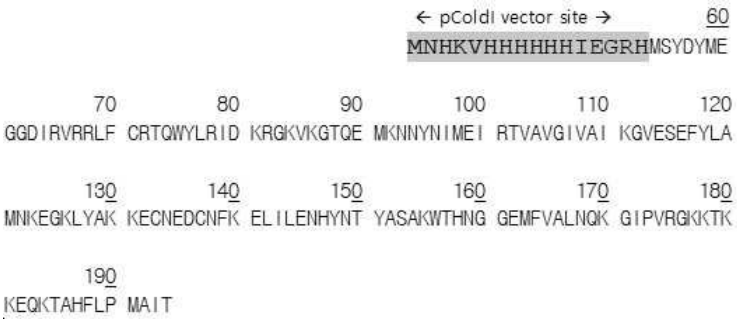
[0115] 상기에서는 다양한 실시예들에 대하여 설명하였지만, 권리범위는 이에 의해 한정되는 것이 아니다. 구현되는 형태는 발명의 상세한 설명 및 첨부한 도면의 범위 안에서 여러 가지로 변형하여 실시하는 것이 가능하고 이 또한 권리 범위에 속하는 것은 당연하다.

도면

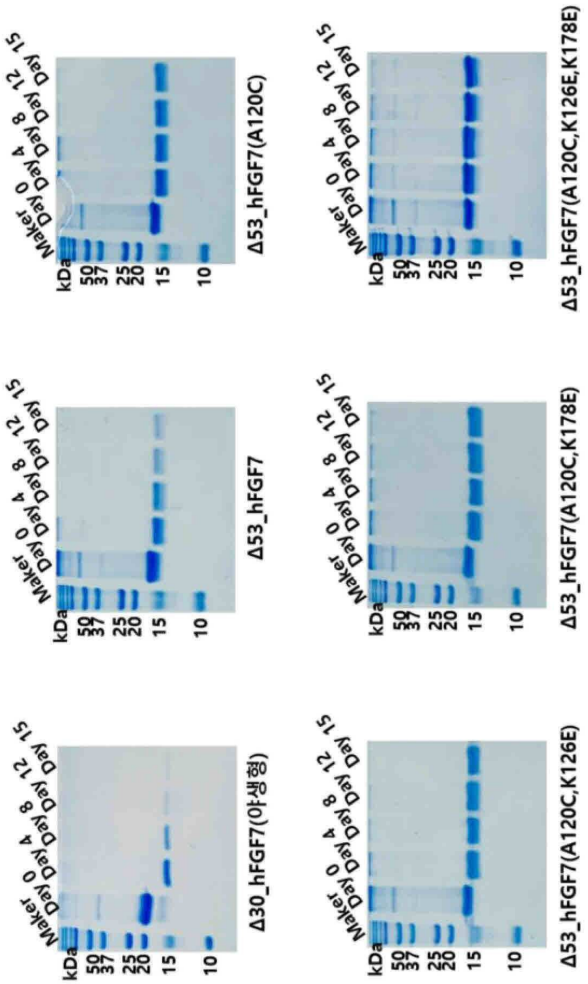
도면1

```
        10         20         30         40         50         60
MHKWILTWIL PTLLYRSCFH IICLVGTISL ACNDMTPEQM ATNVNCSSPE RHTRSYDYME

        70         80         90        100        110        120
GGDIRVRRLF CRTQWYLRID KRGKVKGTQE MKNNYNIMEI RTVAVGIVAI KGVESEFYLA

       130        140        150        160        170        180
MNKEGKLYAK KECNEDCNFK ELILENHYNT YASAKWTHNG GEMFVALNQK GIPVRGKKTK

       190
KEQKTAHFLP MAIT
```

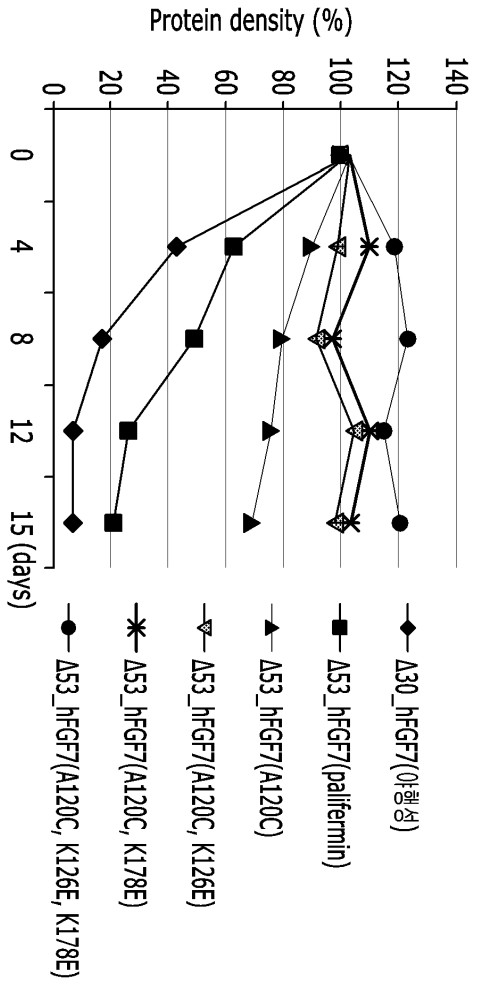
도면2


← pColdI vector site →
60
MNHKVHHHHHHIEGRHMSYDYME
70 80 90 100 110 120
GGDIRVRRLF CRTQWYLRID KRGKVKGTQE MKNNYNIMEI RTVAVGIVAI KGVESEFYLA
130 140 150 160 170 180
MNKEGKLYAK KECNEDCNFK ELILENHYNT YASAKWTHNG GEMFVALNQK GIPVRGKKTK
190
KEQKTAHFLP MAIT

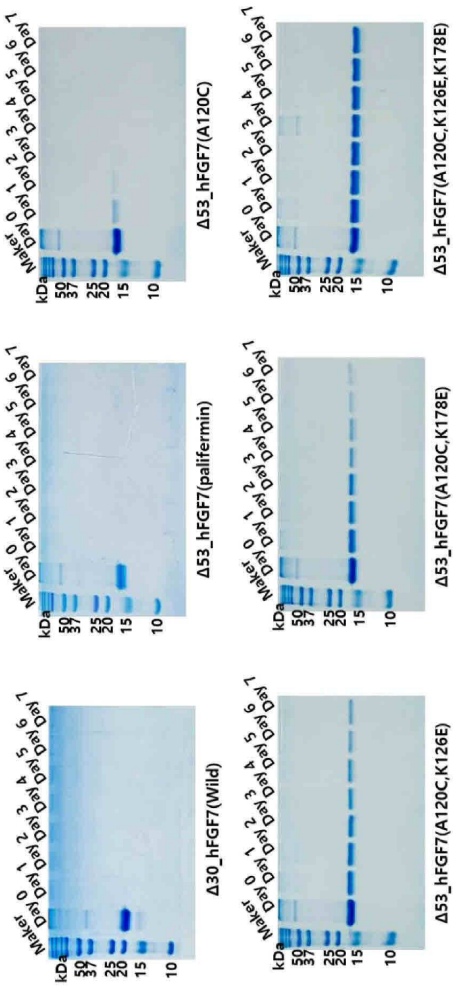
도면3


Δ53_hFGF7(A120C)
Δ53_hFGF7(A120C,K126E,K178E)
Δ53_hFGF7
Δ53_hFGF7(A120C,K178E)
Δ30_hFGF7(야생형)
Δ53_hFGF7(A120C,K126E)
Maker
Day 0
Day 4
Day 8
Day 12
Day 15
kDa
50
37
25
20
15
10

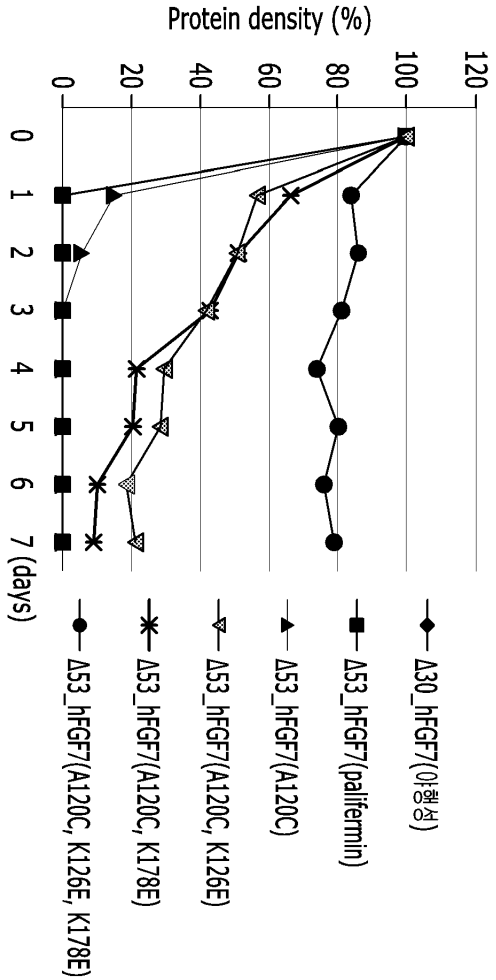
도면4


Protein density (%)
0
20
40
60
80
100
120
140
0
4
8
12
15 (days)
Δ30_hFGF7(야행성)
Δ53_hFGF7(palifermin)
Δ53_hFGF7(A120C)
Δ53_hFGF7(A120C, K126E)
Δ53_hFGF7(A120C, K178E)
Δ53_hFGF7(A120C, K126E, K178E)

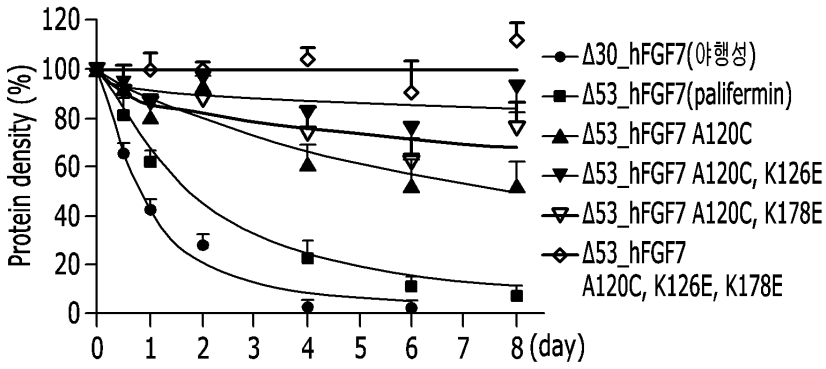
도면5


Δ53_hFGF7(A120C)
Δ53_hFGF7(A120C,K126E,K178E)
Δ53_hFGF7(palifermin)
Δ53_hFGF7(A120C,K178E)
Δ30_hFGF7(Wild)
Δ53_hFGF7(A120C,K126E)
kDa
Maker
Day 0
Day 1
Day 2
Day 3
Day 4
Day 5
Day 6
Day 7
50
37
25
20
15
10

도면6



도면7



서 열 목 록

<110> Korea Institute of Ocean Science and Technology

<120> THERMALLY STABLE FGF7 POLYPEPTIDE AND USE OF THE SAME

<130> DPP20202668KR

<160> 2

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 194

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FGF7 of Homo Sapiens

<400> 1

Met His Lys Trp Ile Leu Thr Trp Ile Leu Pro Thr Leu Leu Tyr Arg
1 5 10 15

Ser Cys Phe His Ile Ile Cys Leu Val Gly Thr Ile Ser Leu Ala Cys
20 25 30

Asn Asp Met Thr Pro Glu Gln Met Ala Thr Asn Val Asn Cys Ser Ser
35 40 45

Pro Glu Arg His Thr Arg Ser Tyr Asp Tyr Met Glu Gly Gly Asp Ile
50 55 60

Arg Val Arg Arg Leu Phe Cys Arg Thr Gln Trp Tyr Leu Arg Ile Asp
65 70 75 80

Lys Arg Gly Lys Val Lys Gly Thr Gln Glu Met Lys Asn Asn Tyr Asn
85 90 95

Ile Met Glu Ile Arg Thr Val Ala Val Gly Ile Val Ala Ile Lys Gly

100 105 110

Val Glu Ser Glu Phe Tyr Leu Ala Met Asn Lys Glu Gly Lys Leu Tyr
115 120 125

Ala Lys Lys Glu Cys Asn Glu Asp Cys Asn Phe Lys Glu Leu Ile Leu
130 135 140

Glu Asn His Tyr Asn Thr Tyr Ala Ser Ala Lys Trp Thr His Asn Gly
145 150 155 160

Gly Glu Met Phe Val Ala Leu Asn Gln Lys Gly Ile Pro Val Arg Gly
165 170 175

Lys Lys Thr Lys Lys Glu Gln Lys Thr Ala His Phe Leu Pro Met Ala
180 185 190

Ile Thr

<210> 2

<211> 157

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FGF7 variant of Homo Sapiens

<400> 2

Met Asn His Lys Val His His His His His His Ile Glu Gly Arg His
1 5 10 15

Met Ser Tyr Asp Tyr Met Glu Gly Gly Asp Ile Arg Val Arg Arg Leu
20 25 30

Phe Cys Arg Thr Gln Trp Tyr Leu Arg Ile Asp Lys Arg Gly Lys Val
35 40 45

Lys Gly Thr Gln Glu Met Lys Asn Asn Tyr Asn Ile Met Glu Ile Arg
50 55 60

Thr Val Ala Val Gly Ile Val Ala Ile Lys Gly Val Glu Ser Glu Phe
65 70 75 80

Tyr Leu Ala Met Asn Lys Glu Gly Lys Leu Tyr Ala Lys Lys Glu Cys
85 90 95

Asn Glu Asp Cys Asn Phe Lys Glu Leu Ile Leu Glu Asn His Tyr Asn

100 105 110

Thr Tyr Ala Ser Ala Lys Trp Thr His Asn Gly Gly Glu Met Phe Val
115 120 125

Ala Leu Asn Gln Lys Gly Ile Pro Val Arg Gly Lys Lys Thr Lys Lys
130 135 140

Glu Gln Lys Thr Ala His Phe Leu Pro Met Ala Ile Thr
145 150 155