

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202392890** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2024.04.01

(51) Int. Cl. **C07K 14/50** (2006.01)
C07K 14/71 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.05.25

(54) **МУТЕИНЫ ФАКТОРА РОСТА ФИБРОБЛАСТОВ 1 (FGF-1) ЧЕЛОВЕКА, ИХ ДИМЕРЫ И ВАРИАНТЫ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **P.438001**

(32) **2021.05.26**

(33) **PL**

(86) **PST/PL2022/050033**

(87) **WO 2022/250556 2022.12.01**

(71) Заявитель:

**ЦЕЛОН ФАРМА С.А.;
УНИВЕРСИТЕТ ВРОЦЛАВСКИ (PL)**

(72) Изобретатель:

**Отлевски Яцек Йозеф, Закржевска
Малгожата Урсула, Кроварш Даниель
Рафаль, Чирек Александра Анна,
Янижевски Михал Мичеслав,
Печиколян Ежи Ччепан, Дразазга
Ева, Базыдло-Гузенда Катаржина,
Буда Павел, Вечорек Мацей (PL)**

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к мутеинам фактора роста фибробластов (FGF-1) человека с пониженной митогенностью, димерам мутеинов FGF-1 человека, а также к таким мутеинам FGF-1 человека и димерам таких мутеинов для применения в снижении уровня глюкозы в крови, в частности для применения в лечении диабета.

A1

202392890

202392890

A1

МУТЕИНЫ ФАКТОРА РОСТА ФИБРОБЛАСТОВ 1 (FGF-1) ЧЕЛОВЕКА, ИХ ДИМЕРЫ И ВАРИАНТЫ ПРИМЕНЕНИЯ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

- 5 Настоящее изобретение относится к мутеинам фактора роста фибробластов 1 (FGF-1) человека с пониженной митогенностью, димерам таких мутеинов FGF-1 с пониженной митогенностью (как гомодимерам, так и гетеродимерам таких мутеинов), обладающим способностью снижать уровень глюкозы после введения, и их применениям в медицине, фармацевтике и в терапии, в частности при лечении
- 10 диабета, включая диабет 2 типа (СД2).

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

- Нарушения метаболического гомеостаза проявляются, в частности ожирением и резистентностью клеток, в частности резистентностью периферических клеток к действию инсулина (инсулинорезистентностью). Это приводит к более слабому
- 15 всасыванию глюкозы из крови и, следовательно, к развитию диабета 2 типа. Диабет в настоящее время классифицируется как одна из наиболее серьезных болезней цивилизации в мире. Количество субъектов, страдающих сахарным диабетом, продолжает увеличиваться, и сопровождающие его осложнения представляют угрозу для здоровья и жизни пациентов. Основным симптомом диабета является высокий
- 20 уровень глюкозы в крови (гипергликемия). Если такое состояние сохраняется в течение длительного времени, то оно приводит к повреждению кровеносных сосудов и артерий. Это приводит к нарушению кровоснабжения и дисфункции многих органов и, как следствие, к хроническим осложнениям: диабетической ретинопатии, диабетической нефропатии и диабетической нейропатии. Сахарный диабет также
- 25 ускоряет развитие атеросклеротических поражений кровеносных сосудов, приводящих к развитию ишемической болезни сердца и нижних конечностей, а также инсульта головного мозга. Несмотря на достижения в области медицины, у используемых в настоящее время методов лечения по-прежнему есть ряд нежелательных побочных эффектов, таких как риск возникновения слишком низкого
- 30 уровня глюкозы в крови (гипогликемия), жировой дистрофии печени или потери костной массы. В связи с наблюдаемым постоянным увеличением числа пациентов с

СД2 ведутся поиски новых методов лечения, направленных на устранение инсулинорезистентности. Среди наиболее эффективных лекарственных средств в настоящее время используют тиазолидиндионы (TZD), которые являются антагонистами ядерных рецепторов PPAR γ . Эти рецепторы регулируют адипогенез, метаболизм липидов и стимулируют медиаторы инсулина, которые опосредуют поглощение глюкозы периферическими тканями. Несмотря на высокую эффективность TZD, их применение связано с рядом побочных эффектов, таких как набор массы тела, потеря костной массы или сердечная недостаточность. По этой причине ведется поиск других медиаторов рецепторов PPAR, которые все еще будут характеризоваться высоким потенциалом сенсibilизации к инсулину, но не повлекут за собой риск побочных эффектов. При лечении СД2 также используются комбинированные методы лечения, то есть одновременное введение нескольких лекарственных средств, поскольку большинство пациентов не отвечают на отдельные лекарственные средства или быстро становятся нечувствительными к ним. Несмотря на достижения в медицине и внедрение новых лекарственных средств, полностью контролировать заболевание и его осложнения все еще невозможно. Одним из важных аспектов контроля метаболического гомеостаза является способность клеток жировой ткани ремоделировать и изменять базальный метаболизм в ответ на изменения доступности питательных веществ. В 2012 году Jonker et al. представили исследования, целью которых была идентификация контролируемых рационом питания генов в различных тканях, участвующих в обмене веществ (мышцы, печень, бурая жировая ткань (BAT), белая жировая ткань (WAT)). Было показано, что FGF-1 селективно индуцируется в висцеральной (гонадной) белой жировой ткани (gWAT) в ответ на рацион питания с высоким содержанием жира (Jonker, J. W., Suh, J. M., Atkins, A. R., Ahmadian, M., Li, P., Whyte, J., He, M., Juguilon, H., Yin, Y., Phillips, C. T., Yu, R. T., Olefsky, J. M., Henry, R. R., Downes, M., & Evans, R. M. (2012). A PPAR γ -FGF1 axis is required for adaptive adipose remodelling and metabolic homeostasis. *Nature*, 485(7398), 391–394. <https://doi.org/10.1038/nature10998>) Последующие эксперименты *in vivo* показали, что делеция гена FGF-1 у мышей приводит к системной метаболической дисфункции и повышению резистентности к инсулину. У мышей без гена FGF-1, которые получали рацион с высоким содержанием жиров, развился агрессивный

диабетический фенотип в результате ограниченного роста жировой ткани. Кроме того, авторы продемонстрировали, что индукция FGF-1 в WAT контролируется ядерными рецепторами PPAR γ (Jonker et al., 2012).

Семейство факторов роста фибробластов FGF у людей и у грызунов состоит из 22 генов, кодирующих структурно родственные полипептиды. Эти гены расположены на различных хромосомах, что свидетельствует о том, что семейство FGF образовалось в результате дупликации и транслокации генов и хромосом. Белок FGF-1 представляет собой паракринный белок, который секретируется различными типами клеток (например, фибробластами, адипоцитами) и действует местно. FGF-1 человека (hFGF1) состоит из 155 аминокислот (АК), из которых первые 14 АК составляют пропептид, который удаляется при созревании в процессе экспрессии клеточного белка. Из литературы известны рекомбинантные человеческие (rh) формы FGF-1 трех различных длин: полноразмерная (155 АК) и две формы с делециями N-конца (содержащие аминокислоты 15 - 155 АК и 21 - 155 АК). Согласно современным данным, у всех трех форм наблюдается близкое связывание с FGFR и гепарином и близкая митогенность. FGF-1 является известным и сильным митогеном для многих клеток (он стимулирует деление и пролиферацию клеток). Лиганд FGF-1 связывается со всеми четырьмя клеточными рецепторами FGF (FGFR1-4). Комплекс белок-рецептор стабилизируется гепаранами, полисахаридами, в природе присутствующими на поверхности клеток. В литературе указано, что нативный (в природном состоянии, дикого типа) белок FGF-1 характеризуется низкой термической стабильностью (температура денатурации составляет около 40 °C) и, следовательно, коротким биологическим временем полужизни (время полужизни в DMEM составляет около 1,1 - 2 часов) (Zakrzewska, M., Krowarsch, D., Wiedlocha, A., & Otlewski, J. (2004). Design of fully active FGF-1 variants with increased stability. *Protein Engineering Design and Selection*, 17(8), 603–611. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16126225/>).

Белок FGF-1, эндогенно продуцируемый организмом, секретируется, среди прочих, в жировой ткани и необходим для поддержания метаболического гомеостаза этой ткани. Потеря способности синтезировать FGF-1 приводит к развитию СД2. В современной литературе приведены исследования, целью которых было определение эффекта экзогенного введения белка FGF-1 (более конкретно,

рекомбинантного человеческого FGF-1: rhFGF-1) животным с диабетом 2 типа, индуцированным рационом с высоким содержанием жиров. Цель этих исследований состояла в определении влияния введения лиганда FGF-1 на снижение уровня глюкозы в крови у животных и восстановление метаболического гомеостаза. Было доказано, что rhFGF-1 снижает концентрацию глюкозы в крови. Кроме того, было доказано, что rhFGF-1 снижает концентрацию глюкозы, не вызывая при этом гипогликемии, что является значительным преимуществом по сравнению с лекарственными средствами, используемыми в настоящее время для лечения диабета 2 типа. Однако вследствие сильных митогенных свойств и короткого времени полужизни (быстрого распада) rhFGF-1 нельзя вводить пациентам с диабетом 2 типа. Сильная митогенность FGF-1 может вызывать множество негативных эффектов, включая индукцию неоплазии. Тем не менее, благодаря полезному механизму действия, заключающемуся в сенсбилизации клеток к действию эндогенного инсулина, и отсутствию риска развития гипогликемии, rhFGF-1 является интересным кандидатом для дальнейшей разработки терапевтического средства для лечения СД2.

В 2014 году Suh et al продемонстрировали противодиабетический эффект подкожного введения FGF-1 в моделях на животных диабета, индуцированного рационом с высоким содержанием жиров (Suh, J. M., Jonker, J. W., Ahmadian, M., Goetz, R., Lackey, D., Osborn, O., Huang, Z., Liu, W., Yoshihara, E., van Dijk, T. H., Havinga, R., Fan, W., Yin, Y.-Q., Yu, R. T., Liddle, C., Atkins, A. R., Olefsky, J. M., Mohammadi, M., Downes, M., & Evans, R. M. (2014). Endocrinization of FGF1 produces a neomorphic and potent insulin sensitizer. *Nature*, 513(7518), 436–439. <https://doi.org/10.1038/nature13540>). В своих экспериментах Suh et al. использовали полноразмерный (155 АК) белок rhFGF1. В Таблице 1 содержится информация, касающаяся исследуемых моделей, используемых Suh et al.

Модель на животном	Тип изменения	Наиболее важные особенности фенотипа
ob/ob	Мутация белка лептина	<ul style="list-style-type: none">• Ожирение• Гипергликемия• Инсулинорезистентность

		<ul style="list-style-type: none"> • β-клетки поджелудочной железы секретируют инсулин (диабет 2 типа)
db/db	Мутация рецептора лептина	<ul style="list-style-type: none"> • Ожирение • Гипергликемия • Инсулинорезистентность • β-клетки поджелудочной железы секретируют инсулин (диабет 2 типа)
DIO (ожирение, вызванное рационом)	Рацион с высоким содержанием жиров	<ul style="list-style-type: none"> • Ожирение • Гипергликемия • β-клетки поджелудочной железы секретируют инсулин (диабет 2 типа)
STZ	Введение стрептозотоцина	<ul style="list-style-type: none"> • Отсутствие ожирения • Гипергликемия • Поврежденные β-клетки поджелудочной железы не секретируют инсулин (диабет 1 типа)
C57BL/6J	Мышей кормили стандартным кормом	<ul style="list-style-type: none"> • Здоровые животные

Таблица 1. Перечень и краткие характеристики моделей диабета у животных, используемых в экспериментах Suh et al (SALK Institute) (King, A. J. F. (2012). The use of animal models in diabetes research. *British Journal of Pharmacology*, 166(3), 877–894. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.01911.x>).

- 5 Во всех группах животных, имеющих фенотип диабета 2 типа, наблюдалось значительное снижение концентрации глюкозы в крови после введения им rhFGF-1. Как и ожидалось, в случае модели STZ (мыши, характеризующейся отсутствием секреции инсулина β -клетками поджелудочной железы), которая представляет собой фенотип диабета 1 типа, rhFGF-1 не вызывал снижения уровня глюкозы в крови. Этот

результат позволяет сделать вывод, что этот белок не имитирует биологический эффект, достигаемый при введении инсулина. В случае здоровых животных (с физиологическим значением концентрации глюкозы в крови примерно 135 мг/дл) введение белка было нейтральным и не снижало концентрацию глюкозы в крови.

- 5 Противодиабетический эффект однократного введения rhFGF-1 сохранялся в течение по меньшей мере последующих 24 часов. Действие rhFGF-1 оказалось дозозависимым; однако гипогликемический эффект не наблюдался ни для одной используемой дозы. В отличие от тиазолидиндионов, rhFGF-1 не вызывал увеличения массы тела и не снижал плотность костной ткани, но он способствовал снижению
- 10 уровня стеатоза печени (TZD повышают его), что было фактом, наблюдаемым при терапии rhFGF-21.

Ниже представлена используемая Suh et al. последовательность полноразмерного человеческого рекомбинантного rhFGF-1 (155 АК):

- 15 MAEGEITTFALTEKFNLPNGYKKPKLLYCSNGGHFLRILPDGTVDGTRDRSDQHILQLLSAESVGEV
YIKSTETGQYLAMDTDGLLYGSQTPNEECLFLERLEENHYNTYISKKHAEKWNFVGLKKNNGSCKRGRPR
THYGQKAILFLPLPVSSD

- Как указано выше, нативный белок FGF-1 характеризуется высоким митогенным потенциалом, что приводит к чрезмерной пролиферации клеток и сопряжено с
- 20 риском неоплазии. Известно, что у FGF-1 выявляют сильную аффинность к его клеточным рецепторам (FGFR), что приводит к сильной внутриклеточной передаче сигнала. Связывание лиганда FGF-1 с рецептором запускает внутриклеточный сигнальный каскад, вызывающий интенсивное деление клеток. Suh et al. проверили,
- 25 можно ли отделить митогенный потенциал FGF-1 от его противодиабетической активности. Для этой цели они разработали мутантный FGF-1, в котором отсутствовали 24 N-концевые аминокислоты. Они предположили, что удаление этих аминокислот уменьшит силу связывания лиганда FGF-1 с рецептором FGFR, что приведет к снижению митогенности белка.

- 30 Последовательность разработанного рекомбинантного человеческого усеченного (укороченного) на 24 АК FGF-1 (FGF1^{ΔNT}; K25 - D155) представлена далее:

MKPKLLYCSNGGHFLRILPDGTVDGTRDRSDQHILQLLSAESVGEVYIKSTETGQYLAMDTDGLLYGS
QTPNEECLFLERLEENHYNTYISKKHAEKNWVGLKKNNGSCKRGPRTHYGQKAILFLPLPVSSD

5 Как и прогнозировалось, для усеченного лиганда продемонстрировали более низкую аффинность к FGFR, что приводило к значительному снижению митогенного эффекта, однако FGF1^{ΔNT} сохранял противодиабетический потенциал, наблюдаемый для белка дикого типа.

Для того чтобы изучить механизм действия FGF-1 и роль базального рецептора, связывающего лиганд FGF-1 (FGFR), Suh et al. разработали еще один мутантный белок (FGF1^{ΔNT2}), из которого были удалены первые 28 N-концевых аминокислот (т.е. аминокислоты: MAEGEITTF ALTEKFNLP GNYKKPKL). Такое изменение блокировало связывание с FGFR1 и лишало белок его противодиабетических свойств.

Исходная последовательность используемого для модификации rhFGF-1
15 представлена далее:

**MAEGEITTFALTEKFNLP GNYKKPKLLYCSNGGHFLRILPDGTVDGTRDRSDQHILQLLSAESVGE
VYIKSTETGQYLAMDTDGLLYGSQTPNEECLFLERLEENHYNTYISKKHAEKNWVGLKKNNGSCKRGP
RTHYGQKAILFLPLPVSSD**

20

(Аминокислоты, которые были опущены при синтезе FGF1^{ΔNT2}, выделены жирным шрифтом).

Окончательная последовательность используемого человеческого FGF-1, усеченного на 28 АК (FGF-1^{ΔNT2}; L29 - D155), полученная Suh et al:

25

MLYCSNGGHFLRILPDGTVDGTRDRSDQHILQLLSAESVGEVYIKSTETGQYLAMDTDGLLYGSQTPN
EECLFLEREENHYNTYISKKHAEKNWVGLKKNNGSCKRGPRTHYGQKAILFLPLPVSSD

В Таблице 2 ниже представлено обобщение наиболее существенных признаков
30 нативного белка FGF-1; однако вследствие природных свойств этого белка его терапевтическое применение в этой форме (в неизменном виде) невозможно.

Преимущества	Комментарии	Недостатки
<p>Длительный эффект</p>	<p>Согласно литературным данным, эффект более низкой концентрации глюкозы в крови после введения FGF-1 сохраняется в течение как минимум последующих 24 часов. Большинство лекарственных средств, доступных в настоящее время на рынке, нужно принимать по меньшей мере два раза в день. Такое длительное действие FGF-1 позволяет уменьшить количество раз, которое необходимо принимать указанное лекарственное средство, что приводит к лучшему комфорту жизни пациента.</p>	<p>Митогенные свойства белка, которые могут вызывать неоплазию в долгосрочной перспективе.</p>
<p>Предпочтительный для организма механизм действия</p>	<p>Действие лекарственного средства направлено на сенсбилизацию клеток к действию инсулина. Это означает, что при введении лекарственного средства инсулин, который эндогенно секретируется β-клетками</p>	<p>Нестабильность белка и короткое время полужизни <i>in vivo</i></p>

Преимущества	Комментарии	Недостатки
	<p>поджелудочной железы, будет более эффективно использоваться организмом. Если организм способен использовать свои собственные запасы инсулина, то не будет необходимости использовать препараты инсулина (экзогенный инсулин), или необходимость использования экзогенного инсулина возникнет позже и/или потребуются меньшие дозы инсулина.</p>	
<p>Нет риска развития гипогликемии</p>	<p>Все данные экспериментов и литературы однозначно доказывают, что FGF-1 не вызывает гипогликемии, что повышает безопасность терапии.</p>	

Таблица 2. Преимущества, возникающие в результате использования FGF-1 в качестве потенциального терапевтического средства, и особенности, препятствующие использованию его нативной формы при лечении диабета 2 типа.

- 5 Исследования Suh et al. были одними из первых, в которых искали модификации для терапевтического применения мутированного лиганда FGF-1. В настоящее время известны и описаны в литературе несколько стратегий, направленных на снижение митогенного потенциала при сохранении положительного биологического эффекта в отношении контроля метаболического гомеостаза. Эти стратегии охватывают

целенаправленное внесение изменений в последовательности аминокислот белка FGF-1 в различных областях:

1. Удаление первых 24 АК (с N-конца) полноразмерного белка hFGF-1 и, таким образом, укорачивание (усечение) цепи со 155 АК до 131 АК. Этот способ отделения проинводиабетического потенциала от митогенного потенциала был использован Suh et al и был описан в их исследовании (Suh et al., 2014).
2. Получение частичного агониста FGFR, характеризующегося мутацией в сайте связывания гепарансульфата. FGF-1 требуется гепарансульфат для связывания с рецептором, димеризации и активации клеточного пути. Только стабильный комплекс FGF-1:FGFR запускает митогенный ответ. Huang et al. разработали мутантный белок FGF-1 с тремя локальными мутациями в сайте связывания гепарана (Huang, Z., Tan, Y., Gu, J., Liu, Y., Song, L., Niu, J., Zhao, L., Srinivasan, L., Lin, Q., Deng, J., Li, Y., Conklin, D. J., Neubert, T. A., Cai, L., Li, X., & Mohammadi, M. (2017). Uncoupling the Mitogenic and Metabolic Functions of FGF1 by Tuning FGF1-FGF Receptor Dimer Stability. *Cell Reports*, 20(7), 1717–1728. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.06.063>). Таким образом, эффективность образования комплекса FGF-1:FGFR:HS (гепарансульфат) была снижена, и митогенный ответ клеток был значительно снижен в исследуемых условиях. Указанный мутант известен в литературе как FGF-1^{ΔHBS}, и он содержит мутации в положениях 127, 128, 133 полипептидной цепи (Huang et al., 2017).
3. Снижение аффинности к киназе CK2. После экзогенного введения FGF-1 он связывается с FGFR. Образование комплекса FGF-1:FGFR1 приводит к димеризации рецепторов и, следовательно, фосфорилированию внутриклеточных доменов рецептора. Комплекс также интернализируется, и FGF-1 транслоцируется в ядро, где он стимулирует синтез ДНК. Благодаря плейотропии биологических эффектов, вызванных лигандом FGF-1, был идентифицирован ряд цитозольных и ядерных белков, которые отвечали за непосредственное взаимодействие с лигандом. Один из них представляет собой плейотропную, конститутивно активную киназу CK2, состоящую из двух субъединиц α и двух субъединиц β. Данные из литературы указывают на то, что обе субъединицы взаимодействуют с FGF-1. Исследование Skjerpen et al. демонстрирует корреляцию между аффинностью к CK2 ряда различных мутантов FGF-1 и их митогенным потенциалом (Skjerpen, C. S., Nilsen, T., Wesche, J., &

Olsnes, S. (2002). Binding of FGF-1 variants to protein kinase CK2 correlates with mitogenicity. *The EMBO Journal*, 21(15), 4058–4069. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf402>). Было обнаружено, что мутации, включающие замену встречающейся в природе аминокислоты лизина (L) на нейтральную или отрицательно заряженную аминокислоту, приводят к снижению или отсутствию связывания белка с СК2. Среди протестированных вариантов были белки с заменами лизина и серина (S) (K133R, K133A, K133E, S114A, S131E, S131E/K133E, нумерация замен приведена относительно полноразмерной цепи из 155 АК). Мутации S131A, S131A/K133A характеризовались более низким митогенным потенциалом по сравнению с мутациями дикого типа. Для мутации K133E не продемонстрировали митогенного потенциала (Skjerpen et al., 2002). Эти результаты согласуются с данными, полученными в других исследованиях (мутация K133E также присутствует в качестве одной из трех мутаций в варианте FGF-1^{ΔHBS}).

Другой проблемой, связанной с применением нативного человеческого FGF-1, является его плохая стабильность и короткое биологическое время полужизни (Culajay, J. F., Blaber, S. I., Khurana, A., & Blaber, M. (2000). Thermodynamic characterization of mutants of human fibroblast growth factor 1 with an increased physiological half-life. *Biochemistry*, 39(24), 7153–7158. <https://doi.org/10.1021/bi9927742>). Плохая стабильность является существенным ограничивающим фактором при фармакологическом применении белков, поскольку она препятствует процессу составления или хранения и использования биологических лекарственных средств. (Wang, W. (1999). Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. In *International Journal of Pharmaceutics* (Vol. 185, Issue 2). [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(99\)00152-0](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(99)00152-0)). Кроме того, белки в живых организмах подвергаются воздействию различных факторов, таких как неоптимальная температура, pH, свободные радикалы кислорода или действие протеаз. Эти факторы могут приводить к разворачиванию, агрегации или протеолитической деградации белка. В условиях физиологического pH и температуры около 50% белка разворачивается, поскольку температура денатурации FGF-1 составляет около 40 °С. Таким образом, повышение термической стабильности белка будет оказывать непосредственное влияние на его биологическую и

противодиабетическую активность. Повышение термической стабильности белка может быть достигнуто путем введения точечных мутаций в полипептидную цепь белка. Culajay et al. доказали, что одна мутация H108G в усеченном рекомбинантном белке rhFGF-1 человека повышала температуру его денатурации примерно на 8 °C и, таким образом, повышала его стабильность (Таблица 3 ниже) Culajay et al., 2000).

Также были идентифицированы еще две точечные мутации, повышающие термическую стабильность человеческого FGF-1 (Q55P и S62I). Они повышали температуру денатурации на 8,1 и 9,3 °C, соответственно, относительно таковой у нативного белка (Zakrzewska, Malgorzata, Krowarsch, D., Wiedlocha, A., Olsnes, S., & Otlewski, J. (2005). Highly Stable Mutants of Human Fibroblast Growth Factor-1 Exhibit Prolonged Biological Action. *Journal of Molecular Biology*, 352(4), 860–875. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.07.066>). Та же группа получила последующие варианты, содержащие множество замен, включая: Q55P/S62I и Q55P/S62I/H108G. Полученные результаты свидетельствуют о том, что среди всех изученных мутаций именно тройная замена оказалась наиболее стабилизирующей белок, повышающей температуру денатурации и препятствующей протеолизу. (Таблица 3 ниже). Тройная мутация также продлевала время полужизни белка почти на 10 часов (для сравнения, время полужизни нативного белка FGF1 составляет около 1,5 часов). Следует отметить, что данные, касающиеся периодов полужизни белков, относятся к препаратам без добавления гепарина (гепарин предотвращает термическую и протеолитическую инактивацию белка FGF-1 дикого типа)(Malgorzata Zakrzewska et al., 2005). Анализы показали, что обработка мутанта Q55P/S62I/H108G трипсином (протеазой) при 37°C в течение одного часа не приводила к фрагментации белка. В случае рекомбинантного белка FGF1 дикого типа мутант был почти полностью деградирован протеазой. Полученные результаты доказывают высокую протеолитическую стабильность белка с заменой трех аминокислот (Malgorzata Zakrzewska et al., 2005).

Мутант	Температура денатурации $T_{ден}$ [°C]
--------	--

FGF-1 (дикий)	40,3
Q55P	48,1
S62I	49,3
H108G	48,0
Q55P/S62I	55,5
Q55P/S62I/H108G	61,8

Таблица 3. Укороченный перечень температур денатурации отдельных мутеинов белка FGF-1, определенных с использованием кругового дихроизма (Malgorzata Zakrzewska et al., 2005).

- 5 Таким образом, в современной литературе определен ряд различных направлений модификации первичной структуры белка FGF-1 с целью снижения его митогенного потенциала, поддержания или повышения его биологической активности для поддержания гомеостаза клеточного метаболизма или улучшения его физико-химических и, следовательно, фармакологических свойств. Однако проведенные до
- 10 настоящего момента исследования не позволили разработать мутеин, демонстрирующий фармакологические свойства и высокую эффективность, ожидаемые от терапевтической молекулы. Следовательно, по-прежнему существует острая потребность в разработке мутеинов FGF-1, которые были бы оптимальными с точки зрения фармакотерапии (т.е. которые характеризовались бы высокой
- 15 термической стабильностью, устойчивостью к протеолитической деградации и, как следствие, более длительным временем полужизни в организме), которые не проявляют митогенный потенциал и которые, с одной стороны, демонстрируют высокий терапевтический эффект, особенно в случае СД2 (измеряемый по эффективному снижению и стабилизации уровня глюкозы в крови), и в то же время
- 20 не несут риска гипогликемии.

Цель изобретения

Задачей настоящего изобретения является предоставление мутеинов FGF-1 человека и конструкций с ними, таких как димеры, которые не имеют недостатков, известных из уровня техники. Более конкретно, задачей настоящего изобретения является

предоставление мутеинов FGF-1 человека, которые не проявляют митогенный потенциал. Кроме того, задачей настоящего изобретения является предоставление мутеинов FGF-1 человека, характеризующихся высокой термической стабильностью, устойчивостью к протеолитической деградаци и, следовательно, более длительным
5 временем полужизни после введения в организм. Задачей изобретения также является предоставление мутеинов FGF-1 человека, обладающих снижающим уровень глюкозы в крови действием, без риска возникновения гипогликемии, которые характеризуются физическими, химическими и фармакологическими свойствами, которые делают их пригодными для применения при терапии, в
10 частности, при лечении сахарного диабета 2 типа.

Указанные задачи реализуются изобретениями, определенными в прилагаемой формуле изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В соответствии с настоящим изобретением и описанием разработаны мутеины белка
15 FGF-1 человека и их димеры, которые содержат точечные мутации, снижающие митогенный потенциал белков FGF-1 человека. В соответствии с настоящим изобретением и описанием также были разработаны мутеины белка FGF-1 человека и их димеры, предпочтительно содержащие дополнительные точечные мутации, которые повышают стабильность мутеинов FGF-1 человека путем повышения
20 температуры их денатурации, а также мутации, благодаря которым достигается более длительное время полужизни в кровотоке после введения субъекту вследствие повышенной устойчивости к протеолизу. Такие свойства обеспечивают эффективный процесс производства в больших масштабах и, следовательно, фармакологическую разработку в качестве потенциального терапевтического средства и предотвращают
25 быстрое разрушение белка в организме, что обеспечивает высокий терапевтический эффект. Разработанные в соответствии с настоящим изобретением мутеины FGF-1 человека, содержащие комбинации точечных мутаций, являются уникальными, до сих пор неизвестными из литературы, и обеспечивают неочевидные технические эффекты, позволяющие их эффективное терапевтическое действие, особенно для
30 применения при лечении диабета, включая диабет 2 типа.

В настоящем изобретении предложен мутеин фактора роста фибробластов 1 (FGF-1) человека с пониженной митогенностью, характеризующийся тем, что он содержит точечную мутацию в положении аминокислоты S153, нумерация положений аминокислот основана на последовательности полноразмерного белка FGF-1 дикого типа, представленного в Последовательности № 1.

5 Предпочтительно точечная мутация в положении S153 представляет собой мутацию S153A (мутеин, имеющий Последовательность № 32 (SEQ. 32)) или мутацию S153R (мутеин, имеющий Последовательность № 31 (SEQ. 31)).

Более предпочтительно, такой мутеин FGF-1 человека в соответствии с настоящим изобретением дополнительно содержит точечную мутацию S154.

10 Более предпочтительно, в таком мутеине FGF-1 в соответствии с настоящим изобретением точечная мутация в положении S154 представляет собой мутацию S154D, и точечная мутация в положении S153 представляет собой точечную мутацию S153D (такой мутеин представлен в Последовательности № 27).

15 Предпочтительно, такой мутеин FGF-1 человека в соответствии с настоящим изобретением дополнительно содержит по меньшей мере одну стабилизирующую мутацию в положении аминокислоты, выбранном из: Q55, S62 и H108.

Более предпочтительно, такая по меньшей мере одна стабилизирующая мутация в положении аминокислоты Q55, S62 или H108 представляет собой точечную мутацию, выбранную из: Q55P, S62I и H108G, соответственно.

20 Предпочтительно, такой мутеин FGF-1 в соответствии с настоящим изобретением содержит три стабилизирующие мутации: Q55P, S62I и H108G.

Наиболее предпочтительно, такой мутеин FGF-1 в соответствии с настоящим изобретением имеет последовательность аминокислот, представленную в Последовательности № 23, Последовательности № 25 или Последовательности № 29.

25 Предпочтительно такой мутеин FGF-1 в соответствии с настоящим изобретением дополнительно содержит N-концевую делецию по меньшей мере 19 последовательных аминокислот полноразмерного белка FGF-1, более предпочтительно N-концевую делецию аминокислот E3 - G21 полноразмерного белка

30 FGF-1.

Предпочтительно такой мутеин FGF-1 в соответствии с настоящим изобретением содержит: точечную мутацию S153A, точечную мутацию S153R или комбинацию точечных мутаций S153D и S154D и N-концевой делеции аминокислот E3 - G21 полноразмерного белка FGF-1.

- 5 Более предпочтительно, такой мутеин в соответствии с настоящим изобретением имеет последовательность аминокислот, представленную в Последовательности № 24, Последовательности № 26, Последовательности № 30, Последовательности № 33 или Последовательности № 34.

10 В соответствии с настоящим изобретением также предложен димер мутеинов фактора роста фибробластов 1 (FGF-1) человека с пониженной митогенностью, содержащий мутацию в положении S153, как описано выше. Предпочтительно, такой димер представляет собой гомодимер.

15 Предпочтительно мутеины, образующие такой димер, соединены линкером, более предпочтительно линкером из аминокислот, в частности линкером, который представляет собой последовательность аминокислот GGGGSGGGGSGGGG.

Предпочтительно такой димер в соответствии с настоящим изобретением имеет последовательность аминокислот, выбранную из Последовательностей №№ 35 - 38 (SEQ. 35 - SEQ. 38).

20 В соответствии с настоящим изобретением дополнительно предложен мутеин фактора роста фибробластов 1 (FGF-1) человека с пониженной митогенностью, содержащий мутацию в положении S153 и необязательно в положении S154, как описано выше, для применения в снижении уровня глюкозы в крови.

25 В соответствии с настоящим изобретением дополнительно предложен мутеин фактора роста фибробластов 1 (FGF-1) человека с пониженной митогенностью, содержащий мутацию в положении S153 и необязательно в положении S154, как описано выше, для применения при лечении диабета, в частности диабета 2 типа.

Предпочтительно, такой мутеин FGF-1 человека в соответствии с настоящим изобретением имеет последовательность аминокислот, выбранную из Последовательностей №№ 23 - 30.

30 В настоящем документе также описан мутеин FGF-1 человека с пониженной митогенностью, характеризующийся тем, что он содержит две точечные мутации: в

положении аминокислоты S114 и в положении аминокислоты L150, нумерация положений аминокислот основана на полноразмерной последовательности белка FGF-1 дикого типа, представленной в Последовательности № 1 (SEQ. 1).

Такая точечная мутация в положении S114 представляет собой мутацию S114A (мутеин, имеющий Последовательность № 3 (SEQ. 3)). Такая точечная мутация в 5 положении L150 представляет собой мутацию L150D (мутеин, имеющий Последовательность № 4 (SEQ. 4)).

Такой мутеин FGF-1 в соответствии с настоящим изобретением может содержать как точечную мутацию S114A, так и точечную мутацию L150D (мутеин, имеющий 10 Последовательность № 5 (SEQ. 5)).

Кроме того, такой мутеин FGF-1 в соответствии с настоящим изобретением дополнительно содержит по меньшей мере одну стабилизирующую мутацию в положении аминокислоты, выбранном из: Q55, S62 и H108.

Такая по меньшей мере одна стабилизирующая мутация в положении аминокислоты 15 Q55, S62 или H108 представляет собой точечную мутацию, выбранную из: Q55P, S62I и H108G; и, в частности, такой мутеин FGF-1 в соответствии с настоящим изобретением содержит три стабилизирующие мутации: Q55P, S62I и H108G.

В частности, такой мутеин FGF-1 в соответствии с настоящим изобретением имеет последовательность аминокислот, представленную в Последовательности № 10 (SEQ. 20 10).

Кроме того, такой мутеин FGF-1 в соответствии с настоящим изобретением содержит N-концевую делецию по меньшей мере 19 последовательных аминокислот полноразмерного белка FGF-1, в частности, N-концевую делецию аминокислот E3 - G21 полноразмерного белка FGF-1.

25 Необязательно такой мутеин FGF-1 в соответствии с настоящим изобретением содержит точечную мутацию S114A, точечную мутацию L150D и N-концевую делецию аминокислот E3 - G21 полноразмерного белка FGF-1, и, в частности, такой белок FGF-1 в соответствии с настоящим изобретением имеет последовательность аминокислот, представленную в Последовательности № 18 (SEQ. 18).

В настоящем документе также описан димер мутированного белка FGF-1 с пониженной митогенностью в соответствии с настоящим изобретением, как описано выше, включая гомодимер.

5 Мутеины, образующие димер в соответствии с настоящим изобретением, соединены линкером, в особенности линкером из аминокислот, и такой линкер представляет собой, в частности, последовательность аминокислот GGGGSGGGGSGGGG.

Такой димер в соответствии с настоящим изобретением имеет последовательность аминокислот, представленную в Последовательности № 21 или 22 (SEQ. 21 или SEQ. 22).

10 В настоящем документе также описан мутеин FGF-1 человека с пониженной митогенностью в соответствии с настоящим изобретением, как описано выше, для применения в снижении уровня глюкозы в крови.

В настоящем документе также описан мутеин FGF-1 человека с пониженной митогенностью в соответствии с настоящим изобретением, как описано выше, для применения в лечении диабета, в частности диабета 2 типа.

Такой мутеин FGF-1 для применения в соответствии с настоящим изобретением, например, имеет последовательность аминокислот, представленную в Последовательности № 10 (SEQ. 10) или в Последовательности № 18 (SEQ. 18).

20 В настоящем документе также описан димер мутеинов FGF-1 человека с пониженной митогенностью в соответствии с настоящим изобретением, как описано выше, для применения в снижении уровня глюкозы в крови.

В настоящем документе также описан димер мутеинов FGF-1 человека с пониженной митогенностью в соответствии с настоящим изобретением, как описано выше, для применения в лечении диабета, в частности диабета 2 типа.

25 Такой димер для применения в соответствии с настоящим изобретением, например, имеет последовательность аминокислот, представленную в Последовательности № 21 (SEQ. 21) или в Последовательности № 22 (SEQ. 22).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

30 В настоящем документе описан мутированный белок (мутеин) фактора роста фибробластов 1 (FGF-1) человека с пониженной митогенностью по сравнению с FGF-1 дикого типа. Такой мутированный белок FGF-1 человека в настоящей заявке

взаимозаменяемо называют мутеином FGF-1 человека или мутантом FGF-1 человека. Способы введения точечных мутаций в последовательности белков и тесты на митогенность белковых агентов известны в данной области техники, и предпочтительные примеры таких способов и тестов, подходящих для осуществления настоящего изобретения, представлены ниже. Такой описанный в настоящем документе мутеин FGF-1 человека содержит по меньшей мере две точечные мутации, а именно мутацию встречающейся в природе аминокислоты S в положении 114 полноразмерного белка (155 АК) и мутацию встречающейся в природе аминокислоты L в положении 150 полноразмерного белка FGF-1, как представлено в Последовательности 1.

Точечные мутации в положениях S114 и L150 полноразмерного человеческого белка FGF-1 дикого типа вызывают снижение митогенности мутеина FGF-1.

Предпочтительно, такой мутеин FGF-1 содержит мутацию S114A:



Приведенная выше запись точечной мутации представляет собой стандартный способ обозначения точечных мутаций в белках, и в этом случае она обозначает точечную мутацию, которая заключается в замене аминокислоты – серина, - встречающейся в природе в полипептидной цепи человеческого белка FGF-1 дикого типа в положении 114, на другую аминокислоту – аланин (A).

Мутация S114A снижает аффинность мутированного белка к киназе CK2 и приводит к снижению митогенности клеток по сравнению с полноразмерным человеческим белком FGF-1 дикого типа, как указано в примерах ниже и представлено на фигурах (например, фиг. 2).

Предпочтительно вариант полноразмерного мутеина FGF-1 содержит мутацию L150D.

Мутация L150D уменьшает связывание мутированного белка FGF-1 с рецептором

FGFR1. Эта мутация расположена в домене, ответственном за аффинность к рецептору, но она не имеет решающего значения для этого связывания. На фиг. 3 показано снижение связывания с рецептором FGFR1 мутеина FGF-1 человека, содержащего мутацию L150D. Такой белок характеризуется сниженной

5 митогенностью, как показано ниже и представлено на фигурах (например, на фиг. 3). Более предпочтительно, такой мутеин FGF-1 содержит как мутацию S114A, так и мутацию L150D. Такие белки FGF-1 характеризуются оптимальным снижением митогенности, как указано ниже и представлено на фигурах (например, на фиг. 4).

Таким образом, предпочтительно в соответствии с настоящим изобретением

10 предложен мутеин FGF-1 человека с пониженной митогенностью, как описано выше, который дополнительно содержит по меньшей мере одну стабилизирующую точечную мутацию в положении аминокислоты: Q55, S62 и H108 (в соответствии с нумерацией положений аминокислот полноразмерного человеческого белка дикого типа – идентификационный номер последовательности 1); более предпочтительно,

15 мутации выбраны из: Q55P, S62I и H108G. Еще более предпочтительно, мутеин FGF-1 в соответствии с настоящим изобретением содержит дополнительные мутации во всех трех положениях. Способы определения стабильности белков FGF-1 известны в данной области техники, и типичный способ определения их стабильности представлен ниже и в таблице 3.

20 Такие мутеины FGF-1 характеризуются как пониженной митогенностью, так и повышенной стабильностью, устойчивостью к протеолизу, более длительным временем полужизни после введения, и они эффективно снижают уровень глюкозы в крови без одновременной индукции гипогликемии; таким образом, они оказывают оптимальное противодиабетическое действие.

25 Более предпочтительно, такие мутеины FGF-1 дополнительно содержат делецию по меньшей мере 19 аминокислот с N-конца белка, в частности делецию аминокислот E3 - G21 (с N-конца), которая дополнительно снижает митогенность.

Последовательность аминокислот полипептидной цепи белка FGF1 с усеченным N-концом, в варианте без мутаций, на основе которой были осуществлены замены

30 аминокислот в усеченном варианте (белки/варианты, описанные как «короткие» – усеченная (укороченная) последовательность, то есть с делецией по меньшей мере

19 аминокислот с N-конца), имеет общую длину цепи 136 АК. В Последовательности № 2 (SEQ. 2) по сравнению с полноразмерным белком FGF-1 дикого типа отсутствуют аминокислоты E3 - G21 (т.е. аминокислоты EGEITTFALTEKFNLPFG). В соответствии с настоящим изобретением и описанием усеченный вариант белка FGF-1 человека также называют коротким вариантом белка FGF-1 человека, который предпочтительно состоит из 136 АК, тогда как полноразмерный вариант белка FGF-1 человека также называют длинным вариантом белка FGF-1 человека, который состоит из 155 АК и не содержит делеции аминокислот E3 - G21.

Для оценки фармакологически предпочтительных параметров такого мутеина человеческого FGF-1, не считая сниженную митогенность (то есть достижение большей термической стабильности и более длительного времени полужизни в присутствии гепарина), тройную стабилизирующую мутацию также тестировали в анализе *in vivo*. Как оказалось, такие мутеины FGF-1 человека, содержащие указанные в настоящем документе 5 точечных мутаций, также оказывают противодиабетическое действие. Благодаря описанным выше свойствам мутеинов FGF1, описанных в настоящем документе, их можно эффективно использовать в медицине, в частности для снижения уровня глюкозы в крови, особенно при лечении диабета, включая диабет 2 типа.

В настоящем документе также описан димер любого из описанных выше мутеинов FGF-1 человека с пониженной митогенностью. Способы получения димеров белков известны в данной области техники, и предпочтительный способ получения димеров мутеинов, описанных в настоящем документе, описан ниже. Предпочтительно, описанный в настоящем документе димер представляет собой гомодимер любых из описанных выше мутеинов FGF-1 человека с пониженной митогенностью, более предпочтительно соединенных линкером, в частности линкером из аминокислот. Это позволяет добиться физической и химической стабилизации, облегчающей димеризацию лиганда. Димер лиганда легче вызывает димеризацию клеточных рецепторов. Кроме того, это позволяет увеличить массу белка, поскольку белки с массами свыше 30 - 40 кДа не быстро выводятся из организма через почки и имеют более длительное время полужизни. Еще более предпочтительно, такой линкер представляет собой последовательность аминокислот GGGGSGGGGSGGGG. Особенно

предпочтительные варианты димеров мутеинов FGF-1 человека, описанные в настоящем документе, имеют последовательности аминокислот, представленные в Последовательностях №№ 21 и 22 (SEQ. 21 и SEQ. 22).

5 Свойства описанных выше мутеинов FGF-1 человека, описанных в настоящем документе, позволяют применять их в медицине, в частности для снижения уровня глюкозы в крови и, в частности для лечения диабета, как показано ниже.

Мутеины FGF-1 человека, описанные в настоящем документе, и их димеры не обладают нежелательными свойствами, известными из уровня техники, и поэтому их можно применять в качестве лекарственных средств в медицине, фармацевтике и в
10 терапии. Они характеризуются пониженной митогенностью и предпочтительно повышенной термической стабильностью и повышенной устойчивостью к протеолизу, а также подходящими фармакологическими свойствами. Кроме того, они предпочтительно характеризуются действием, снижающим уровень глюкозы в крови, без риска развития гипогликемии, и, следовательно, их можно применять, в
15 частности, для снижения уровня глюкозы, особенно при лечении диабета, в частности, диабета 2 типа.

В соответствии с настоящим изобретением предложен мутеин фактора роста фибробластов 1 (FGF-1) человека с пониженной митогенностью, который содержит точечную мутацию в положении аминокислоты S153, причем нумерация положений
20 аминокислот основана на полноразмерной последовательности белка FGF-1 дикого типа, представленной в Последовательности № 1. Предпочтительно, такой мутеин FGF-1 человека в соответствии с описанным в настоящем документе аспектом настоящего изобретения содержит точечную мутацию, выбранную из: мутации S153A (мутеин, имеющий Последовательность № 32 (SEQ. 32)) и мутации S153R (мутеин,
25 имеющий Последовательность № 31 (SEQ. 31)).

Более предпочтительно, такой мутеин FGF-1 человека в соответствии с настоящим изобретением дополнительно содержит точечную мутацию в положении аминокислоты S154. Еще более предпочтительно, такая мутация представляет собой мутацию S154D, и при этом точечная мутация в положении S153 представляет собой
30 мутацию S153D (такой мутеин показан в Последовательности № 27 (SEQ. 27)). Указанные выше мутации в положениях S153 и S154 расположены в домене,

отвечающем за аффинность лиганда к рецептору. Мутеины FGF-1 человека в соответствии с описанным в настоящем документе аспектом настоящего изобретения характеризуются пониженной митогенностью и эффективным снижением уровня глюкозы в крови, и следовательно, их можно применять для снижения уровня глюкозы в крови, в частности при лечении диабета, включая диабет 2 типа.

Предпочтительно, такой мутеин FGF-1 человека в соответствии с настоящим изобретением дополнительно содержит по меньшей мере одну стабилизирующую мутацию в положении аминокислоты, выбранном из: Q55P, S62I и H108G, в частности три такие стабилизирующие мутации (Q55P, S62I и H108G). Наиболее предпочтительно, такой мутеин FGF-1 в соответствии с описанным в настоящем документе аспектом настоящего изобретения имеет последовательность аминокислот, представленную в Последовательности № 23 (SEQ. 23), Последовательности № 25 (SEQ. 25) или Последовательности № 29 (SEQ. 29). Такие варианты характеризуются оптимальным снижением митогенности, оптимальной термической стабильностью и проявляют активность снижения уровня глюкозы, и, следовательно, они оказывают противодиабетическое действие. Еще более предпочтительно, такие мутеины в соответствии с настоящим изобретением могут также содержать N-концевую делецию по меньшей мере 19 аминокислот полноразмерного белка человека (короткий вариант), в частности аминокислот E3 - G21 полноразмерного белка FGF-1 человека. Способы определения стабильности белков FGF-1 известны в данной области техники, и типичный способ определения их стабильности представлен ниже.

В соответствии с настоящим изобретением дополнительно предложен димер мутеинов фактора роста фибробластов (FGF-1) человека с пониженной митогенностью, содержащий мутацию в положении S153 и необязательно S154, как описано выше. Димеры мутеинов FGF-1 человека в соответствии с этим аспектом настоящего изобретения получают способом, аналогичным способу получения димеров мутеинов в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения. Предпочтительно такой димер представляет собой гомодимер любых из описанных выше мутеинов FGF-1 человека с пониженной митогенностью в соответствии с описанным в настоящем документе аспектом настоящего изобретения, более

предпочтительно соединенных линкером, в частности линкером из аминокислот, который наиболее предпочтительно представляет собой последовательность аминокислот GGGGSGGGGSGGGG. Это позволяет добиться физической и химической стабилизации, облегчающей димеризацию лиганда. Такой димер легче вызывает димеризацию клеточных рецепторов. Кроме того, образование димерной формы позволяет увеличить массу белка, что желательно, поскольку белки с массами свыше 30 - 40 кДа не быстро выводятся из организма через почки и имеют более длительное время полужизни. Особенно предпочтительные варианты димеров мутеинов FGF-1 человека в соответствии с этим аспектом настоящего изобретения имеют последовательности аминокислот, выбранные из последовательностей, представленных в Последовательностях №№ 35 - 38.

Мутеины в соответствии с описанным в настоящем документе аспектом настоящего изобретения обладают свойствами, которые делают их подходящими для применения в снижении уровня глюкозы в крови, в частности для лечения диабета, в частности диабета 2 типа.

Настоящее изобретение далее будет проиллюстрировано на следующих фигурах и в примерах, которые, однако, никоим образом не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения, определяемого формулой изобретения. Если не указано иное, все способы, реагенты и параметры являются такими же, как те, которые обычно используются в области, к которой относится настоящее изобретение, и которые рекомендованы производителями.

ОПИСАНИЕ ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Все последовательности аминокислот, включенные в формулу изобретения и в настоящее описание, основаны на последовательности кДНК FGF1_ДТ, варианта дикого типа, номер доступа в GenBank NM 001354952.2, кодирующей фактор роста фибробластов 1 (FGF-1) человека, имеющей общую длину 155 аминокислот.

Последовательность № 1 (SEQ. 1)

На основе указанной выше последовательности был получен полноразмерный вариант FGF1 (1 - 155 АК), названный в настоящем документе FGF1 (155 АК).

```
Sequence No. 1 (SEK1)      MAEGEITFT ALTEKFNLP  GNYKKPKLLY CSNGGHFLRI LPDGTVDGTR DRSDQHIQLQ
                             10          20          30          40          50          60
FGF1 (1-155aa)           LSAESVGEVY IKSTETGQYL AMDTDGLLYG SQTPNEECLF LERLEENHYN TYISKKHAEK
                             70          80          90         100         110         120
FGF1 (155aa)             NWFVGLKKN  SCKRGPRTHY GQKAILFLPL PVSSD
FGF_WT
```

Последовательность № 2 (SEQ. 2)

- 5 На основе указанной выше последовательности был получен усеченный вариант FGF1 (22 - 155 АК), названный в настоящем документе FGF1 (Δ 155 АК). Белок получали путем делеции фрагмента N'-конца. В последовательности жирным шрифтом выделены первые 2 аминокислоты, присутствие которых является результатом
- 10 способа клонирования усеченной последовательности FGF1 (АК 22 - 155) в вектор экспрессии. Метионин (М) кодируется иницирующим кодоном AUG, с которого начинается процесс экспрессии белка и присутствие которого требуется на N'-конце. Аланин (А) был добавлен к последовательности в результате добавления двух нуклеотидов к последовательности, фланкирующей сайт рестрикции, чтобы
- 15 сохранить необходимую рамку считывания в процессе транскрипции. Добавление аланина не вызывает каких-либо физических и химических изменений в белке благодаря его неполярной и алифатической природе.

```
Sequence No. 2 (SEK2)      MA----- -NYKKPKLLY CSNGGHFLRI LPDGTVDGTR DRSDQHIQLQ
FGF1 (22-155aa)           LSAESVGEVY IKSTETGQYL AMDTDGLLYG SQTPNEECLF LERLEENHYN TYISKKHAEK
FGF1 ( $\Delta$ 155aa)             NWFVGLKKN  SCKRGPRTHY GQKAILFLPL PVSSD
FGF_ $\Delta$ WT
```

Последовательность № 3 (SEQ. 3)

- Мутантная полноразмерная последовательность FGF1 (1 - 155 АК), где в положении
- 20 114 серин (S) был заменен на аланин (А). Точечная мутация FGF1 (155 АК; S114A).
Порядковый номер мутации: M1.

```
Sequence No. 3 (SEK3)      MAEGEITFT ALTEKFNLP  GNYKKPKLLY CSNGGHFLRI LPDGTVDGTR DRSDQHIQLQ
FGF1 (1-155aa)           LSAESVGEVY IKSTETGQYL AMDTDGLLYG SQTPNEECLF LERLEENHYN TYIAKKHAEK
FGF1 (155aa;S114A)       NWFVGLKKN  SCKRGPRTHY GQKAILFLPL PVSSD
M1
```

Последовательность № 4 (SEQ. 4)

Мутантная полноразмерная последовательность FGF1 (1 - 155 АК), где в положении 150 лейцин (L) был заменен на аспарагиновую кислоту (D). Точечная мутация FGF1 (155 АК; L150D). Порядковый номер мутации: M2.

5

```
Sequence No. 4 (SEK4)      MAEGEITTFI ALTEKFNLPP GNYKKPKLLY CSNGGHFLRI LPDGTVDGTR DRSDQHIQLQ
FGF1 (1-155aa)           LSAESVGEVY IKSTETGQYL AMDTDGLLYG SQTPNEECLF LERLEENHYN TYISKKHAEK
FGF1 (155aa; L150D)     NWFVGLKKNQ SCKRQPRTHY GQKAILFLP[D] PVSSD
M2
```

Последовательность № 5 (SEQ. 5)

10 Мутантная полноразмерная последовательность FGF1 (1 - 155 АК), где в положении 114 серин (S) был заменен на аланин (A) - S114A, и в положении 150 лейцин (L) был заменен на аспарагиновую кислоту (D) - L150D. Двойная мутация FGF1 (155 АК; S114A/L150D). Порядковый номер мутации: M3.

```
Sequence No. 5 (SEK5)      MAEGEITTFI ALTEKFNLPP GNYKKPKLLY CSNGGHFLRI LPDGTVDGTR DRSDQHIQLQ
FGF1 (1-155aa)           LSAESVGEVY IKSTETGQYL AMDTDGLLYG SQTPNEECLF LERLEENHYN TYI[A]KKHAEK
FGF1 (155aa; S114A/L150D) NWFVGLKKNQ SCKRQPRTHY GQKAILFLP[D] PVSSD
M3
```

Последовательность № 6 (SEQ. 6)

15 Мутантная полноразмерная последовательность FGF1 (1 - 155 АК), где в положении 55 глутамин (Q) был заменен на пролин (P). Точечная мутация FGF1 (155 АК; Q55P). Порядковый номер мутации: M4.

```
Sequence No. 6 (SEK6)      MAEGEITTFI ALTEKFNLPP GNYKKPKLLY CSNGGHFLRI LPDGTVDGTR DRSD[Q]HIQLQ
FGF1 (1-155aa)           LSAESVGEVY IKSTETGQYL AMDTDGLLYG SQTPNEECLF LERLEENHYN TYISKKHAEK
FGF1 (155aa; Q55P)       NWFVGLKKNQ SCKRQPRTHY GQKAILFLPL PVSSD
M4
```

Последовательность № 7 (SEQ. 7)

20 Мутантная полноразмерная последовательность FGF1 (1 - 155 АК), где в положении 62 серин (S) был заменен на изолейцин (I). Точечная мутация FGF1 (155 АК; S62I). Порядковый номер мутации: M5.

Sequence No. 7 (SEK7) MAEGEITTFE ALTEKFNLP GNYKKPKLLY CSNGGHFLRI LPDGTVDGTR DRSDQHILQ
FGF1 (1-155aa) LIAESVGEVY IKSTETGQYL AMDTDGLLYG SQTPNEECLF LERLEENHYN TYISKKHAEK
FGF1 (155aa; S62I) NWFVGLKKN GCKRGPRTHY GQKAILFLPL PVSSD
M5

5 Последовательность № 8 (SEQ. 8)

Мутантная полноразмерная последовательность FGF1 (1 - 155 АК), где в положении 108 гистидин (H) был заменен на глицин (G). Точечная мутация FGF1 (155 АК; H108G). Порядковый номер мутации: M6.

Sequence No. 8 (SEK8) MAEGEITTFE ALTEKFNLP GNYKKPKLLY CSNGGHFLRI LPDGTVDGTR DRSDQHILQ
FGF1 (1-155aa) LSAESVGEVY IKSTETGQYL AMDTDGLLYG SQTPNEECLF LERLEENHYN TYISKKHAEK
FGF1 (155aa; H108G) NWFVGLKKN GCKRGPRTHY GQKAILFLPL PVSSD
M6

10 Последовательность № 9 (SEQ. 9)

Мутантная полноразмерная последовательность FGF1 (1 - 155 АК), где в положении 55 глутамин (Q) был заменен на пролин (P) - Q55P, и в положении 62 серин (S) был заменен на изолейцин (I) - S62I, и в положении 108 гистидин (H) был заменен на глицин (G) - H108G. Тройная мутация FGF1 (155 АК; Q55P/S62I/H108G). Порядковый номер мутации: M7.

Sequence No. 9 (SEK9) MAEGEITTFE ALTEKFNLP GNYKKPKLLY CSNGGHFLRI LPDGTVDGTR DRSDQHILQ
FGF1 (1-155aa) 70 80 90 100 110 120
FGF1 (155aa; Q55P/S62I/H108G) LIAESVGEVY IKSTETGQYL AMDTDGLLYG SQTPNEECLF LERLEENHYN TYISKKHAEK
M7 130 140 150
NWFVGLKKN GCKRGPRTHY GQKAILFLPL PVSSD

Последовательность № 10 (SEQ. 10)

Мутантная полноразмерная последовательность FGF1 (1 - 155 АК), где в положении 55 глутамин (Q) был заменен на пролин (P) - Q55P, и в положении 62 серин (S) был заменен на изолейцин (I) - S62I, и в положении 108 гистидин (H) был заменен на глицин (G) - H108G; кроме того, в положении 114 серин (S) был заменен на аланин (A)

- S114A, и в положении 150 лейцин (L) был заменен на аспарагиновую кислоту (D) - L150D. Пятикратная мутация FGF1 (155 AK; Q55P/S62I/H108G/S114A/L150D).
Порядковый номер мутации: M8.

```
Sequence No. 10 (SEK10)      MAEGEITTFE ALTEKENLPP GNYKKPKLLY CSNGGHFLRI LPDGTVDGTR DRSDQHIQLQ
FGF1 (1-155aa)              I[AESVGEVY IKSTETGQYL AMDTDGLLYG SQTPNEECLF LERLEENQYN TYI[AKKHAEK
FGF1 (155aa;Q55P/S62I/H108G/S114A/L150D)  NWFVGLKKNQ SCKRGRPRTHY GQKAILFLP[D] PVSSD
M8
```

5

Последовательность № 11 (SEQ. 11)

Мутантная усеченная последовательность FGF1 (22 - 155 AK), где в положении 114 серин (S) был заменен на аланин (A). Точечная мутация FGF1 (Δ 155 AK; S114A).
Порядковый номер мутации: M9.

```
Sequence No. 11 (SEK11)      MA----- -NYKKPKLLY CSNGGHFLRI LPDGTVDGTR DRSDQHIQLQ
FGF1 (22-155aa)             LSAESVGEVY IKSTETGQYL AMDTDGLLYG SQTPNEECLF LERLEENHYN TYI[AKKHAEK
FGF1 (22-155aa;S114A)      NWFVGLKKNQ SCKRGRPRTHY GQKAILFLPL PVSSD
M9
```

10

Последовательность № 12 (SEQ. 12)

Мутантная усеченная последовательность FGF1 (22 - 155 AK), где в положении 150 лейцин (L) был заменен на аспарагиновую кислоту (D). Точечная мутация FGF1 (Δ 155 AK; L150D). Порядковый номер мутации: M10.

```
Sequence No. 12 (SEK12)      MA----- -NYKKPKLLY CSNGGHFLRI LPDGTVDGTR DRSDQHIQLQ
FGF1 (22-155aa)             LSAESVGEVY IKSTETGQYL AMDTDGLLYG SQTPNEECLF LERLEENHYN TYISKKHAEK
FGF1 (155aa;L150D)         NWFVGLKKNQ SCKRGRPRTHY GQKAILFLP[D] PVSSD
M10
```

15

Последовательность № 13 (SEQ. 13)

Мутантная усеченная последовательность FGF1 (22 - 155 AK), где в положении 114 серин (S) был заменен на аланин (A) - S114A, и в положении 150 лейцин (L) был заменен на аспарагиновую кислоту (D) - L150D. Мутация FGF1(Δ 155 AK; S114A/L150D).

20 Порядковый номер мутации: M11.

```
Sequence No. 13 (SEK13)      MA----- -NYKKPKLLY CSNGGHFLRI LPDGTVDGTR DRSDQHIQLQ
FGF1 (22-155aa)              70          80          90          100          110          120
FGF1 ( $\Delta$ 155aa;S114A/L150D)  LSAESVGEVY IKSTETGQYL AMDTDGLLYG SQTPNEECLF LERLEENHYN TYIAKKHAEK
M11                            130          140          150
                               NWFVGLKKNQ SCKRGPRTY GQKAILFLP PVSSD
```

Последовательность № 14 (SEQ. 14)

Мутантная усеченная последовательность FGF1 (22 - 155 АК), где в положении 55 глутамин (Q) был заменен на пролин (P). Точечная мутация FGF1 (Δ 155 АК; Q55P).

5 Порядковый номер мутации: M12.

```
Sequence No. 14 (SEK14)      MA----- -NYKKPKLLY CSNGGHFLRI LPDGTVDGTR DRSDPHIQLQ
FGF1 (22-155aa)              LSAESVGEVY IKSTETGQYL AMDTDGLLYG SQTPNEECLF LERLEENHYN TYISKKHAEK
FGF1 ( $\Delta$ 155aa;Q55P)          NWFVGLKKNQ SCKRGPRTY GQKAILFLPL PVSSD
M12
```

Последовательность № 15 (SEQ. 15)

Мутантная усеченная последовательность FGF1 (22 - 155 АК), где в положении 62 серин (S) был заменен на изолейцин (I). Точечная мутация FGF1 (Δ 155 АК; S62I).

10 Порядковый номер мутации: M13.

```
Sequence No. 15 (SEK15)      MA----- -NYKKPKLLY CSNGGHFLRI LPDGTVDGTR DRSDQHIQLQ
FGF1 (22-155aa)              LIAESVGEVY IKSTETGQYL AMDTDGLLYG SQTPNEECLF LERLEENHYN TYISKKHAEK
FGF1 ( $\Delta$ 155aa;S62I)          NWFVGLKKNQ SCKRGPRTY GQKAILFLPL PVSSD
M13
```

Последовательность № 16 (SEQ. 16)

Мутантная усеченная последовательность FGF1 (22 - 155 АК), где в положении 108 гистидин (H) был заменен на глицин (G). Точечная мутация FGF1 (Δ 155 АК; H108G).

15 Порядковый номер мутации: M14.

```
Sequence No. 16 (SEK16)      MA----- -NYKKPKLLY CSNGGHFLRI LPDGTVDGTR DRSDQHIQLQ
FGF1 (22-155aa)              LSAESVGEVY IKSTETGQYL AMDTDGLLYG SQTPNEECLF LERLEENGIN TYISKKHAEK
FGF1 ( $\Delta$ 155aa;H108G)          NWFVGLKKNQ SCKRGPRTY GQKAILFLPL PVSSD
M14
```

Последовательность № 17 (SEQ. 17)

Мутантная усеченная последовательность FGF1 (22 - 155 АК), в которой в положении 55 глутамин (Q) был заменен на пролин (P) - Q55P, и в положении 62 серин (S) был

заменен на изолейцин (I) - S62I, и в положении 108 гистидин (H) был заменен на глицин (G) - H108G. Тройная мутация FGF1 (Δ 155 AK; Q55P/S62I/H108G). Порядковый номер мутации: M15.

```
Sequence No. 17 (SEK17)      MA----- -NYKKPKLLY CSNGGHFLRI LPDGTVDGTR DRSDQHIQLQ
FGF1 (22-155aa)              70      80      90      100      110      120
FGF1 ( $\Delta$ 155aa;Q55P/S62I/H108G)  LIAESVGEVY IKSTETGQYL AMDTDGLLYG SQTPNEECLF LERLEENGYN TYISKKHAEK
M15                          130      140      150
                              NWFVGLKKNQ SCKRGPRTHY GQKAILFLPL PVSSD
```

5

Последовательность № 18 (SEQ. 18)

Мутантная усеченная последовательность FGF1 (22 - 155 AK), в которой в положении 55 глутамин (Q) был заменен на пролин (P) - Q55P, и в положении 62 серин (S) был
10 заменен на изолейцин (I) - S62I, и в положении 108 гистидин (H) был заменен на глицин (G) - H108G; кроме того, в положении 114 серин (S) был заменен на аланин (A) - S114A, и в положении 150 лейцин (L) был заменен на аспарагиновую кислоту (D) - L150D. Пятикратная мутация FGF1 (Δ 155 AK; Q55P/S62I/H108G/S114A/L150D). Порядковый номер мутации: M16.

```
Sequence No. 18 (SEK18)      MA----- -NYKKPKLLY CSNGGHFLRI LPDGTVDGTR DRSDQHIQLQ
FGF1 (22-155aa)              LIAESVGEVY IKSTETGQYL AMDTDGLLYG SQTPNEECLF LERLEENGYN TYIAKKHAEK
FGF1 ( $\Delta$ 155aa;Q55P/S62I/H108G/S114A/L150D)  NWFVGLKKNQ SCKRGPRTHY GQKAILFLPD PVSSD
M16
```

15

Последовательность № 19 (SEQ. 19)

Гомодимер полноразмерного FGF1 (1 - 155 AK), в котором две Последовательности № 1 соединены линкером: GGGGSGGGGSGGGG N'-конец-(1-155-линкер-2-155)-C'-
20 метионин (M) был опущен. FGF1_Димер (155 AK).

```
Sequence No. 19 (SEK19)      10      20      30      40      50      60
FGF1 (1-155aa)              70      80      90     100     110     120
FGF1_DIMER(155aa)          130     140     150     160     170     180
FGF1_WT_DIMER               190     200     210     220     230     240
                             250     260     270     280     290     300
                             310     320
                             RGPRTHYGQK AILFLPLPVS SD
```

Последовательность № 20 (SEQ. 20)

Гомодимер усеченного FGF1 (22 - 155 АК), в котором две Последовательности № 2 соединены линкером: GGGGSGGGGSGGGG N'-конец-(22-155-линкер-22-155)-С'-конец.

5 В последовательности жирным шрифтом выделены первые 2 аминокислоты первого мономера FGF1 (Δ155 АК) и первая аминокислота второго мономера FGF1 (Δ155 АК), присутствие которых является результатом способа клонирования усеченной последовательности FGF1 (АК 22 - 155) в вектор экспрессии. Метионин (М) кодируется иницирующим кодоном AUG, с которого начинается процесс экспрессии белка и

10 присутствие которого требуется на N'-конце; аланин (А) был добавлен к последовательности в результате добавления двух нуклеотидов к последовательности, фланкирующей сайт рестрикции, чтобы сохранить необходимую рамку считывания в процессе транскрипции. Добавление аланина не вызывает каких-либо физических и химических изменений в белке благодаря его

15 неполярной и алифатической природе. Второй мономер FGF1 (Δ155 АК) начинается с аланина (А) в положении 170; метионин (М) был опущен. FGF1_Димер (Δ155 АК).

```
Sequence No. 20 (SEK20)      MA----- -NYKKPKLLY CSNGGHFLRI LPDGTVDGTR DRSDQHIQLQ
FGF1 (22-155aa)             LSAESVGEVY IKSTETGQYL AMDTDGLLYG SQTPNEECLF LERLEENHYN TYISKKHAEK
FGF1_DIMER(155aa)          NWFVGLKKNK SCKRGPRTHY GQKAILFLPL PVSSDGGGGS GGGGSGGGGA -----
FGF1_ΔWT_DIMER              -----NY KKPALLYCSN GGHFLRILPD GTVDGTRDRS DQHIQLQLSA ESVGVEVIKS
                             TETGQYLAMD TDGLLYGSQT PNEECLFLER LEENHYNTYI SKKHAEKNWF VGLKKNKGSCK
                             RGPRTHYGQK AILFLPLPVS SD
```

Последовательность № 21 (SEQ. 21)

Гомодимер полноразмерного мутеина FGF1 (АК 1 - 155) с порядковым номером М8,

20 где две Последовательности № 10 соединены линкером: GGGGSGGGGSGGGG N'-конец-(1-155-линкер -2-155)-С'-конец. Второй мономер FGF1 (155 АК;

Q55P/S62I/H108G/S114A/L150D) начинается с аланина (A) в положении 170. Метионин (M) был опущен. FGF1_M8_Димер (155 АК).

```

Sequence No. 21 (SEK21)      MAEGEITTF  ALTEKFNLP  GNYKKPKLLY CSNGGHFLRI LPDGTVDGTR DRSDPHIQLQ
FGF1 (1-155aa)              70          80          90          100         110         120
FGF1_M8_DIMER(155aa)      LIAESVGEVY IKSTETGQYL AMDTDGLLYG SQTPNEECLF LERLEENQYN TYIAKKHAEK
                               130         140         150         160         170         180
                               NWFVGLKKN  SCKRGRPTHY GQKAILFLPD PVSSDGGGGS GGGSGGGGA EGEITTFAL
                               190         200         210         220         230         240
                               IEKFNLPNPNY KKPKLLYCSN GGHFLRILPD GTVDGTRDRS DPHIQLQLIA ESVGEVYIKS
                               250         260         270         280         290         300
                               TETGQYLAMD TDGLLYGSQT PNEECLFLER LEENQYNTYI AKKHAEKNWF VGLKKNGSCK
                               310         320
                               RGRPTHYQCK AILFLPDVPS SD
    
```

Последовательность № 22 (SEQ. 22)

5 Гомодимер усеченного FGF1 (AK 22 - 155), где две Последовательности № 18 соединены линкером: GGGSGGGSGGGG N'-конец-(22-155-линкер-22-155)-C'-конец. В последовательности жирным шрифтом выделены первые две аминокислоты первого мономера FGF1 (Δ 155 АК) и первая аминокислота второго мономера FGF1 (Δ 155 АК; Q55P/S62I/H108G/S114A/L150D), присутствие которых является результатом

10 способа клонирования усеченной последовательности FGF1 (AK 22 - 155) в вектор экспрессии. Метионин (M) кодируется иницирующим кодоном AUG, с которого начинается процесс экспрессии белка, и присутствие которого требуется на N'-конце; аланин (A) был добавлен к последовательности в результате добавления двух нуклеотидов к последовательности, фланкирующей сайт рестрикции, чтобы

15 сохранить необходимую рамку считывания в процессе транскрипции. Добавление аланина не вызывает никаких физических и химических изменений в белке благодаря его неполярной и алифатической природе. Второй мономер FGF1 (Δ 155 АК; Q55P/S62I/H108G/S114A/L150D) начинается с аланина (A) в положении 170. Метионин (M) был опущен. FGF1_M16_Димер (Δ 155 АК).

```

Sequence No. 22 (SEK22)      MA----- -NYKKPKLLY CSNGGHFLRI LPDGTVDGTR DRSDPHIQLQ
FGF1 (22-155aa)              LIAESVGEVY IKSTETGQYL AMDTDGLLYG SQTPNEECLF LERLEENQYN TYIAKKHAEK
FGF1_M16_DIMER(155aa)      NWFVGLKKN  SCKRGRPTHY GQKAILFLPD PVSSDGGGGS GGGSGGGGA -----
                               -----NY KKPKLLYCSN GGHFLRILPD GTVDGTRDRS DPHIQLQLIA ESVGEVYIKS
                               TETGQYLAMD TDGLLYGSQT PNEECLFLER LEENQYNTYI AKKHAEKNWF VGLKKNGSCK
                               RGRPTHYQCK AILFLPDVPS SD
    
```

20

Последовательность № 23 (SEQ. 23)

Мутантная полноразмерная последовательность FGF1 (1 - 155 АК), где в положении 55 глутамин (Q) был заменен на пролин (P) - Q55P, и в положении 62 серин (S) был заменен на изолейцин (I) - S62I, в положении 108 гистидин (H) был заменен на глицин (G) - H108G; кроме того, в положении 153 серин (S) был заменен на аланин (A) - S153A.

- 5 Четырехкратная мутация FGF1 (155 АК; Q55P/S62I/H108G/S153A). Порядковый номер мутации: M17.

```
Sequence No. 23 (SEK23)      MAEGEITTFI ALTEKFNLPP GNYKKPKLLY CSNGGHFLRI LPDGIVDGTR DRSDQHIQLQ
FGF1 (1-155aa)              70          80          90          100         110         120
FGF1_M(155aa)              LIAESVGEVY IKSTETGQYL AMDTDGLLYG SQTPNEECLF LERLEENSYN TYISKKHAEK
                               130         140         150         160         170         180
                               NWFVGLKKNQ SCKRGPRTY GQKAILFLPL PVASD
```

Последовательность № 24 (SEQ. 24)

- 10 Мутантная усеченная последовательность FGF1 (22 - 155 АК), где в положении 55 глутамин (Q) был заменен на пролин (P) - Q55P, и в положении 62 серин (S) был заменен на изолейцин (I) - S62I, и в положении 108 гистидин (H) был заменен на глицин (G) - H108G; кроме того, в положении 153 серин (S) был заменен на аланин (A) - S153A. Четырехкратная мутация FGF1 (Δ 155 АК; Q55P/S62I/H108G/S153A). Порядковый номер мутации: M18.

```
Sequence No. 24 (SEK24)      MA----- -NYKKPKLLY CSNGGHFLRI LPDGIVDGTR DRSDQHIQLQ
FGF1 (22-155aa)              LIAESVGEVY IKSTETGQYL AMDTDGLLYG SQTPNEECLF LERLEENSYN TYISKKHAEK
FGF1_M(155aa)              NWFVGLKKNQ SCKRGPRTY GQKAILFLPL PVASD
```

15

Последовательность № 25 (SEQ. 25)

- 20 Мутантная полноразмерная последовательность FGF1 (1 - 155 АК), где в положении 55 глутамин (Q) был заменен на пролин (P) - Q55P, и в положении 62 серин (S) был заменен на изолейцин (I) - S62I, в положении 108 гистидин (H) был заменен на глицин (G) - H108G; кроме того, в положении 153 серин (S) был заменен на аргинин (R) - S153R. Четырехкратная мутация FGF1 (155 АК; Q55P/S62I/H108G/S153R). Порядковый номер мутации: M19.

	10	20	30	40	50	60
Sequence No. 25 (SEK25)	M A E G E I T T F T	A L T E K F N L P P	G N Y K K P K L L Y	C S N G G H F L R I	L P D G T V D G T R	D R S D P H I Q L Q
FGF1 (1-155aa)						
FGF1_M(Δ 155aa)	L P A E S V G E V Y	I K S T E T G Q Y L	A M D T D G L L Y G	S Q T P N E E C L F	L E R L E E N G Y N	T Y I S K K H A E K
	130	140	150	160	170	180
	N W F V G L K K N G	S C K R G P R T H Y	G Q K A I L F L P L	P V P S D		

Последовательность № 26 (SEQ. 26)

Мутантная усеченная последовательность FGF1 (22 - 155 АК), где в положении 55 глутамин (Q) был заменен на пролин (P) - Q55P, и в положении 62 серин (S) был заменен на изолейцин (I) - S62I, и в положении 108 гистидин (H) был заменен на глицин (G) - H108G; кроме того, в положении 153 серин (S) был заменен на аргинин (R) - S153R. Четырехкратная мутация FGF1 (Δ 155 АК; Q55P/S62I/H108G/S153R). Порядковый номер мутации: M20.

Sequence No. 26 (SEK26)	MA -----	-----	-N	Y K K P K L L Y	C S N G G H F L R I	L P D G T V D G T R	D R S D P H I Q L Q
FGF1 (22-155aa)	L P A E S V G E V Y	I K S T E T G Q Y L	A M D T D G L L Y G	S Q T P N E E C L F	L E R L E E N G Y N	T Y I S K K H A E K	
FGF1_M(Δ 155aa)	N W F V G L K K N G	S C K R G P R T H Y	G Q K A I L F L P L	P V P S D			

10 Последовательность № 27 (SEQ. 27)

Мутантная полноразмерная последовательность FGF1 (1 - 155 АК), где в положении 153 серин (S) был заменен на аспарагиновую кислоту (D) - S153D, и в положении 154 серин (S) был заменен на аспарагиновую кислоту (D) - S154D. Двойная мутация FGF1 (155 АК; S153D/S154D). Порядковый номер мутации: M21.

	10	20	30	40	50	60
Sequence No. 27 (SEK27)	M A E G E I T T F T	A L T E K F N L P P	G N Y K K P K L L Y	C S N G G H F L R I	L P D G T V D G T R	D R S D Q H I Q L Q
FGF1 (1-155aa)						
FGF1_M(155aa)	L S A E S V G E V Y	I K S T E T G Q Y L	A M D T D G L L Y G	S Q T P N E E C L F	L E R L E E N H Y N	T Y I S K K H A E K
	130	140	150			
	N W F V G L K K N G	S C K R G P R T H Y	G Q K A I L F L P L	P V P D D		

15

Последовательность № 28 (SEQ. 28)

Мутантная усеченная последовательность FGF1 (22 - 155 АК), где в положении 153 серин (S) был заменен на аспарагиновую кислоту (D) - S153D, и в положении 154 серин (S) был заменен на аспарагиновую кислоту (D) S154D. Двойная мутация FGF1 (Δ 155 АК; S153D/S154D). Порядковый номер мутации: M22.

20

```
Sequence No. 28 (SEK28)      MA----- -NYKKPKLLY CSNGGHFLRI LPDGTVDGTR DRSDQHIQLQ
FGF1 (22-155aa)            LSAESVGEVY IKSTETGQYL AMDTDGLLYG SQTPNEECLF LERLEENHYN TYISKKHAEK
FGF1_M(Δ155aa)             NWFVGLKKNQ SCKRGPRTHY GQKAILFLPL PVDD
```

Последовательность № 29 (SEQ. 29)

Мутантная полноразмерная последовательность FGF1 (1 - 155 АК), где в положении 55 глутамин (Q) был заменен на пролин (P) - Q55P, и в положении 62 серин (S) был
5 заменен на изолейцин (I) - S62I, в положении 108 гистидин (H) был заменен на глицин (G) - H108G; кроме того, в положении 153 серин (S) был заменен на аспарагиновую кислоту (D) - S153D, и в положении 154 серин (S) был заменен на аспарагиновую кислоту (D) - S154D. Пятикратная мутация FGF1 (155 АК; Q55P/S62I/H108G/S153D/S154D). Порядковый номер мутации: M23.

```
Sequence No. 29 (SEK29)      MAEGEITITFT ALTEKFNLP GNYKKPKLLY CSNGGHFLRI LPDGTVDGTR DRSDQHIQLQ
FGF1 (1-155aa)              70 80 90 100 110 120
FGF1_M(155aa)              LSAESVGEVY IKSTETGQYL AMDTDGLLYG SQTPNEECLF LERLEENHYN TYISKKHAEK
10                               130 140 150
                               NWFVGLKKNQ SCKRGPRTHY GQKAILFLPL PVDD
```

Последовательность № 30 (SEQ. 30)

Мутантная усеченная последовательность FGF1 (22 - 155 АК), где в положении 55 глутамин (Q) был заменен на пролин (P) - Q55P, и в положении 62 серин (S) был
15 заменен на изолейцин (I) - S62I; в положении 108 гистидин (H) был заменен на глицин (G) - H108G; кроме того, в положении 153 серин (S) был заменен на аспарагиновую кислоту (D) - S153D, и в положении 154 серин (S) был заменен на аспарагиновую кислоту (D) - S154D. Пятикратная мутация FGF1 (Δ155 АК; Q55P/S62I/H108G/S153D/S154D). Порядковый номер мутации: M24.

```
Sequence No. 30 (SEK30)      MA----- -NYKKPKLLY CSNGGHFLRI LPDGTVDGTR DRSDQHIQLQ
FGF1 (22-155aa)            ILSAESVGEVY IKSTETGQYL AMDTDGLLYG SQTPNEECLF LERLEENHYN TYISKKHAEK
FGF1_M(Δ155aa)             NWFVGLKKNQ SCKRGPRTHY GQKAILFLPL PVDD
```

20 Последовательность № 31 (SEQ. 31)

Мутантная полноразмерная последовательность FGF1 (1 - 155 АК), где в положении 153 серин (S) был заменен на аргинин (R). Точечная мутация FGF1 (155 АК; S153R).
Порядковый номер мутации: M25.

```
Sequence No. 31 (SEK31)      MAEGEITIFT ALTEKFNLPP GNYKKPKLLY CSNGGHFLRI LPDGTVDGTR DRSDQHIQLQ
FGF1 (1-155aa)              70          80          90          100         110         120
FGF1_M(155aa)              LSAESVGEVY IKSTETGQYL AMDTDGLLYG SQTPNEECLF LERLEENHYN TYISKKHAEK
                             130         140         150
                             NWFVGLKKNQ SCKRGPRTHY GQKAILFLPL PVRSD
```

5 Последовательность № 32 (SEQ. 32)

Мутантная полноразмерная последовательность FGF1 (1 - 155 АК), где в положении 153 серин (S) был заменен на аланин (A). Точечная мутация FGF1(155 АК;S153A).
Порядковый номер мутации: M26.

```
Sequence No. 32 (SEK32)      MAEGEITIFT ALTEKFNLPP GNYKKPKLLY CSNGGHFLRI LPDGTVDGTR DRSDQHIQLQ
FGF1 (22-155aa)             70          80          90          100         110         120
FGF1_M(155aa)              LSAESVGEVY IKSTETGQYL AMDTDGLLYG SQTPNEECLF LERLEENHYN TYISKKHAEK
                             130         140         150
                             NWFVGLKKNQ SCKRGPRTHY GQKAILFLPL PVASD
```

10 Последовательность № 33 (SEQ. 33)

Мутантная усеченная последовательность FGF1 (22 - 155 АК), где в положении 153 серин (S) был заменен на аргинин (R). Точечная мутация FGF1 (Δ155 АК; S153R).
Порядковый номер мутации: M27.

```
Sequence No. 33 (SEK33)      MA----- -NYKKPKLLY CSNGGHFLRI LPDGTVDGTR DRSDQHIQLQ
FGF1 (22-155aa)             LSAESVGEVY IKSTETGQYL AMDTDGLLYG SQTPNEECLF LERLEENHYN TYISKKHAEK
FGF1_M(155aa)              NWFVGLKKNQ SCKRGPRTHY GQKAILFLPL PVRSD
```

15 Последовательность № 34 (SEQ. 34)

Мутантная усеченная последовательность FGF1 (22 - 155 АК), где в положении 153 серин (S) был заменен на аланин (A). Точечная мутация FGF1 (Δ155 АК; S153A).
Порядковый номер мутации: M28.

```
Sequence No. 34 (SEK34)      MA----- -NYKKPKLLY CSNGGHFLRI LPDGTVDGTR DRSDQHIQLQ
FGF1 (22-155aa)             LSAESVGEVY IKSTETGQYL AMDTDGLLYG SQTPNEECLF LERLEENHYN TYISKKHAEK
FGF1_M(155aa)              NWFVGLKKNQ SCKRGPRTHY GQKAILFLPL PVASD
```

Последовательность № 35 (SEQ. 35)

Гомодимер полноразмерного мутеина FGF1 (1 - 155) с порядковым номером M29, где две Последовательности № 31 соединены линкером: GGGGSGGGGSGGGG N'-конец-(1-155-линкер-2-155)-C'-конец. Второй мономер FGF1 (155 AK; S153R) начинается с аланина (A) в положении 170. Метионин (M) был опущен. FGF1_M29_Димер (155 AK).

Sequence No. 35 (SEK35)	10	20	30	40	50	60
FGF1 (1-155aa)	70	80	90	100	110	120
FGF1_DIMER ^(155aa)	130	140	150	160	170	180
	190	200	210	220	230	240
	250	260	270	280	290	300
	310	320				

```
MAEGEITTFI ALTEKFNLP GNYKKPKLLY CSNGGFRLRI LPDGTVDGTR DRSDQHILQLQ
LSAESVGEVY IKSTETGQYL AMDTDGLLYG SQTPNEECLF LERLEENHYN TYISKKHAEK
NWFVGLKKN G SCKRGRPTHY GQKAILFLPL PV[RS]GGGGS GGGGSGGGGA EGEITTFIAL
TEKFNLPPTY KKPALLYCSN GGHFLRILPD GTVDGTRDRS DQHILQLLSA ESVGEVYIKS
TETGQYLAMD TDGLLYGSQT PNEECLFLER LEENHYNTYI SKKHAEKWVF VGLKKN G SCK
RGRPTHYGOK AILFLPLPV[A] SD
```

Последовательность № 36 (SEQ. 36)

Гомодимер полноразмерного мутеина FGF1 (1 - 155) с порядковым номером M30, где две Последовательности № 32 соединены линкером: GGGGSGGGGSGGGG N'-конец-(1-155-линкер-2-155)-C'-конец. Второй мономер FGF1 (155 AK; S153A) начинается с аланина (A) в положении 170. Метионин (M) был опущен. FGF1_M30_Димер (155 AK).

Sequence No. 36 (SEK36)	10	20	30	40	50	60
FGF1 (1-155aa)	70	80	90	100	110	120
FGF1_DIMER ^(155aa)	130	140	150	160	170	180
	190	200	210	220	230	240
	250	260	270	280	290	300
	310	320				

```
MAEGEITTFI ALTEKFNLP GNYKKPKLLY CSNGGFRLRI LPDGTVDGTR DRSDQHILQLQ
LSAESVGEVY IKSTETGQYL AMDTDGLLYG SQTPNEECLF LERLEENHYN TYISKKHAEK
NWFVGLKKN G SCKRGRPTHY GQKAILFLPL PV[A]SDGGGGS GGGGSGGGGA EGEITTFIAL
TEKFNLPPTY KKPALLYCSN GGHFLRILPD GTVDGTRDRS DQHILQLLSA ESVGEVYIKS
TETGQYLAMD TDGLLYGSQT PNEECLFLER LEENHYNTYI SKKHAEKWVF VGLKKN G SCK
RGRPTHYGOK AILFLPLPV[A] SD
```

Последовательность № 37 (SEQ. 37)

Гомодимер усеченного FGF1 (2 - 155), где две Последовательности № 33 соединены линкером: GGGGSGGGGSGGGG N'-конец-(22-155-линкер-22-155)-C'-конец. В последовательности жирным шрифтом выделены первые 2 аминокислоты первого мономера FGF1 (Δ 155 AK; S153R) и первая аминокислота второго мономера FGF1

(Δ155 AK; S153R), присутствие которых является результатом способа клонирования усеченной последовательности FGF1 (AK 22 - 155) в вектор экспрессии. Метионин (M) кодируется иницирующим кодоном AUG, с которого начинается процесс экспрессии белка и присутствие которого требуется на N'-конце. Аланин (A) был добавлен к последовательности в результате добавления двух нуклеотидов к последовательности, фланкирующей сайт рестрикции, чтобы сохранить необходимую рамку считывания в процессе транскрипции. Добавление аланина не вызывает никаких физических и химических изменений в белке благодаря его неполярной и алифатической природе. Второй мономер FGF1 (Δ155 AK; S153R) начинается с аланина (A) в положении 170. Метионин (M) был опущен. FGF1_M31_Димер (Δ155 AK).

```
Sequence No. 37 (SEK37)      MA----- -NYKKPKLLY CSNGGHFLRI LPDGTVDGTR DRSDQHIQLQ
FGF1 (22-155aa)             LSAESVGEVY IKSTETGQYL AMDTDGLLYG SQTPNEECLF LERLEENHYN TYISKKHAEK
FGF1_DIMER (Δ155aa)         NWFVGLKKNQ SKRGRPRTHY GQKAILFLPL PV[SDGGGGS GGGGSGGGGA]-----
-----NY KKPKLLYCSN GGHFLRILPD GTVDGTRDRS DQHIQLQLSA ESVGVEVYIKS
TETGQYLAMD TDGLLYGSQT PNEECLFLER LEEENHYNTYI SKKHAEKNWF VGLKKNQSKC
RGRPRTHYGQK AILFLPLPV[R] SD
```

Последовательность № 38 (SEQ. 38)

Гомодимер усеченного FGF1 (2 - 155), где две Последовательности № 34 соединены линкером: **GGGGS**GGGGS**GGGG** N'-конец-(22-155-линкер-22-155)-C'-конец. В последовательности жирным шрифтом выделены первые 2 аминокислоты первого мономера FGF1 (Δ155 AK; S153A) и первая аминокислота второго мономера FGF1 (Δ155 AK; S153A), присутствие которых является результатом способа клонирования усеченной последовательности FGF1 (AK 22 - 155) в вектор экспрессии. Метионин (M) кодируется иницирующим кодоном AUG, с которого начинается процесс экспрессии белка и присутствие которого требуется на N'-конце. Аланин (A) был добавлен к последовательности в результате добавления двух нуклеотидов к последовательности, фланкирующей сайт рестрикции, чтобы сохранить необходимую рамку считывания в процессе транскрипции. Добавление аланина не вызывает никаких физических и химических изменений в белке благодаря его неполярной и алифатической природе. Второй мономер FGF1 (Δ155 AK; S15A)

начинается с аланина (A) в положении 170. Метионин (M) был опущен. FGF1_M32_Димер (Δ155 AK).

```
Sequence No. 38 (SEK38)      MA----- -NYKKPKLLY CSNGGHFLRI LPDGTVDGTR DRSDQHIQLQ
FGF1 (22-155aa)            LSAESVGEVY IKSTETGQYL AMDTDGLLYG SQTPNEECLF LERLEENHYN TYISKKHAEK
FGF1_DIMER (Δ155aa)        NWFVGLKKNQ SCKRGRPTHY GQKAILFLPL PVASDGGGGS GGGSGGGGA -----
-----NY KKPRLLYCSN GGHFLRILPD GTVDGTRDRS DQHIQLQLSA ESVGVEVIKS
TETGQYLAMD TDGLLYGSQT PNEECLFLER LEENHYNTYI SKKHAEKWFV VGLKKNQSKC
RGRPTHYQOK AILFLPLPVASD
```

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

5 На **фиг. 1** показан анализ пролиферации, измеренной методом МТТ с использованием коммерческого набора для нерадиоактивного анализа пролиферации клеток CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega). Клетки NIH3T3 высевали при плотности 2000 клеток/лунку на 96-луночный планшет с использованием среды Игла, модифицированной по способу Дульбекко (DMEM), с
10 добавлением 10% телячьей сыворотки (ТС). На следующий день клетки подвергали голоданию в течение 5 часов в DMEM без ТС; затем добавляли белки в указанных концентрациях и инкубировали в течение 48 часов. Анализ МТТ проводили в соответствии с протоколом производителя. Результаты эксперимента показали повышение пролиферации обеих форм FGF1 без существенных различий между
15 усеченной формой - белком FGF1 (Δ155 AK) - и полноразмерной формой - белком FGF1 (155 AK).

На **фиг. 2** показаны результаты анализа пролиферации, измеренной методом МТТ с использованием коммерческого набора для нерадиоактивного анализа пролиферации клеток CellTiter 96® (Promega). Клетки NIH3T3 высевали при плотности
20 2000 клеток/лунку на 96-луночный планшет с использованием DMEM с добавлением 10% ТС. На следующий день клетки подвергали голоданию в течение 5 часов в DMEM без ТС; затем добавляли белки в указанных концентрациях и инкубировали в течение 48 часов. Анализ МТТ проводили в соответствии с протоколом производителя. Результаты эксперимента показали значимую индукцию пролиферации
25 полноразмерной формой белка FGF1 дикого типа (155 AK) и незначимую индукцию пролиферации мутантом S114A (со сниженной аффинностью к СК2), как в усеченной форме - FGF1 (Δ155 AK; S114A), так и в полноразмерной форме - FGF1 (155 AK; S114A).

На **фиг. 3** показаны результаты анализа пролиферации, измеренной методом МТТ с использованием коммерческого набора для нерадиоактивного анализа пролиферации клеток CellTiter 96® (Promega). Клетки NIH3T3 высевали при плотности 2000 клеток/лунку на 96-луночный планшет с использованием DMEM с добавлением 10% ТС. На следующий день клетки подвергали голоданию в течение 5 часов в DMEM без ТС; затем добавляли белки в указанных количествах и инкубировали в течение 48 часов. Анализ МТТ проводили в соответствии с протоколом производителя. Результаты эксперимента показали значимую индукцию пролиферации полноразмерной формой белка FGF1 дикого типа (155 АК) и незначимую индукцию пролиферации мутантом L150D (со сниженной аффинностью к рецептору FGFR1), как в усеченной форме - FGF1 (Δ 155 АК; L150D), - так и в полноразмерной форме - FGF1 (155 АК; L150D).

На **фиг. 4** показаны результаты анализа пролиферации, измеренной методом МТТ с использованием коммерческого набора для нерадиоактивного анализа пролиферации клеток CellTiter 96® (Promega). Клетки NIH3T3 высевали при плотности 2000 клеток/лунку на 96-луночный планшет с использованием DMEM с добавлением 10% ТС. На следующий день клетки подвергали голоданию в течение 5 часов в DMEM без ТС; затем добавляли белки в указанных концентрациях и инкубировали в течение 48 часов. Анализ МТТ проводили в соответствии с протоколом производителя. Результаты эксперимента показали значимую индукцию пролиферации полноразмерной формой белка FGF1 (155 АК) дикого типа и незначимую индукцию пролиферации мутантом S114A/L150D (с пониженной аффинностью к CK2 и рецептору FGFR1), как в усеченной форме - FGF1 (Δ 155 АК; S114A/L150D), - так и в полноразмерной форме - FGF1 (155 АК; S114A/L150D).

На **фиг. 5** показаны результаты анализа пролиферации, измеренной методом МТТ с использованием коммерческого набора для нерадиоактивного анализа пролиферации клеток CellTiter 96® (Promega). Клетки NIH3T3 высевали при плотности 2000 клеток/лунку на 96-луночный планшет с использованием DMEM с добавлением 10% ТС. На следующий день клетки подвергали голоданию в течение 5 часов в DMEM без ТС; затем добавляли белки в указанных концентрациях и инкубировали в течение 48 часов. Анализ МТТ проводили в соответствии с протоколом производителя.

Результаты эксперимента показали значимую индукцию пролиферации формой белка FGF1 (155 AK) дикого типа и незначимую индукцию пролиферации мутантом Q55P/S62I/H108G/S114A/L150D (мутант с повышенной термической стабильностью и пониженной аффинностью к СК2 и рецептору FGFR1), как в усеченной форме - FGF1
5 (Δ155 AK; Q55P/S62I/H108G/S114A/L150D), - так и в полноразмерной форме - FGF1 (155 AK; Q55P/S62I/H108G/S114A/L150D).

На **фиг. 6** показаны результаты анализа пролиферации, измеренной методом МТТ с использованием коммерческого набора для нерадиоактивного анализа пролиферации клеток CellTiter 96® (Promega). Клетки NIH3T3 высевали при плотности
10 2000 клеток/лунку на 96-луночный планшет с использованием DMEM с добавлением 10% ТС. На следующий день клетки подвергали голоданию в течение 5 часов в DMEM без ТС; затем добавляли белки в указанных концентрациях и инкубировали в течение 48 часов. Анализ МТТ проводили в соответствии с протоколом производителя. Белки, используемые в эксперименте, представляли собой мутанты полноразмерного белка
15 FGF1 (155 AK). Результаты эксперимента показали очень высокую индукцию пролиферации мутантом с повышенной термической стабильностью - FGF1 (155 AK; Q55P/S62I/H108G). Кроме того, эксперимент показал индукцию пролиферации формой белка FGF1 (155 AK) дикого типа и незначимую индукцию пролиферации мутантами: FGF1 (155 AK; Q55P/S62I/H108G/S114A/L150D), FGF1 (155 AK; S114A), FGF1
20 (155 AK; L150D) и FGF1 (155 AK; S114A/L150D).

На **фиг. 7** показаны результаты анализа пролиферации, измеренной методом МТТ с использованием коммерческого набора для нерадиоактивного анализа пролиферации клеток CellTiter 96® (Promega). Клетки NIH3T3 высевали при плотности
25 2000 клеток/лунку на 96-луночный планшет с использованием DMEM с добавлением 10% ТС. На следующий день клетки подвергали голоданию в течение 5 часов в DMEM без ТС; затем добавляли белки в указанных концентрациях и инкубировали в течение 48 часов. Анализ МТТ проводили в соответствии с протоколом производителя. Белки, используемые в эксперименте, представляли собой мутанты полноразмерной формы белка FGF1 (155 AK). Результаты эксперимента показали очень высокую индукцию
30 пролиферации мутантами с повышенной термической стабильностью - FGF1 (155 AK; Q55P/S62I/H108G), FGF1 (155 AK; Q55P/S62I/H108G/S153A), FGF1 (155 AK;

Q55P/S62I/H108G/S153R). Кроме того, эксперимент показал индукцию пролиферации формой белка FGF1 (155 AK) дикого типа и мутантами: FGF1 (155 AK; S153A), FGF1 (155 AK; S153R). Для мутанта FGF1 (155 AK; Q55P/S62I/H108G/S114A/L150D) продемонстрировали незначимую индукцию пролиферации.

- 5 На **фиг. 8** показаны результаты анализа пролиферации, измеренной методом МТТ с использованием коммерческого набора для нерадиоактивного анализа пролиферации клеток CellTiter 96® (Promega). Клетки NIH3T3 высевали при плотности 2000 клеток/лунку на 96-луночный планшет с использованием DMEM с добавлением 10% ТС. На следующий день клетки подвергали голоданию в течение 5 часов в DMEM
- 10 без ТС; затем добавляли белки в указанных концентрациях и инкубировали в течение 48 часов. Анализ МТТ проводили в соответствии с протоколом производителя. Белки, используемые в эксперименте, представляли собой мутанты полноразмерной формы белка FGF1 (155 AK). Результаты эксперимента показали очень высокую индукцию пролиферации мутантами: FGF1 (155 AK; S153R) и FGF1 (155 AK;
- 15 Q55P/S62I/H108G/S114A/L150D). Кроме того, эксперимент показал индукцию пролиферации формой белка FGF1 (155 AK) дикого типа и мутантами: FGF1 (155 AK; S153A), FGF1 (155 AK; Q55P/S62I/H108G). Для мутанта FGF1 (155 AK; Q55P/S62I/H108G/S114A/L150D) продемонстрировали незначительную индукцию пролиферации.
- 20 На **фиг. 9** показаны результаты анализа пролиферации, измеренной методом МТТ с использованием коммерческого набора для нерадиоактивного анализа пролиферации клеток CellTiter 96® (Promega). Клетки NIH3T3 высевали при плотности 2000 клеток/лунку на 96-луночный планшет с использованием среды Игла, модифицированной по способу Дульбекко (DMEM), с добавлением 10% ТС. На
- 25 следующий день клетки подвергали голоданию в течение 5 часов в DMEM без ТС; затем добавляли белки в указанных концентрациях и инкубировали в течение 48 часов. Анализ МТТ проводили в соответствии с протоколом производителя. Результаты эксперимента показали повышение пролиферации обеими формами FGF1 без значимых различий между усеченной формой - белком FGF1 (Δ 155 AK) - и
- 30 усеченной димерной формой - FGF1_Димер (Δ 155 AK).

На **фиг. 10** показаны результаты анализа пролиферации, измеренной методом МТТ с использованием коммерческого набора для нерадиоактивного анализа пролиферации клеток CellTiter 96® (Promega). Клетки NIH3T3 высевали при плотности 2000 клеток/лунку на 96-луночный планшет с использованием DMEM с добавлением 10% ТС. На следующий день клетки подвергали голоданию в течение 5 часов в DMEM без ТС; затем добавляли белки в указанных концентрациях (с добавлением 10 Ед/мл гепарина или без него) и инкубировали в течение 48 часов. Анализ МТТ проводили в соответствии с протоколом производителя. Результаты эксперимента показали положительное влияние гепарина на повышение пролиферации для формы белка FGF1 ($\Delta 155$ АК) дикого типа. Отсутствие гепарина оказывало влияние на интенсивность пролиферации, но не останавливало ее. Результаты однозначно указывают на то, что гепарин не влияет на эффективность индукции пролиферации FGF1 ($\Delta 155$ АК). Кроме того, эксперимент показал незначимую индукцию пролиферации мутантом FGF1 ($\Delta 155$ АК; Q55P/S62I/H108G/S114A/L150D) как при добавлении гепарина, так и без него.

На **фиг. 11** показаны результаты анализа поглощения глюкозы, измеренного методом хемилюминесценции с использованием коммерческого набора для анализа поглощения глюкозы Glucose Uptake-Glo™ (Promega). В анализе использовали адипоциты, дифференцированные из фибробластов мыши 3T3-L1, в соответствии с протоколом, предоставленным производителем набора Glucose Uptake-Glo (Promega). Дифференцированные адипоциты высевали при плотности 50000 клеток/лунку на 96-луночный планшет, покрытый поли-D-лизином, с использованием DMEM с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (ЭБС). На следующий день белки добавляли в указанных концентрациях в DMEM без ЭБС и инкубировали в течение 16 часов. Анализ поглощения глюкозы проводили в соответствии с протоколом производителя. Результаты эксперимента показали повышение поглощения глюкозы для обеих форм FGF1, без существенных различий между усеченной формой - белком FGF1 ($\Delta 155$ АК) - и полноразмерным белком FGF1 (155 АК).

На **фиг. 12** показаны результаты анализа поглощения глюкозы, измеренного методом хемилюминесценции с использованием коммерческого набора для анализа

поглощения глюкозы Glucose Uptake-Glo™ (Promega). В анализе использовали адипоциты, дифференцированные из фибробластов мыши 3T3-L1, в соответствии с протоколом, предоставленным производителем набора Glucose Uptake-Glo (Promega). Дифференцированные адипоциты высевали при плотности 50000
5 клеток/лунку на 96-луночный планшет, покрытый поли-D-лизином, с использованием DMEM с добавлением 10% ЭБС. На следующий день белки добавляли в указанных концентрациях в DMEM без ЭБС и инкубировали в течение 16 часов. Анализ поглощения глюкозы проводили в соответствии с протоколом производителя. Результаты эксперимента показали повышение поглощения глюкозы для формы
10 белка FGF1 (155 АК) дикого типа и значимое повышение поглощения глюкозы (превышающее действие FGF1 (155 АК)) для мутанта S114A, как в усеченной форме - FGF1 (Δ 155 АК; S114A), так и в полноразмерной форме - FGF1 (155 АК; S114A).

На **фиг. 13** показаны результаты анализа поглощения глюкозы, измеренного методом хемилюминесценции с использованием коммерческого набора для анализа
15 поглощения глюкозы Glucose Uptake-Glo™ (Promega). В анализе использовали адипоциты, дифференцированные из фибробластов мыши 3T3-L1, в соответствии с протоколом, предоставленным производителем набора Glucose Uptake-Glo (Promega). Дифференцированные адипоциты высевали при плотности 50000 клеток/лунку на 96-луночный планшет, покрытый поли-D-лизином, с использованием
20 DMEM с добавлением 10% ЭБС. На следующий день белки добавляли в указанных концентрациях в DMEM без ЭБС и инкубировали в течение 16 часов. Анализ поглощения глюкозы проводили в соответствии с протоколом производителя. Результаты эксперимента показали повышение поглощения глюкозы для формы
25 белка FGF1 (155 АК) дикого типа и значимое снижение поглощения глюкозы (по сравнению с FGF1 (155 АК)) для мутанта L150D, как в усеченной форме - FGF1 (Δ 155 АК; L150D), - так и в полноразмерной форме - FGF1 (155 АК; L150D).

На **фиг. 14** показаны результаты анализа поглощения глюкозы, измеренного методом хемилюминесценции с использованием коммерческого набора для анализа
30 поглощения глюкозы Glucose Uptake-Glo™ (Promega). В анализе использовали адипоциты, дифференцированные из фибробластов мыши 3T3-L1, в соответствии с протоколом, предоставленным производителем набора Glucose Uptake-Glo

- (Promega). Дифференцированные адипоциты высевали при плотности 50000 клеток/лунку на 96-луночный планшет, покрытый поли-D-лизином, с использованием DMEM с добавлением 10% ЭБС. На следующий день белки добавляли в указанных концентрациях в DMEM без ЭБС и инкубировали в течение 16 часов. Анализ поглощения глюкозы проводили в соответствии с протоколом производителя.
- 5 Результаты эксперимента показали повышение поглощения глюкозы для формы белка FGF1 (155 АК) дикого типа и значимое снижение поглощения глюкозы (по сравнению с FGF1 (155 АК)) для мутанта S114A/L150D, как в усеченной форме - FGF1 (Δ 155 АК; S114A/L150D), - так и в полноразмерной форме - FGF1 (155 АК; S114A/L150D).
- 10 На **фиг. 15** показаны результаты анализа поглощения глюкозы, измеренного методом хемилюминесценции с использованием коммерческого набора для анализа поглощения глюкозы Glucose Uptake-Glo™ (Promega). В анализе использовали адипоциты, дифференцированные из фибробластов мыши 3T3-L1, в соответствии с протоколом, предоставленным производителем набора Glucose Uptake-Glo
- 15 (Promega). Дифференцированные адипоциты высевали при плотности 50000 клеток/лунку на 96-луночный планшет, покрытый поли-D-лизином, с использованием DMEM с добавлением 10% ЭБС. На следующий день белки добавляли в указанных концентрациях в DMEM без ЭБС и инкубировали в течение 16 часов. Анализ поглощения глюкозы проводили в соответствии с протоколом производителя.
- 20 Результаты эксперимента показали значимое повышение поглощения глюкозы для формы белка FGF1 (155 АК) дикого типа и повышение поглощения глюкозы для дозы 1000 нг/мл мутанта Q55P/S62I/H108G/S114A/L150D, как в усеченной форме - FGF1 (Δ 155 АК; Q55P/S62I/H108G/S114A/L150D), так и в полноразмерной форме - FGF1 (155 АК; Q55P/S62I/H108G/S114A/L150D).
- 25 На **фиг. 16** показаны результаты анализа поглощения глюкозы, измеренного методом хемилюминесценции с использованием коммерческого набора для анализа поглощения глюкозы Glucose Uptake-Glo™ (Promega). В анализе использовали адипоциты, дифференцированные из фибробластов мыши 3T3-L1, в соответствии с протоколом, предоставленным производителем набора Glucose Uptake-Glo
- 30 (Promega). Дифференцированные адипоциты высевали при плотности 50000 клеток/лунку на 96-луночный планшет, покрытый поли-D-лизином, с использованием

DMEM с добавлением 10% ЭБС. На следующий день белки добавляли в указанных концентрациях в DMEM без ЭБС и инкубировали в течение 16 часов. Анализ поглощения глюкозы проводили в соответствии с протоколом производителя. Белки, используемые в экспериментах, представляли собой мутанты полноразмерного белка FGF1 (155 AK). Результаты эксперимента показали очень высокое поглощение глюкозы для мутанта с повышенной термической стабильностью - FGF1 (155 AK; Q55P/S62I/H108G). Кроме того, показали повышенное поглощение глюкозы для FGF1 (155 AK), FGF1 (155 AK; Q55P/S62I/H108G/S114A/L150D) и FGF1 (155 AK; S114A). Для FGF1 (155 AK; L150D) и FGF1 (155 AK; S114A/L150D) продемонстрировали незначимое повышение поглощения глюкозы или отсутствие такого повышения.

На **фиг. 17** показаны результаты анализа поглощения глюкозы, измеренного методом хемилюминесценции с использованием коммерческого набора для поглощения глюкозы Glucose Uptake-Glo™ (Promega). В анализе использовали адипоциты, дифференцированные из фибробластов мыши 3T3-L1, в соответствии с протоколом, предоставленным производителем набора Glucose Uptake-Glo (Promega). Дифференцированные адипоциты высевали при плотности 50000 клеток/лунку на 96-луночный планшет, покрытый поли-D-лизином, с использованием DMEM с добавлением 10% ЭБС. На следующий день белки добавляли в указанных концентрациях в DMEM без ЭБС и инкубировали в течение 16 часов. Анализ поглощения глюкозы проводили в соответствии с протоколом производителя. Белки, используемые в экспериментах, представляли собой мутанты полноразмерного белка FGF1 (155 AK). Результаты эксперимента показали очень высокую индукцию поглощения глюкозы для мутантов с повышенной термической стабильностью - FGF1 (155 AK; Q55P/S62I/H108G), FGF1 (155 AK; Q55P/S62I/H108G/S153A), FGF1 (155 AK; Q55P/S62I/H108G/S153R). Кроме того, эксперимент показал повышенное поглощение глюкозы для FGF1 (155 AK) и FGF1 (155 AK; Q55P/S62I/H108G/S114A/L150D), тогда как для FGF1 (155 AK; Q55P/S62I/H108G/S153A) и FGF1 (155 AK; Q55P/S62I/H108G/ S153R) показали самую высокую индукцию поглощения глюкозы.

На **фиг. 18** показаны результаты анализа поглощения глюкозы, измеренного методом хемилюминесценции с использованием коммерческого набора для анализа поглощения глюкозы Glucose Uptake-Glo™ (Promega). В анализе использовали

адипоциты, дифференцированные из фибробластов мыши 3T3-L1, в соответствии с протоколом, предоставленным производителем набора Glucose Uptake-Glo (Promega). Дифференцированные адипоциты высевали при плотности 50000 клеток/лунку на 96-луночный планшет, покрытый поли-D-лизином, с использованием DMEM с добавлением 10% ЭБС. На следующий день белки добавляли в указанных концентрациях в DMEM без ЭБС и инкубировали в течение 16 часов. Анализ поглощения глюкозы проводили в соответствии с протоколом производителя. Результаты эксперимента показали повышение поглощения глюкозы для обеих димерных форм FGF1 без существенных различий между усеченной формой белка FGF1_Димер ($\Delta 155$ АК) и полноразмерной формой белка FGF1_Димер (155 АК).

На **фиг. 19** показаны результаты анализа экспрессии белка и фосфорилирования белков FGF:FGFR-зависимого пути, выполненного методом вестерн-блоттинга (WB), причем сканирование мембраны осуществляли методом хемилюминесценции с использованием оборудования ChemiDock (Bio-Rad). В анализе использовали адипоциты, дифференцированные из фибробластов мыши 3T3-L1, в соответствии с протоколом, предоставленным производителем набора Glucose Uptake-Glo (Promega). Дифференцированные адипоциты высевали при плотности 50000 клеток/лунку на 96-луночный планшет, покрытый поли-D-лизином, с использованием DMEM с добавлением 10% ЭБС. На следующий день клетки подвергали голоданию в течение 5 часов в DMEM без ЭБС; затем добавляли белки в концентрации 100 нг/мл и инкубировали в течение 10 минут для исследования фосфорилирования белков FGF:FGFR-зависимого пути и в течение 16 часов для исследования экспрессии белка Glut1. После инкубации белки промывали холодным ФБР и осуществляли лизис клеток с использованием буфера RIPA с добавлением ингибиторов протеаз и фосфатаз. Белки разделяли с помощью электрофореза в ПААГ-ДСН и переносили на нитроцеллюлозную мембрану. Блокированные мембраны инкубировали в течение 16 часов при температуре 4° с первичными антителами при разведении 1:1000. Вторичные антитела против антител кролика, конъюгированные с HRP, инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Для получения хемилюминесцентного сигнала использовали буферы Clarity Max ECL. Контроль концентрации белка проводили с помощью анализа сигнала без окрашивания (технология Stain-Free).

Результаты эксперимента показали повышение фосфорилирования рецептора FGFR1 и зависимых от рецептора FGFR1 белков, т.е. pErk1/2 и pFRS2a для FGF1 (155 AK), FGF1 (155 AK; Q55P/S62I/H108G) и FGF1 (155 AK; S114A). FGF1 (155 AK; Q55P/S62I/H108G/S114A/L150D) незначимо активировал путь FGF1:FGFR, тогда как
5 для FGF1 (155 AK; L150D) и FGF1 (155 AK; S114A/L150D) продемонстрировали отсутствие активации.

На **фиг. 20** показаны результаты исследования *in vivo* эффекта снижения концентрации глюкозы в крови у диабетического штамма мышей *db/db* (BKS.Cg-*+Leprdb/+ Leprdb/OlaHsd*) после введения 0,5 мг/кг массы тела (м.т.) белка FGF1 (Δ155
10 AK) дикого типа с добавлением и без добавления 10 Ед/мл гепарина. Контрольной группой были мыши *db/db*, получавшие носитель. Результаты однозначно указывают на положительный эффект FGF1 (Δ155 AK), состоящий в снижении уровня глюкозы до нормогликемии, и отсутствие влияния гепарина на эффективность снижения уровня глюкозы у мышей *db/db*.

15 На **фиг. 21** представлены результаты исследования *in vivo* эффекта снижения концентрации глюкозы в крови у диабетического штамма мышей *db/db* (BKS.Cg-*+Leprdb/+ Leprdb/OlaHsd*) после введения 1 мг/кг м.т. белка FGF1 дикого типа (Δ155 AK) и мутанта FGF1 (Δ155 AK; S114A). Контрольной группой были мыши *db/db*, получавшие носитель. Результаты показывают положительный эффект FGF1 (Δ155 AK)
20 и мутанта FGF1 (Δ155 AK; S114A), состоящий в снижении уровня глюкозы до нормогликемии у мышей *db/db*.

На **фиг. 22** представлены результаты исследования *in vivo* эффекта снижения концентрации глюкозы в крови у диабетического штамма мышей *db/db* (BKS.Cg-*+Leprdb/+ Leprdb/OlaHsd*) после введения 1 мг/кг м.т. белка FGF1 дикого типа (Δ155
25 AK) и мутанта FGF1 (Δ155 AK; L150D). Контрольной группой были мыши *db/db*, получавшие носитель. Результаты указывают на положительный эффект FGF1 (Δ155 AK), состоящий в снижении уровня глюкозы до нормогликемии, у мышей *db/db* и отсутствие эффективного действия мутанта FGF1 (Δ155 AK; L150D).

На **фиг. 23** представлены результаты исследования *in vivo* эффекта снижения
30 концентрации глюкозы в крови у диабетического штамма мышей *db/db* (BKS.Cg-

+*Leprdb/+ Leprdb/OlaHsd*) после введения 1 мг/кг м.т. белка FGF1 (Δ 155 AK) и мутанта FGF1 (Δ 155 AK; Q55P/S62I/H108G). Контрольной группой были мыши *db/db*, получавшие носитель. Результаты указывают на положительный эффект FGF1 (Δ 155 AK) и FGF1 (Δ 155 AK; Q55P/S62I/H108G), состоящий в снижении уровня глюкозы до нормогликемии у мышей *db/db*, при этом эффективность действия мутанта FGF1 (Δ 155 AK; Q55P/S62I/H108G) была выше по сравнению с FGF1 (Δ 155 AK).

На **фиг. 24** показаны результаты исследования *in vivo* эффекта снижения концентрации глюкозы в крови у диабетического штамма мышей *db/db* (BKS.Cg-+*Leprdb/+ Leprdb/OlaHsd*) после введения 1 мг/кг м.т. белка FGF1 (Δ 155 AK) и мутантов Q55P/S62I/H108G/S114A/L150D. Контрольной группой были мыши *db/db*, получавшие носитель. Результаты указывают на положительный эффект мутантов FGF1 (Δ 155 AK) и Q55P/S62I/H108G/S114A/L150D, состоящий в снижении уровня глюкозы до нормогликемии у мышей *db/db*, без существенных различий между усеченной формой - FGF1 (Δ 155 AK; Q55P/S62I/H108G/S114A/L150D) и полноразмерной формой - FGF1 (155 AK; Q55P/S62I/H108G/S114A/L150D).

На **фиг. 25** показаны результаты исследования *in vivo* эффекта снижения концентрации глюкозы в крови у диабетического штамма мышей *db/db* (BKS.Cg-+*Leprdb/+ Leprdb/OlaHsd*) после введения 1 мг/кг м.т. белка FGF1 (Δ 155 AK), FGF1 (155 AK) и димерной формы усеченного мутеина - FGF1_Димер (Δ 155 AK). Контрольной группой были мыши *db/db*, получавшие носитель. Результаты указывают на положительный эффект FGF1 (Δ 155 AK) и FGF1 (155 AK), состоящий в снижении уровня глюкозы до нормогликемии у мышей *db/db*, и отсутствии эффективного действия усеченной димерной формы - FGF1_Димер (Δ 155 AK).

На **фиг. 26** представлены результаты исследования *in vivo* эффекта снижения концентрации глюкозы в крови у диабетического штамма мышей *db/db* (BKS.Cg-+*Leprdb/+ Leprdb/OlaHsd*) после введения 5 мг/кг м.т. белка FGF1 (Δ 155 AK), мутантного FGF1 (155 AK; Q55P/S62I/H108G/S114A/L150D) и димерной формы FGF1_M8_Димер (155 AK). Контрольной группой были мыши *db/db*, получавшие носитель. Результаты указывают на положительный эффект FGF1 (Δ 155 AK) и FGF1 (155 AK; Q55P/S62I/H108G/S114A/L150D), состоящий в снижении уровня глюкозы до

нормогликемии у мышей *db/db*, и на более низкую, по сравнению с мономерным вариантом, эффективность действия димерной формы - FGF1_M8_Димер (155 АК).

На **фиг. 27** показаны результаты исследования *in vivo* эффекта снижения концентрации глюкозы в крови у диабетического штамма мышей *db/db* (BKS.Cg-
5 +*Lep^{rdb}*/*+ Lep^{rdb}*/OlaHsd) после введения 1 мг/кг м.т. белка FGF1 (Δ 155 АК) и трех доз: 1, 2,5, 5 мг/кг м.т. FGF1 (155 АК; Q55P/S62I/H108G/S114A/L150D). Контрольной группой были мыши *db/db*, получавшие носитель. Результаты указывают на положительный эффект FGF1 (Δ 155 АК) и FGF1 (155 АК; Q55P/S62I/H108G/S114A/L150D), состоящий в снижении уровня глюкозы до нормогликемии у мышей *db/db*, с явной зависимостью от дозы FGF1 (155 АК; Q55P/S62I/H108G/S114A/L150D).

10

Примеры

Все процедуры, тесты и экспериментальные анализы, описанные ниже, осуществляли с использованием доступных для приобретения наборов для анализа, реагентов и устройств в соответствии с рекомендациями производителей применяемых наборов,
15 реагентов и устройств, если в настоящем документе не указано иное; авторы настоящего изобретения использовали стандартные, общеизвестные способы, применяемые в области, к которой относится настоящее изобретение.

Пример 1.

Получение конструкций, кодирующих варианты белка FGF1 в соответствии с
20 настоящим изобретением и описанием, и их экспрессия и очистка.

Вариант дикого типа FGF1 ДТ. Синтезировали кДНК (номер доступа в GenBank NM 001354952.2, 468 п.о., кодирует фактор роста фибробластов 1 (FGF-1) человека, оптимизирована для экспрессии в клетках *E. coli*, и ген фланкирован сайтами рестрикции для ферментов: NdeI на 5'-конце и XhoI на 3'-конце (Gene Synthesis,
25 Thermo Fisher Scientific)). Синтетический ген клонировали в модифицированный вектор экспрессии pCPVT0010, полученный в Celon Pharma, с применением указанных выше ферментов рестрикции. Разработанная конструкция белка FGF1 (155 АК) не содержала меток, облегчающих очистку, и дополнительных аминокислот на N- или C-концах.

30 Все мутеины, сконструированные в соответствии с настоящим изобретением, т. е. мутированные последовательности белков FGF1 (Δ 155 АК) (короткие варианты) и

FGF1 (155 AK) (полноразмерные варианты), содержащие одну, две, три, четыре или пять точечных мутаций, были получены стандартным способом в реакции ПЦР, если не указано иное, в соответствии с методикой направленного мутагенеза, с последующей трансформацией ими DH5 *E. coli*, в соответствии с методикой, описанной Hanahan et al. (Hanahan, D., Jessee, J., & Bloom, F. R. (1991). Plasmid transformation of Escherichia coli and other bacteria. *Methods in Enzymology*, 204, 63–113. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(91\)04006-a](https://doi.org/10.1016/0076-6879(91)04006-a)).

Конструирование мутеинов: FGF1 (155 AK; L150D), FGF1 (155 AK; S114A) – мутанты с одной заменой получали на основе последовательности FGF1 (1 - 155 AK, Последовательность № 1) в реакции ПЦР в соответствии с методикой сайт-направленного точечного мутагенеза, описанной Stratagene. Все реакционные смеси для амплификации (50 мкл) содержали буфер для полимеразы, дНТФ, матричную ДНК, праймеры, комплементарные смысловым и антисмысловым цепям, несущие мутированный кодон, и высокоточную полимеразу Q5 Hot Start (New England Biolab). Реакционной смесью трансформировали клетки DH5 *E. coli* в соответствии с методикой Hanahan. (Hanahan et al., 1991).

Конструкция мутеина: FGF1 (155 AK; S114A/L150D), FGF1 (155 AK; Q55P/S62I/H108G/S114A/L150D) – мутеин с двумя точечными мутациями получали путем модификации кодонов кДНК гена белка FGF1 (AK 1 - 155) дикого типа. Последовательности ДНК оптимизировали для экспрессии в клетках *E. coli*, гены синтезировали и получали в соответствии с приведенным выше описанием.

Конструирование мутеинов: FGF1 (155 AK; Q55P/S62I/H108G/S114A/L150D) – мутеин со множеством мутаций получали путем модификации кодонов кДНК гена белка FGF1 (AK 1 - 155) дикого типа (Последовательность № 1). Последовательности ДНК оптимизировали для экспрессии в клетках *E. coli*, гены синтезировали и получали в соответствии с приведенным выше описанием.

Конструирование мутеинов: FGF1 (155 AK; S153A), FGF1 (155 AK; S153R) – мутанты с одной заменой получали на основе последовательности FGF1 (1 - 155 AK, Последовательность № 1) в реакции ПЦР в соответствии с методикой сайт-направленного точечного мутагенеза, описанной Stratagene. Все реакционные смеси для амплификации (50 мкл) содержали буфер для полимеразы, дНТФ, матричную

ДНК, праймеры, комплементарные смысловым и антисмысловым цепям, несущие мутированный кодон, и высокоточную полимеразу Q5 Hot Start (New England Biolab). Реакционной смесью трансформировали клетки DH5 *E. coli* в соответствии с методикой Hanahan (Hanahan et al., 1991).

5 Конструирование мутеинов: FGF1 (155 AK; Q55P/S62I/H108G/S153A); FGF1 (155 AK; Q55P/S62I/H108G/S153R) – мутеины со множеством мутаций получали путем модификации кодонов кДНК гена белка FGF1 (AK 1 - 155) дикого типа (Последовательность № 1). Последовательности ДНК оптимизировали для экспрессии в клетках *E. coli*, гены синтезировали и получали в соответствии с
10 приведенным выше описанием.

Конструирование мутеинов: FGF1 (155 AK; S153D/S154D) – мутант с двойной заменой получали на основе последовательности FGF1 (1 - 155 AK, Последовательность № 1) в реакции ПЦР в соответствии с методикой сайт-направленного точечного мутагенеза, описанной Stratagene. Все реакционные смеси для амплификации (50 мкл)
15 содержали буфер для полимеразы, дНТФ, матричную ДНК, праймеры, комплементарные смысловым и антисмысловым цепям, несущие мутированный кодон, и высокоточную полимеразу Q5 Hot Start (New England Biolab). Реакционной смесью трансформировали клетки DH5 *E. coli* в соответствии с методикой Hanahan (Hanahan et al., 1991).

20 Конструирование мутеинов: FGF1 (155 AK; Q55P/S62I/H108G/S153D/S154D) – мутеины со множеством мутаций получали путем модификации кодонов кДНК гена белка FGF1 (AK 1 - 155) дикого типа (Последовательность № 1). Последовательности ДНК оптимизировали для экспрессии в клетках *E. coli*, гены синтезировали и получали в соответствии с приведенным выше описанием.

25 Конструирование мутеинов: FGF1 (Δ 155 AK; Q55P/S62I/H108G/S153D/S154D); FGF1 (Δ 155 AK; S114A); FGF1 (Δ 155 AK; L150D); FGF1 (Δ 155 AK; S114A/L150D); FGF1 (Δ 155 AK; Q55P/S62I/H108G/S153A); FGF1 (Δ 155 AK; Q55P/S62I/H108G/S153R); FGF1 (Δ 155 AK; S153A), FGF1 (Δ 155 AK; S153R) – конструкции для этих мутированных белков содержали кДНК, кодирующую информацию для формы белка FGF1 дикого типа,
30 усеченной с N-конца, и его усеченных мутеинов. Последовательности ДНК были

оптимизированы для экспрессии в клетках *E. coli*, синтетические гены были заказаны и получены в соответствии с приведенным выше описанием.

Экспрессия и очистка вариантов белка FGF1 в соответствии с настоящим изобретением и описанием.

- 5 Белок FGF1 и его модификации в длинном варианте FGF1 (155 АК) и усеченном варианте FGF1 (Δ 155 АК) экспрессировали в клетках *E. coli* в среде ТВ (Terrific Broth; Sigma) с добавлением антибиотиков. Содержащую канамицин среду ТВ инокулировали ночной предварительной культурой. Экспрессию белка индуцировали с помощью изопропилтиогалактозида (ИПТГ), а затем культуры
- 10 растили в течение 20 ч. Культуры бактерий центрифугировали в течение 15 мин при 6000 g при 4° С. Полученные осадки суспендировали в лизирующем буфере и инкубировали в течение 30 мин, а затем подвергали обработке ультразвуком на льду в течение 5 мин. Отфильтрованные растворимые фракции (супернатант), полученные
- 15 путем центрифугирования образцов в течение 30 мин при 20000 g при 4° С, загружали на колонку с гепарином (Heparin 6 FastFlow, Cytiva). Белки, не связавшиеся со смолой, вымывали буфером А и осуществляли элюирование FGF1 с применением градиента буфера В. Элюированные белки FGF1 подвергали дополнительному процессу гель-фильтрации (колонка HiLoad 16/600 Superdex 75 prep grade, Cytiva). Полученные белки подвергали количественному анализу (A280) с использованием коэффициента
- 20 экстинкции и качественному анализу: анализ чистоты с использованием ЭФ в ПААГ/ДСН, капиллярный электрофорез, термический сдвиг, эксклюзионная ВЭЖХ, МС. Белки разделяли на аликвоты, замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -80°С.

25 **Пример 2.**

- Подтверждение эффективности экзогенного рекомбинантного белка FGF1 человека. Проведенный тест был направлен на подтверждение противодиабетической активности полученного FGF1 (Δ 155 АК) в соответствии с настоящим изобретением. Мышам db/db вводили подкожно 0,5 мг/кг м.т. белка FGF1 (Δ 155 АК) с добавлением
- 30 гепарина (неизмененный белок FGF1, поэтому гепарин использовали для защиты белка от деградации и инактивации). Белок эффективно снижает концентрацию

глюкозы вплоть до 30 ч после инъекции. В качестве контрольной группы использовали мышей db/db, которые получали только носитель (фигура 20).

Пример 3.

- 5 Подтверждение эффективности FGF1 (Δ 155 AK) и усеченного варианта - FGF1 (Δ 155 AK; Q55/S62/H108) - без добавления гепарина. В анализе исследовали противодиабетическую эффективность белка FGF1(Δ 155 AK) в отсутствие гепарина и эффективность усеченного варианта - FGF1 (Δ 155 AK; Q55/S62/H108). В конечном
- 10 введении гепарина вызывает побочные эффекты, и поэтому его нельзя вводить субъектам-людям.

Анализ проводили с использованием белков: FGF1 (Δ 155 AK) и варианта FGF1 (Δ 155 AK; Q55/S62/H108) в концентрации 1 мг/кг м.т. Для обоих белков выявили противодиабетическую активность, но мутеин со стабилизирующими мутациями

15 (стабильный вариант) - FGF1 (Δ 155 AK; Q55/S62/H108) - сохранял эффект значительно дольше (фигура 23). На основании полученных результатов сделан вывод, что стабилизация FGF1 продлевает противодиабетическую активность.

Путем введения известных стабилизирующих мутаций, описанных в литературе, предпочтительно всех таких трех стабилизирующих мутаций, описанных выше, в

20 заявленный мутированный белок FGF1 человека был получен термически стабилизированный белок, который также обладает высоким противодиабетическим потенциалом. Это также повышает фармакологическую пригодность этого белка, поскольку стабильный белок можно эффективно продуцировать в больших масштабах.

- 25 Однако митогенный эффект, который является одним из основных факторов, ограничивающих клиническое применение rhFGF1, до сих пор не устранен.

Пример 4.

Снижение митогенного потенциала белка FGF1 человека.

Авторы настоящего изобретения исследовали митогенный потенциал усеченного белка FGF1 человека с введенной мутацией S114A в системе без гепарина в линии клеток NIH 3T3 с использованием способа, описанного Skjervep et al. (Skjervep et al., 2002). В экспериментах, проведенных в линии клеток NIH 3T3, белок FGF1 (Δ 155 AK; 5 S114A) не стимулирует пролиферацию клеток по сравнению с неизмененным FGF1 (фигура 2). Полученные результаты отличаются от результатов, полученных Skjervep et al. Необходимо учитывать два параметра, которые отличают эти два эксперимента. Во-первых, в исследовании Skjervep et al. эксперименты проводили в системе, которая также включала гепарин, который стабилизировал белок. В экспериментах 10 заявителя эффект наблюдался для белка, который не был дополнительно стабилизирован гепарином, поскольку белок вводится *in vivo* без гепарина вследствие токсического действия последнего на организм. Кроме того, заявитель продемонстрировал, что присутствие гепарина не является необходимым для демонстрации митогенного потенциала белка дикого типа (фигура 10). Во-вторых, 15 Skjervep et al. работали с полноразмерным белком, тогда как заявитель проводил свой эксперимент с использованием обоих вариантов: усеченного FGF1 (Δ 155 AK) и полноразмерного FGF1 (155 AK).

Пример 5.

20 Нарушение взаимодействия с рецептором FGFR1 путем введения мутации в сайт, отличный от сайта связывания гепарина.

Активация и димеризация рецептора FGF1 (FGFR1) необходима для индукции митогенного ответа. Нарушение связывания лиганда с рецептором ослабляет взаимодействие, снижает передачу сигналов и не способствует пролиферации 25 клеток.

Были получены варианты FGF-1, которые характеризовались нарушением связывания с рецептором FGFR1. Была разработана мутация в пределах домена, ответственного за аффинность к рецептору, но модифицированный остаток не имел решающего значения для этого связывания. Остаток лейцина (L) на С-конце заменяли на 30 аспарагиновую кислоту (D) (L150D).

Затем заявитель проверял, обладает ли полученный таким образом белок, который плохо связывается с рецептором, более слабым митогенным потенциалом. С этой целью проводили эксперимент с клетками NIH 3T3, которые подвергали воздействию исследуемых белков в течение 48 часов. Затем к клеткам добавляли реагент МТТ и
5 измеряли уровень поглощения. Наблюдали снижение пролиферации клеток, обработанных FGF1 (Δ 155 AK; L150D), FGF1 (Δ 155 AK; L150D), по сравнению с клетками, обработанными FGF1 (155 AK) (фигура 3).

Получив эффект ослабленной митогенности, авторы настоящего изобретения проверили, характеризуется ли по-прежнему белок высокой противодиабетической
10 активностью. В анализах *in vitro* клетки 3T3-L1, дифференцированные в адипоциты, обрабатывали белком FGF1 или вариантом: FGF1 (Δ 155 AK; L150D), FGF1 (155 AK; L150D). Через 16 часов после введения проводили анализ поглощения глюкозы в соответствии с протоколом производителя (Glucose Uptake Glo Assay, Promega). В анализе *in vitro* без добавления гепарина белок вызывал немного повышенное
15 поглощение глюкозы (фигура 13).

Результаты *in vitro* оказались многообещающими при оценке как митогенного потенциала, так и противодиабетической эффективности нового варианта - FGF1 (Δ 155 AK; L150D). Поэтому исследовали способность нового белка с мутацией L150D
20 снижать уровень глюкозы в крови *in vivo* в модели на мышах db/db. Мышам подкожно вводили дозу белка 1 мг/кг. Затем в несколько моментов времени измеряли уровень глюкозы в крови у мышей с помощью глюкометра, путем прокалывания кончика хвоста. К сожалению, вариант FGF1 (Δ 155 AK; L150D) не снижал уровень глюкозы в крови *in vivo* (фигура 22).

Причина отсутствия эффекта заключается, вероятно, в физических свойствах белка –
25 этот мутант характеризуется низкой стабильностью, температура его денатурации составляет около 28 °С. Таким образом, белок, введенный подкожно, незамедлительно разворачивается, и гепаранов, в природе присутствующих на поверхности клеток, недостаточно для стабилизации белка. При физиологической температуре тела мышей (около 37 °С) происходит денатурация белка и утрата его
30 активности.

Пример 6.

Активность вариантов белка FGF1 с двойной мутацией (FGF1 (155 AK; S114A/L150D))

- В этом эксперименте активность мутанта, содержащего мутацию S114A и мутацию L150D, в клетках NIH 3T3 тестировали в анализе МТТ. Было установлено, что у такого
- 5 двойного мутанта снижены митогенные свойства (фигура 4). Как мутация S114A, так и мутация L150D, а также их комбинация снижают пролиферацию по сравнению с таковой для белка дикого типа. Интересно, что наиболее сниженный митогенный эффект наблюдался для стабилизированного белка, т.е. белка, дополнительно
- 10 содержащего три стабилизирующие мутации в соответствии с настоящим изобретением FGF1 (155 AK; Q55P/S62I/H108G), как будет показано ниже. Кроме того, белок с пятью мутациями - FGF1 (155 AK; Q55P/S62I/H108G/S114A/L150D) - в соответствии с настоящим изобретением проявляет противодиабетическую активность, в отличие от вариантов L150D и S114A/L150D без стабилизирующих мутаций.
- 15 В эксперименте, в котором анализировали сигнальный каскад, ответственный за запуск пути пролиферации, варианты FGF1 (Δ 155 AK; L150D), FGF1 (Δ 155 AK; S114A/L150D) с меньшей эффективностью активируют рецептор FGFR1, что приводит к более слабой передаче сигнала и более низкому уровню фосфорилирования киназ Akt/PKB и ERK (фигура 19).
- 20 В анализе поглощения глюкозы, важном анализе в контексте противодиабетической активности белка FGF-1, варианты FGF1 (Δ 155 AK; L150D), FGF1 (Δ 155 AK; S114A/L150D) в соответствии с настоящим изобретением не вызывали поглощения глюкозы адипоцитами мыши, даже при самой высокой дозе 1000 нг/мл (фигура 14). Для них не продемонстрировали противодиабетической эффективности без
- 25 стабилизирующих мутаций; поэтому были получены варианты с множеством точечных мутаций, в частности с пятью точечными мутациями, как с двумя мутациями, снижающими митогенность (S114A/L150D), так и с тремя стабилизирующими мутациями (Q55P/S62I/H108G), которые демонстрируют противодиабетическую эффективность.

Пример 7.

Активность мутеинов FGF-1 с множеством мутаций.

Варианты FGF1 (155 АК; Q55P/S62I/H108G/S114A/L150D) и FGF1(Δ155 АК; Q55P/S62I/H108G/S114A/L150D)

5 Этот белок сочетает в себе все желательные свойства: он стабилен (температура денатурации выше 60 °С) и имеет сниженную митогенность по сравнению с белком дикого типа. Белок FGF1 дикого типа, даже если он не стабилизирован добавлением гепарина в его раствор, стимулирует пролиферацию клеток NIH 3T3. Вариант FGF1 (155 АК; Q55P/S62I/H108G/S114A/L150D) в исследованных концентрациях не
10 демонстрирует такого эффекта, независимо от содержания гепарина или его отсутствия (фигура 10). Кроме того, указанные мутанты проявляют противодиабетическую активность как *in vitro* (в клетках мыши 3T3-L1, дифференцированных в адипоциты) (фигуры 15, 16, 17), так и *in vivo*. Эффект снижения уровня глюкозы в крови у мышей db/db сохранялся в течение последующих
15 30 ч после введения варианта FGF1 (Δ155 АК; Q55P/S62I/H108G/S114A/L150D) и в течение 48 ч после введения белка дикого типа. Мутированный белок эффективен, но его активность короче, чем у белка дикого типа (вводимого животным в той же дозе) Вероятно, это является результатом механизма действия FGF1 и роли рецептора FGFR1 в эффекте снижения уровня глюкозы в крови (у мутанта нарушено связывание
20 с FGFR1 вследствие наличия мутации L150D). Повышение дозы мутеина до 5 мг/кг м.т. приводит к достижению времени активности, сравнимого с таковым для FGF1 дикого типа, который вводят в дозе 1 мг/кг м.т. Результаты проведенных анализов противодиабетической активности представлены в настоящем документе (фигуры 24, 26, 27).

25

Пример 8.

Модификации полноразмерных вариантов FGF1 (155 АК; Q55P/S62I/H108G/S114A/L150D).

30 Вариант FGF1 (155 АК; Q55P/S62I/H108G/S114A/L150D), разработанный на основе полноразмерной последовательности FGF1 (155 АК), и полноразмерный вариант FGF1

(155 AK) дикого типа анализировали, чтобы выяснить, влияет ли фрагмент из 19 АК на N-конце белка на биологическую активность белка и его мутеинов.

N-концевая делеция аминокислот E3 - G21 в полноразмерной последовательности не изменяла эффект снижения глюкозы *in vivo* (фигура 24), и указанный эффект был
5 сходен с эффектом в случае аналогичных полноразмерных мутеинов (фигура 15).

Пример 9.

Димерные белки усеченного варианта FGF1_Димер (Δ 155 АК) и полноразмерного варианта FGF1_Димер (155 АК).

10 Две молекулы FGF1 были соединены стандартным способом с помощью линкера из аминокислот. Димеризацию осуществляли в случае как коротких, так и полноразмерных последовательностей белков. Активность всех этих форм аналогична в условиях *in vitro* (фигура 18), но *in vivo* димерный вариант FGF1_Димер (Δ 155 АК) был менее активен (фигура 25).

15

Пример 10.

Результаты, демонстрирующие активность вариантов белка FGF1 с одной мутацией: FGF1 (155 АК; S114A), FGF1 (155 АК; L150D) и двойной мутацией: FGF1 (155 АК; S114A/L150D)

20 Мутации FGF1 (155 АК; S114A) и FGF1 (155 АК; L150D) ограничивают митогенную активность клеток. Данные представлены для клеток NIH 3T3 в анализе МТТ: обе мутации FGF1 (155 АК; S114A) и FGF1 (155 АК; L150D), а также их комбинация FGF1 (155 АК; S114A/L150D) снижали пролиферацию по сравнению с белком дикого типа, то есть снижали митогенный потенциал мутированного белка (фигуры 2, 3, 4, 6). Интересно,
25 что наиболее сниженный митогенный эффект наблюдался для дополнительно стабилизированного белка, т.е. белка, дополнительно содержащего стабилизирующую мутацию в соответствии с настоящим изобретением: FGF1 (155 АК; Q55P/S62I/H108G/S114A/L150D) (фигуры 6, 7, 8, 10). Кроме того, у такого стабилизированного белка FGF1 (155 АК; Q55P/S62I/H108G/S114A/L150D) выявили
30 противодиабетическую активность, в отличие от вариантов с одиночными мутациями: FGF1 (155 АК; S114A), FGF1 (155 АК; L150D) и двойными мутациями FGF1 (155 АК; S114A/L150D) (фигуры 21, 22, 24). В эксперименте, в котором анализировали

сигнальный каскад, ответственный за запуск пути пролиферации, варианты FGF1 (155 AK; S114A), FGF1 (155 AK; L150D) и FGF1 (155 AK; S114A/L150D) с меньшей эффективностью активировали рецептор FGFR1, что приводило к более слабому сигналу и более низкому уровню фосфорилирования киназ Akt/PKB и ERK (фигура 19).

5 В анализе поглощения глюкозы, важном анализе в контексте противодиабетической активности белка FGF1, варианты FGF1 (155 AK; S114A), FGF1 (155 AK; L150D) и FGF1 (155 AK; S114A/L150D) в соответствии с настоящим изобретением не вызывали поглощения глюкозы адипоцитами мыши даже при самой высокой дозе 1000 нг/мл (фигуры 12, 13, 14, 16). Для них не продемонстрировали противодиабетической

10 эффективности без стабилизирующих мутаций; поэтому были получены варианты с множеством точечных мутаций, в частности с пятью точечными мутациями: с двумя мутациями, снижающими митогенность (S114A/L150D), и с тремя стабилизирующими мутациями (Q55P/S62I/H108G), для которых неожиданно дополнительно выявили противодиабетическую активность.

15

Пример 11.

Активность мутеинов FGF1 с одиночными мутациями в положении S153 hFGF1.

Авторы настоящего изобретения исследовали активность разработанных мутеинов, содержащих точечную мутацию, расположенную в положении S153 в домене, отвечающем за аффинность лиганда FGF1 к рецептору, в том числе в комбинации со

20 стабилизирующими мутациями в соответствии с настоящим изобретением (Q55P, S62I и H108G). Результаты проведенных исследований показали, что разработанные мутеины с мутацией в положении S153 характеризуются как пониженной митогенностью, так и эффектом снижения уровня глюкозы в крови (S153A и S153R -

25 фигуры 7, 8, 17). Кроме того, варианты с множеством мутаций, дополнительно содержащие три стабилизирующие мутации, характеризуются высокой термической стабильностью, устойчивостью к протеолитической деградации и, как следствие, более длительным временем полужизни в организме.

Glu Cys Leu Phe Leu Glu Arg Leu Glu Glu Asn His Tyr Asn Thr Tyr
100 105 110
Ile Ser Lys Lys His Ala Glu Lys Asn Trp Phe Val Gly Leu Lys Lys
115 120 125
5 Asn Gly Ser Cys Lys Arg Gly Pro Arg Thr His Tyr Gly Gln Lys Ala
130 135 140
Ile Leu Phe Leu Pro Leu Pro Val Ser Ser Asp
145 150 155

- 10 <210> 2
<211> 136
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

- 15
<220>
<223> FGF1 (22 - 155 АК) - FGF1 (Δ 155 АК) - FGF_ Δ ДТ

<400> 2

20 Met Ala Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu Leu Tyr Cys Ser Asn Gly Gly
1 5 10 15
His Phe Leu Arg Ile Leu Pro Asp Gly Thr Val Asp Gly Thr Arg Asp
20 25 30
Arg Ser Asp Gln His Ile Gln Leu Gln Leu Ser Ala Glu Ser Val Gly
25 35 40 45
Glu Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu Thr Gly Gln Tyr Leu Ala Met Asp
50 55 60
Thr Asp Gly Leu Leu Tyr Gly Ser Gln Thr Pro Asn Glu Glu Cys Leu
65 70 75 80
30 Phe Leu Glu Arg Leu Glu Glu Asn His Tyr Asn Thr Tyr Ile Ser Lys
85 90 95
Lys His Ala Glu Lys Asn Trp Phe Val Gly Leu Lys Lys Asn Gly Ser
100 105 110
Cys Lys Arg Gly Pro Arg Thr His Tyr Gly Gln Lys Ala Ile Leu Phe

115 120 125
Leu Pro Leu Pro Val Ser Ser Asp
130 135

- 5 <210> 3
<211> 155
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

- 10
<220>
<223> FGF1 (155 AK; S114A) (M1)

<400> 3

15 Met Ala Glu Gly Glu Ile Thr Thr Phe Thr Ala Leu Thr Glu Lys Phe
1 5 10 15
Asn Leu Pro Pro Gly Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu Leu Tyr Cys Ser
20 25 30
Asn Gly Gly His Phe Leu Arg Ile Leu Pro Asp Gly Thr Val Asp Gly
20 35 40 45
Thr Arg Asp Arg Ser Asp Gln His Ile Gln Leu Gln Leu Ser Ala Glu
50 55 60
Ser Val Gly Glu Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu Thr Gly Gln Tyr Leu
65 70 75 80
25 Ala Met Asp Thr Asp Gly Leu Leu Tyr Gly Ser Gln Thr Pro Asn Glu
85 90 95
Glu Cys Leu Phe Leu Glu Arg Leu Glu Glu Asn His Tyr Asn Thr Tyr
100 105 110
Ile Ala Lys Lys His Ala Glu Lys Asn Trp Phe Val Gly Leu Lys Lys
30 115 120 125
Asn Gly Ser Cys Lys Arg Gly Pro Arg Thr His Tyr Gly Gln Lys Ala
130 135 140
Ile Leu Phe Leu Pro Leu Pro Val Ser Ser Asp
145 150 155

<210> 4

<211> 155

<212> ПРТ

5 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> FGF1 (155 АК; L150D) (M2)

10

<400> 4

Met Ala Glu Gly Glu Ile Thr Thr Phe Thr Ala Leu Thr Glu Lys Phe
1 5 10 15

Asn Leu Pro Pro Gly Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu Leu Tyr Cys Ser
15 20 25 30

Asn Gly Gly His Phe Leu Arg Ile Leu Pro Asp Gly Thr Val Asp Gly
35 40 45

Thr Arg Asp Arg Ser Asp Gln His Ile Gln Leu Gln Leu Ser Ala Glu
50 55 60

20 Ser Val Gly Glu Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu Thr Gly Gln Tyr Leu
65 70 75 80

Ala Met Asp Thr Asp Gly Leu Leu Tyr Gly Ser Gln Thr Pro Asn Glu
85 90 95

Glu Cys Leu Phe Leu Glu Arg Leu Glu Glu Asn His Tyr Asn Thr Tyr
25 100 105 110

Ile Ser Lys Lys His Ala Glu Lys Asn Trp Phe Val Gly Leu Lys Lys
115 120 125

Asn Gly Ser Cys Lys Arg Gly Pro Arg Thr His Tyr Gly Gln Lys Ala
130 135 140

30 Ile Leu Phe Leu Pro Asp Pro Val Ser Ser Asp
145 150 155

<210> 5

<211> 155

<220>

<223> FGF1 (155 AK; Q55P) (M4)

5 <400> 6

Met Ala Glu Gly Glu Ile Thr Thr Phe Thr Ala Leu Thr Glu Lys Phe
1 5 10 15

Asn Leu Pro Pro Gly Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu Leu Tyr Cys Ser
20 25 30

10 Asn Gly Gly His Phe Leu Arg Ile Leu Pro Asp Gly Thr Val Asp Gly
35 40 45

Thr Arg Asp Arg Ser Asp Pro His Ile Gln Leu Gln Leu Ser Ala Glu
50 55 60

Ser Val Gly Glu Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu Thr Gly Gln Tyr Leu
15 65 70 75 80

Ala Met Asp Thr Asp Gly Leu Leu Tyr Gly Ser Gln Thr Pro Asn Glu
85 90 95

Glu Cys Leu Phe Leu Glu Arg Leu Glu Glu Asn His Tyr Asn Thr Tyr
100 105 110

20 Ile Ser Lys Lys His Ala Glu Lys Asn Trp Phe Val Gly Leu Lys Lys
115 120 125

Asn Gly Ser Cys Lys Arg Gly Pro Arg Thr His Tyr Gly Gln Lys Ala
130 135 140

Ile Leu Phe Leu Pro Leu Pro Val Ser Ser Asp

25 145 150 155

<210> 7

<211> 155

<212> ПРТ

30 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> FGF1 (155 AK; S62I) (M5)

<400> 7

Met Ala Glu Gly Glu Ile Thr Thr Phe Thr Ala Leu Thr Glu Lys Phe
1 5 10 15
5 Asn Leu Pro Pro Gly Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu Leu Tyr Cys Ser
 20 25 30
Asn Gly Gly His Phe Leu Arg Ile Leu Pro Asp Gly Thr Val Asp Gly
 35 40 45
Thr Arg Asp Arg Ser Asp Gln His Ile Gln Leu Gln Leu Ile Ala Glu
10 50 55 60
Ser Val Gly Glu Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu Thr Gly Gln Tyr Leu
65 70 75 80
Ala Met Asp Thr Asp Gly Leu Leu Tyr Gly Ser Gln Thr Pro Asn Glu
 85 90 95
15 Glu Cys Leu Phe Leu Glu Arg Leu Glu Glu Asn His Tyr Asn Thr Tyr
 100 105 110
Ile Ser Lys Lys His Ala Glu Lys Asn Trp Phe Val Gly Leu Lys Lys
 115 120 125
Asn Gly Ser Cys Lys Arg Gly Pro Arg Thr His Tyr Gly Gln Lys Ala
20 130 135 140
Ile Leu Phe Leu Pro Leu Pro Val Ser Ser Asp
145 150 155

<210> 8

25 <211> 155

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

30 <220>

<223> FGF1 (155 AK; H108G) (M6)

<400> 8

Met Ala Glu Gly Glu Ile Thr Thr Phe Thr Ala Leu Thr Glu Lys Phe

Asn Gly Gly His Phe Leu Arg Ile Leu Pro Asp Gly Thr Val Asp Gly
35 40 45
Thr Arg Asp Arg Ser Asp Pro His Ile Gln Leu Gln Leu Ile Ala Glu
50 55 60
5 Ser Val Gly Glu Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu Thr Gly Gln Tyr Leu
65 70 75 80
Ala Met Asp Thr Asp Gly Leu Leu Tyr Gly Ser Gln Thr Pro Asn Glu
85 90 95
Glu Cys Leu Phe Leu Glu Arg Leu Glu Glu Asn Gly Tyr Asn Thr Tyr
10 100 105 110
Ile Ser Lys Lys His Ala Glu Lys Asn Trp Phe Val Gly Leu Lys Lys
115 120 125
Asn Gly Ser Cys Lys Arg Gly Pro Arg Thr His Tyr Gly Gln Lys Ala
130 135 140
15 Ile Leu Phe Leu Pro Leu Pro Val Ser Ser Asp
145 150 155

<210> 10

<211> 155

20 <212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

25 <223> FGF1 (155 AK; Q55P/S62I/H108G/S114A/L150D) (M8)

<400> 10

Met Ala Glu Gly Glu Ile Thr Thr Phe Thr Ala Leu Thr Glu Lys Phe
1 5 10 15
30 Asn Leu Pro Pro Gly Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu Leu Tyr Cys Ser
20 25 30
Asn Gly Gly His Phe Leu Arg Ile Leu Pro Asp Gly Thr Val Asp Gly
35 40 45
Thr Arg Asp Arg Ser Asp Pro His Ile Gln Leu Gln Leu Ile Ala Glu

50 55 60
Ser Val Gly Glu Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu Thr Gly Gln Tyr Leu
65 70 75 80
Ala Met Asp Thr Asp Gly Leu Leu Tyr Gly Ser Gln Thr Pro Asn Glu
5 85 90 95
Glu Cys Leu Phe Leu Glu Arg Leu Glu Glu Asn Gly Tyr Asn Thr Tyr
100 105 110
Ile Ala Lys Lys His Ala Glu Lys Asn Trp Phe Val Gly Leu Lys Lys
115 120 125
10 Asn Gly Ser Cys Lys Arg Gly Pro Arg Thr His Tyr Gly Gln Lys Ala
130 135 140
Ile Leu Phe Leu Pro Asp Pro Val Ser Ser Asp
145 150 155

15 <210> 11
<211> 136
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

20
<220>
<223> FGF1 (Δ 155 AK; S114A) (M9)

<400> 11
25 Met Ala Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu Leu Tyr Cys Ser Asn Gly Gly
1 5 10 15
His Phe Leu Arg Ile Leu Pro Asp Gly Thr Val Asp Gly Thr Arg Asp
20 25 30
Arg Ser Asp Gln His Ile Gln Leu Gln Leu Ser Ala Glu Ser Val Gly
30 35 40 45
Glu Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu Thr Gly Gln Tyr Leu Ala Met Asp
50 55 60
Thr Asp Gly Leu Leu Tyr Gly Ser Gln Thr Pro Asn Glu Glu Cys Leu
65 70 75 80

Phe Leu Glu Arg Leu Glu Glu Asn His Tyr Asn Thr Tyr Ile Ala Lys
85 90 95

Lys His Ala Glu Lys Asn Trp Phe Val Gly Leu Lys Lys Asn Gly Ser
100 105 110

5 Cys Lys Arg Gly Pro Arg Thr His Tyr Gly Gln Lys Ala Ile Leu Phe
115 120 125

Leu Pro Leu Pro Val Ser Ser Asp
130 135

10 <210> 12

<211> 136

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

15

<220>

<223> FGF1 (Δ 155 AK; L150D) (M10)

<400> 12

20 Met Ala Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu Leu Tyr Cys Ser Asn Gly Gly
1 5 10 15

His Phe Leu Arg Ile Leu Pro Asp Gly Thr Val Asp Gly Thr Arg Asp
20 25 30

Arg Ser Asp Gln His Ile Gln Leu Gln Leu Ser Ala Glu Ser Val Gly
25 35 40 45

Glu Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu Thr Gly Gln Tyr Leu Ala Met Asp
50 55 60

Thr Asp Gly Leu Leu Tyr Gly Ser Gln Thr Pro Asn Glu Glu Cys Leu
65 70 75 80

30 Phe Leu Glu Arg Leu Glu Glu Asn His Tyr Asn Thr Tyr Ile Ser Lys
85 90 95

Lys His Ala Glu Lys Asn Trp Phe Val Gly Leu Lys Lys Asn Gly Ser
100 105 110

Cys Lys Arg Gly Pro Arg Thr His Tyr Gly Gln Lys Ala Ile Leu Phe

115 120 125
Leu Pro Asp Pro Val Ser Ser Asp
130 135

- 5 <210> 13
<211> 136
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

10

- <220>
<223> FGF1 (Δ 155 AK; S114A/L150D) (M11)

<400> 13

15 Met Ala Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu Leu Tyr Cys Ser Asn Gly Gly
1 5 10 15
His Phe Leu Arg Ile Leu Pro Asp Gly Thr Val Asp Gly Thr Arg Asp
20 25 30
Arg Ser Asp Gln His Ile Gln Leu Gln Leu Ser Ala Glu Ser Val Gly
20 35 40 45
Glu Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu Thr Gly Gln Tyr Leu Ala Met Asp
50 55 60
Thr Asp Gly Leu Leu Tyr Gly Ser Gln Thr Pro Asn Glu Glu Cys Leu
65 70 75 80
25 Phe Leu Glu Arg Leu Glu Glu Asn His Tyr Asn Thr Tyr Ile Ala Lys
85 90 95
Lys His Ala Glu Lys Asn Trp Phe Val Gly Leu Lys Lys Asn Gly Ser
100 105 110
Cys Lys Arg Gly Pro Arg Thr His Tyr Gly Gln Lys Ala Ile Leu Phe
30 115 120 125
Leu Pro Asp Pro Val Ser Ser Asp
130 135

<210> 14

<220>

<223> FGF1 (Δ 155 AK; S62I) (M13)

<400> 15

5 Met Ala Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu Leu Tyr Cys Ser Asn Gly Gly
1 5 10 15
His Phe Leu Arg Ile Leu Pro Asp Gly Thr Val Asp Gly Thr Arg Asp
 20 25 30
Arg Ser Asp Gln His Ile Gln Leu Gln Leu Ile Ala Glu Ser Val Gly
10 35 40 45
Glu Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu Thr Gly Gln Tyr Leu Ala Met Asp
 50 55 60
Thr Asp Gly Leu Leu Tyr Gly Ser Gln Thr Pro Asn Glu Glu Cys Leu
65 70 75 80
15 Phe Leu Glu Arg Leu Glu Glu Asn His Tyr Asn Thr Tyr Ile Ser Lys
 85 90 95
Lys His Ala Glu Lys Asn Trp Phe Val Gly Leu Lys Lys Asn Gly Ser
 100 105 110
Cys Lys Arg Gly Pro Arg Thr His Tyr Gly Gln Lys Ala Ile Leu Phe
20 115 120 125
Leu Pro Leu Pro Val Ser Ser Asp
 130 135

<210> 16

25 <211> 136

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

30 <220>

<223> FGF1 (Δ 155 AK; H108G) (M14)

<400> 16

Met Ala Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu Leu Tyr Cys Ser Asn Gly Gly

Glu Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu Thr Gly Gln Tyr Leu Ala Met Asp
50 55 60
Thr Asp Gly Leu Leu Tyr Gly Ser Gln Thr Pro Asn Glu Glu Cys Leu
65 70 75 80
5 Phe Leu Glu Arg Leu Glu Glu Asn Gly Tyr Asn Thr Tyr Ile Ser Lys
85 90 95
Lys His Ala Glu Lys Asn Trp Phe Val Gly Leu Lys Lys Asn Gly Ser
100 105 110
Cys Lys Arg Gly Pro Arg Thr His Tyr Gly Gln Lys Ala Ile Leu Phe
10 115 120 125
Leu Pro Leu Pro Val Ser Ser Asp
130 135

<210> 18

15 <211> 136

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

20 <220>

<223> FGF1 (Δ 155 AK; Q55P/S62I/H108G/S114A/L150D) (M16)

<400> 18

Met Ala Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu Leu Tyr Cys Ser Asn Gly Gly
25 1 5 10 15
His Phe Leu Arg Ile Leu Pro Asp Gly Thr Val Asp Gly Thr Arg Asp
20 25 30
Arg Ser Asp Pro His Ile Gln Leu Gln Leu Ile Ala Glu Ser Val Gly
35 40 45
30 Glu Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu Thr Gly Gln Tyr Leu Ala Met Asp
50 55 60
Thr Asp Gly Leu Leu Tyr Gly Ser Gln Thr Pro Asn Glu Glu Cys Leu
65 70 75 80
Phe Leu Glu Arg Leu Glu Glu Asn Gly Tyr Asn Thr Tyr Ile Ala Lys

85 90 95
Lys His Ala Glu Lys Asn Trp Phe Val Gly Leu Lys Lys Asn Gly Ser
100 105 110
Cys Lys Arg Gly Pro Arg Thr His Tyr Gly Gln Lys Ala Ile Leu Phe
5 115 120 125
Leu Pro Asp Pro Val Ser Ser Asp
130 135

<210> 19

10 <211> 322

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

15 <220>

<223> FGF1_Димер (155 АК) (FGF1_ДТ_Димер)

<400> 19

Met Ala Glu Gly Glu Ile Thr Thr Phe Thr Ala Leu Thr Glu Lys Phe
20 1 5 10 15
Asn Leu Pro Pro Gly Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu Leu Tyr Cys Ser
20 25 30
Asn Gly Gly His Phe Leu Arg Ile Leu Pro Asp Gly Thr Val Asp Gly
35 40 45
25 Thr Arg Asp Arg Ser Asp Gln His Ile Gln Leu Gln Leu Ser Ala Glu
50 55 60
Ser Val Gly Glu Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu Thr Gly Gln Tyr Leu
65 70 75 80
Ala Met Asp Thr Asp Gly Leu Leu Tyr Gly Ser Gln Thr Pro Asn Glu
30 85 90 95
Glu Cys Leu Phe Leu Glu Arg Leu Glu Glu Asn His Tyr Asn Thr Tyr
100 105 110
Ile Ser Lys Lys His Ala Glu Lys Asn Trp Phe Val Gly Leu Lys Lys
115 120 125

Asn Gly Ser Cys Lys Arg Gly Pro Arg Thr His Tyr Gly Gln Lys Ala
130 135 140
Ile Leu Phe Leu Pro Leu Pro Val Ser Ser Asp Gly Gly Gly Gly Ser
145 150 155 160
5 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ala Glu Gly Glu Ile Thr Thr
165 170 175
Phe Thr Ala Leu Thr Glu Lys Phe Asn Leu Pro Pro Asn Tyr Lys Lys
180 185 190
Pro Lys Leu Leu Tyr Cys Ser Asn Gly Gly His Phe Leu Arg Ile Leu
10 195 200 205
Pro Asp Gly Thr Val Asp Gly Thr Arg Asp Arg Ser Asp Gln His Ile
210 215 220
Gln Leu Gln Leu Ser Ala Glu Ser Val Gly Glu Val Tyr Ile Lys Ser
225 230 235 240
15 Thr Glu Thr Gly Gln Tyr Leu Ala Met Asp Thr Asp Gly Leu Leu Tyr
245 250 255
Gly Ser Gln Thr Pro Asn Glu Glu Cys Leu Phe Leu Glu Arg Leu Glu
260 265 270
Glu Asn His Tyr Asn Thr Tyr Ile Ser Lys Lys His Ala Glu Lys Asn
20 275 280 285
Trp Phe Val Gly Leu Lys Lys Asn Gly Ser Cys Lys Arg Gly Pro Arg
290 295 300
Thr His Tyr Gly Gln Lys Ala Ile Leu Phe Leu Pro Leu Pro Val Ser
305 310 315 320
25 Ser Asp

<210> 20

<211> 285

30 <212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> FGF1_Димер (Δ155 АК) (FGF1_ΔДТ_Димер)

<400> 20

Met Ala Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu Leu Tyr Cys Ser Asn Gly Gly
5 1 5 10 15
His Phe Leu Arg Ile Leu Pro Asp Gly Thr Val Asp Gly Thr Arg Asp
20 25 30
Arg Ser Asp Gln His Ile Gln Leu Gln Leu Ser Ala Glu Ser Val Gly
35 40 45
10 Glu Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu Thr Gly Gln Tyr Leu Ala Met Asp
50 55 60
Thr Asp Gly Leu Leu Tyr Gly Ser Gln Thr Pro Asn Glu Glu Cys Leu
65 70 75 80
Phe Leu Glu Arg Leu Glu Glu Asn His Tyr Asn Thr Tyr Ile Ser Lys
15 85 90 95
Lys His Ala Glu Lys Asn Trp Phe Val Gly Leu Lys Lys Asn Gly Ser
100 105 110
Cys Lys Arg Gly Pro Arg Thr His Tyr Gly Gln Lys Ala Ile Leu Phe
115 120 125
20 Leu Pro Leu Pro Val Ser Ser Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
130 135 140
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ala Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu Leu Tyr
145 150 155 160
Cys Ser Asn Gly Gly His Phe Leu Arg Ile Leu Pro Asp Gly Thr Val
25 165 170 175
Asp Gly Thr Arg Asp Arg Ser Asp Gln His Ile Gln Leu Gln Leu Ser
180 185 190
Ala Glu Ser Val Gly Glu Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu Thr Gly Gln
195 200 205
30 Tyr Leu Ala Met Asp Thr Asp Gly Leu Leu Tyr Gly Ser Gln Thr Pro
210 215 220
Asn Glu Glu Cys Leu Phe Leu Glu Arg Leu Glu Glu Asn His Tyr Asn
225 230 235 240
Thr Tyr Ile Ser Lys Lys His Ala Glu Lys Asn Trp Phe Val Gly Leu

245 250 255
Lys Lys Asn Gly Ser Cys Lys Arg Gly Pro Arg Thr His Tyr Gly Gln
260 265 270
Lys Ala Ile Leu Phe Leu Pro Leu Pro Val Ser Ser Asp
5 275 280 285

<210> 21
<211> 322
<212> ПРТ
10 <213> Искусственная последовательность

<220>
<223> FGF1_M8_Димер (155 АК)

15
<400> 21
Met Ala Glu Gly Glu Ile Thr Thr Phe Thr Ala Leu Thr Glu Lys Phe
1 5 10 15
Asn Leu Pro Pro Gly Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu Leu Tyr Cys Ser
20 20 25 30
Asn Gly Gly His Phe Leu Arg Ile Leu Pro Asp Gly Thr Val Asp Gly
35 40 45
Thr Arg Asp Arg Ser Asp Pro His Ile Gln Leu Gln Leu Ile Ala Glu
50 55 60
25 Ser Val Gly Glu Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu Thr Gly Gln Tyr Leu
65 70 75 80
Ala Met Asp Thr Asp Gly Leu Leu Tyr Gly Ser Gln Thr Pro Asn Glu
85 90 95
Glu Cys Leu Phe Leu Glu Arg Leu Glu Glu Asn Gly Tyr Asn Thr Tyr
30 100 105 110
Ile Ala Lys Lys His Ala Glu Lys Asn Trp Phe Val Gly Leu Lys Lys
115 120 125
Asn Gly Ser Cys Lys Arg Gly Pro Arg Thr His Tyr Gly Gln Lys Ala
130 135 140

<400> 22

Met Ala Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu Leu Tyr Cys Ser Asn Gly Gly
1 5 10 15
His Phe Leu Arg Ile Leu Pro Asp Gly Thr Val Asp Gly Thr Arg Asp
5 20 25 30
Arg Ser Asp Pro His Ile Gln Leu Gln Leu Ile Ala Glu Ser Val Gly
 35 40 45
Glu Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu Thr Gly Gln Tyr Leu Ala Met Asp
 50 55 60
10 Thr Asp Gly Leu Leu Tyr Gly Ser Gln Thr Pro Asn Glu Glu Cys Leu
65 70 75 80
Phe Leu Glu Arg Leu Glu Glu Asn Gly Tyr Asn Thr Tyr Ile Ala Lys
 85 90 95
Lys His Ala Glu Lys Asn Trp Phe Val Gly Leu Lys Lys Asn Gly Ser
15 100 105 110
Cys Lys Arg Gly Pro Arg Thr His Tyr Gly Gln Lys Ala Ile Leu Phe
 115 120 125
Leu Pro Asp Pro Val Ser Ser Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 130 135 140
20 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ala Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu Leu Tyr
145 150 155 160
Cys Ser Asn Gly Gly His Phe Leu Arg Ile Leu Pro Asp Gly Thr Val
 165 170 175
Asp Gly Thr Arg Asp Arg Ser Asp Pro His Ile Gln Leu Gln Leu Ile
25 180 185 190
Ala Glu Ser Val Gly Glu Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu Thr Gly Gln
 195 200 205
Tyr Leu Ala Met Asp Thr Asp Gly Leu Leu Tyr Gly Ser Gln Thr Pro
 210 215 220
30 Asn Glu Glu Cys Leu Phe Leu Glu Arg Leu Glu Glu Asn Gly Tyr Asn
225 230 235 240
Thr Tyr Ile Ala Lys Lys His Ala Glu Lys Asn Trp Phe Val Gly Leu
 245 250 255
Lys Lys Asn Gly Ser Cys Lys Arg Gly Pro Arg Thr His Tyr Gly Gln

260 265 270
Lys Ala Ile Leu Phe Leu Pro Asp Pro Val Ser Ser Asp
275 280 285

- 5 <210> 23
<211> 155
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

10

- <220>
<223> FGF1_M (155 АК)

<400> 23

15 Met Ala Glu Gly Glu Ile Thr Thr Phe Thr Ala Leu Thr Glu Lys Phe
1 5 10 15
Asn Leu Pro Pro Gly Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu Leu Tyr Cys Ser
20 25 30
Asn Gly Gly His Phe Leu Arg Ile Leu Pro Asp Gly Thr Val Asp Gly
20 35 40 45
Thr Arg Asp Arg Ser Asp Pro His Ile Gln Leu Gln Leu Ile Ala Glu
50 55 60
Ser Val Gly Glu Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu Thr Gly Gln Tyr Leu
65 70 75 80
25 Ala Met Asp Thr Asp Gly Leu Leu Tyr Gly Ser Gln Thr Pro Asn Glu
85 90 95
Glu Cys Leu Phe Leu Glu Arg Leu Glu Glu Asn Gly Tyr Asn Thr Tyr
100 105 110
Ile Ser Lys Lys His Ala Glu Lys Asn Trp Phe Val Gly Leu Lys Lys
30 115 120 125
Asn Gly Ser Cys Lys Arg Gly Pro Arg Thr His Tyr Gly Gln Lys Ala
130 135 140
Ile Leu Phe Leu Pro Leu Pro Val Ala Ser Asp
145 150 155

<210> 24

<211> 136

<212> ПРТ

5 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> FGF1_M (Δ 155 AK)

10

<400> 24

Met Ala Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu Leu Tyr Cys Ser Asn Gly Gly

1 5 10 15

His Phe Leu Arg Ile Leu Pro Asp Gly Thr Val Asp Gly Thr Arg Asp

15 20 25 30

Arg Ser Asp Pro His Ile Gln Leu Gln Leu Ile Ala Glu Ser Val Gly

35 40 45

Glu Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu Thr Gly Gln Tyr Leu Ala Met Asp

50 55 60

20 Thr Asp Gly Leu Leu Tyr Gly Ser Gln Thr Pro Asn Glu Glu Cys Leu

65 70 75 80

Phe Leu Glu Arg Leu Glu Glu Asn Gly Tyr Asn Thr Tyr Ile Ser Lys

85 90 95

Lys His Ala Glu Lys Asn Trp Phe Val Gly Leu Lys Lys Asn Gly Ser

25 100 105 110

Cys Lys Arg Gly Pro Arg Thr His Tyr Gly Gln Lys Ala Ile Leu Phe

115 120 125

Leu Pro Leu Pro Val Ala Ser Asp

130 135

30

<210> 25

<211> 155

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<223> FGF1_M (Δ 155 AK)

<400> 26

Met Ala Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu Leu Tyr Cys Ser Asn Gly Gly
5 1 5 10 15
His Phe Leu Arg Ile Leu Pro Asp Gly Thr Val Asp Gly Thr Arg Asp
20 25 30
Arg Ser Asp Pro His Ile Gln Leu Gln Leu Ile Ala Glu Ser Val Gly
35 40 45
10 Glu Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu Thr Gly Gln Tyr Leu Ala Met Asp
50 55 60
Thr Asp Gly Leu Leu Tyr Gly Ser Gln Thr Pro Asn Glu Glu Cys Leu
65 70 75 80
Phe Leu Glu Arg Leu Glu Glu Asn Gly Tyr Asn Thr Tyr Ile Ser Lys
15 85 90 95
Lys His Ala Glu Lys Asn Trp Phe Val Gly Leu Lys Lys Asn Gly Ser
100 105 110
Cys Lys Arg Gly Pro Arg Thr His Tyr Gly Gln Lys Ala Ile Leu Phe
115 120 125
20 Leu Pro Leu Pro Val Arg Ser Asp
130 135

<210> 27

<211> 155

25 <212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

30 <223> FGF1_M (155 AK)

<400> 27

Met Ala Glu Gly Glu Ile Thr Thr Phe Thr Ala Leu Thr Glu Lys Phe
1 5 10 15

Asn Leu Pro Pro Gly Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu Leu Tyr Cys Ser
20 25 30
Asn Gly Gly His Phe Leu Arg Ile Leu Pro Asp Gly Thr Val Asp Gly
35 40 45
5 Thr Arg Asp Arg Ser Asp Gln His Ile Gln Leu Gln Leu Ser Ala Glu
50 55 60
Ser Val Gly Glu Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu Thr Gly Gln Tyr Leu
65 70 75 80
Ala Met Asp Thr Asp Gly Leu Leu Tyr Gly Ser Gln Thr Pro Asn Glu
10 85 90 95
Glu Cys Leu Phe Leu Glu Arg Leu Glu Glu Asn His Tyr Asn Thr Tyr
100 105 110
Ile Ser Lys Lys His Ala Glu Lys Asn Trp Phe Val Gly Leu Lys Lys
115 120 125
15 Asn Gly Ser Cys Lys Arg Gly Pro Arg Thr His Tyr Gly Gln Lys Ala
130 135 140
Ile Leu Phe Leu Pro Leu Pro Val Asp Asp Asp
145 150 155

20 <210> 28
<211> 136
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

25
<220>
<223> FGF1_M (Δ 155 AK)

<400> 28

30 Met Ala Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu Leu Tyr Cys Ser Asn Gly Gly
1 5 10 15
His Phe Leu Arg Ile Leu Pro Asp Gly Thr Val Asp Gly Thr Arg Asp
20 25 30
Arg Ser Asp Gln His Ile Gln Leu Gln Leu Ser Ala Glu Ser Val Gly

35 40 45
Glu Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu Thr Gly Gln Tyr Leu Ala Met Asp
50 55 60
Thr Asp Gly Leu Leu Tyr Gly Ser Gln Thr Pro Asn Glu Glu Cys Leu
5 65 70 75 80
Phe Leu Glu Arg Leu Glu Glu Asn His Tyr Asn Thr Tyr Ile Ser Lys
85 90 95
Lys His Ala Glu Lys Asn Trp Phe Val Gly Leu Lys Lys Asn Gly Ser
100 105 110
10 Cys Lys Arg Gly Pro Arg Thr His Tyr Gly Gln Lys Ala Ile Leu Phe
115 120 125
Leu Pro Leu Pro Val Asp Asp Asp
130 135

15 <210> 29
<211> 155
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

20
<220>
<223> FGF1_M (155 AK)

<400> 29
25 Met Ala Glu Gly Glu Ile Thr Thr Phe Thr Ala Leu Thr Glu Lys Phe
1 5 10 15
Asn Leu Pro Pro Gly Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu Leu Tyr Cys Ser
20 25 30
Asn Gly Gly His Phe Leu Arg Ile Leu Pro Asp Gly Thr Val Asp Gly
30 35 40 45
Thr Arg Asp Arg Ser Asp Gln His Ile Gln Leu Gln Leu Ser Ala Glu
50 55 60
Ser Val Gly Glu Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu Thr Gly Gln Tyr Leu
65 70 75 80

Ala Met Asp Thr Asp Gly Leu Leu Tyr Gly Ser Gln Thr Pro Asn Glu
85 90 95
Glu Cys Leu Phe Leu Glu Arg Leu Glu Glu Asn His Tyr Asn Thr Tyr
100 105 110
5 Ile Ser Lys Lys His Ala Glu Lys Asn Trp Phe Val Gly Leu Lys Lys
115 120 125
Asn Gly Ser Cys Lys Arg Gly Pro Arg Thr His Tyr Gly Gln Lys Ala
130 135 140
Ile Leu Phe Leu Pro Leu Pro Val Asp Asp Asp
10 145 150 155

<210> 30

<211> 136

<212> ПРТ

15 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> FGF1_M (Δ 155 AK)

20

<400> 30

Met Ala Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu Leu Tyr Cys Ser Asn Gly Gly
1 5 10 15
His Phe Leu Arg Ile Leu Pro Asp Gly Thr Val Asp Gly Thr Arg Asp
25 20 25 30
Arg Ser Asp Pro His Ile Gln Leu Gln Leu Ile Ala Glu Ser Val Gly
35 40 45
Glu Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu Thr Gly Gln Tyr Leu Ala Met Asp
50 55 60
30 Thr Asp Gly Leu Leu Tyr Gly Ser Gln Thr Pro Asn Glu Glu Cys Leu
65 70 75 80
Phe Leu Glu Arg Leu Glu Glu Asn Gly Tyr Asn Thr Tyr Ile Ser Lys
85 90 95
Lys His Ala Glu Lys Asn Trp Phe Val Gly Leu Lys Lys Asn Gly Ser

100 105 110
Cys Lys Arg Gly Pro Arg Thr His Tyr Gly Gln Lys Ala Ile Leu Phe
115 120 125
Leu Pro Leu Pro Val Asp Asp Asp
5 130 135

<210> 31
<211> 155
<212> ПРТ

10 <213> Искусственная последовательность

<220>
<223> FGF1 (1 - 155 AK) FGF1_M (155 AK)

15

<400> 31
Met Ala Glu Gly Glu Ile Thr Thr Phe Thr Ala Leu Thr Glu Lys Phe
1 5 10 15
Asn Leu Pro Pro Gly Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu Leu Tyr Cys Ser
20 20 25 30
Asn Gly Gly His Phe Leu Arg Ile Leu Pro Asp Gly Thr Val Asp Gly
35 40 45
Thr Arg Asp Arg Ser Asp Gln His Ile Gln Leu Gln Leu Ser Ala Glu
50 55 60
25 Ser Val Gly Glu Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu Thr Gly Gln Tyr Leu
65 70 75 80
Ala Met Asp Thr Asp Gly Leu Leu Tyr Gly Ser Gln Thr Pro Asn Glu
85 90 95
Glu Cys Leu Phe Leu Glu Arg Leu Glu Glu Asn His Tyr Asn Thr Tyr
30 100 105 110
Ile Ser Lys Lys His Ala Glu Lys Asn Trp Phe Val Gly Leu Lys Lys
115 120 125
Asn Gly Ser Cys Lys Arg Gly Pro Arg Thr His Tyr Gly Gln Lys Ala
130 135 140

<210> 33
<211> 136
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

5

<220>
<223> FGF1 (22 - 155 АК) FGF1_M (Δ 155 АК)

10 <400> 33

Met	Ala	Asn	Tyr	Lys	Lys	Pro	Lys	Leu	Leu	Tyr	Cys	Ser	Asn	Gly	Gly	
1				5				10						15		
His	Phe	Leu	Arg	Ile	Leu	Pro	Asp	Gly	Thr	Val	Asp	Gly	Thr	Arg	Asp	
			20					25					30			
15	Arg	Ser	Asp	Gln	His	Ile	Gln	Leu	Gln	Leu	Ser	Ala	Glu	Ser	Val	Gly
			35					40					45			
	Glu	Val	Tyr	Ile	Lys	Ser	Thr	Glu	Thr	Gly	Gln	Tyr	Leu	Ala	Met	Asp
		50						55				60				
	Thr	Asp	Gly	Leu	Leu	Tyr	Gly	Ser	Gln	Thr	Pro	Asn	Glu	Glu	Cys	Leu
20	65					70					75					80
	Phe	Leu	Glu	Arg	Leu	Glu	Glu	Asn	His	Tyr	Asn	Thr	Tyr	Ile	Ser	Lys
					85						90				95	
	Lys	His	Ala	Glu	Lys	Asn	Trp	Phe	Val	Gly	Leu	Lys	Lys	Asn	Gly	Ser
				100						105					110	
25	Cys	Lys	Arg	Gly	Pro	Arg	Thr	His	Tyr	Gly	Gln	Lys	Ala	Ile	Leu	Phe
				115						120					125	
	Leu	Pro	Leu	Pro	Val	Arg	Ser	Asp								
			130													135

30 <210> 34

<211> 136
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> FGF1 (22 - 155 AK) FGF1_M (Δ 155 AK)

5 <400> 34

Met Ala Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu Leu Tyr Cys Ser Asn Gly Gly
1 5 10 15

His Phe Leu Arg Ile Leu Pro Asp Gly Thr Val Asp Gly Thr Arg Asp
20 25 30

10 Arg Ser Asp Gln His Ile Gln Leu Gln Leu Ser Ala Glu Ser Val Gly
35 40 45

Glu Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu Thr Gly Gln Tyr Leu Ala Met Asp
50 55 60

Thr Asp Gly Leu Leu Tyr Gly Ser Gln Thr Pro Asn Glu Glu Cys Leu
15 65 70 75 80

Phe Leu Glu Arg Leu Glu Glu Asn His Tyr Asn Thr Tyr Ile Ser Lys
85 90 95

Lys His Ala Glu Lys Asn Trp Phe Val Gly Leu Lys Lys Asn Gly Ser
100 105 110

20 Cys Lys Arg Gly Pro Arg Thr His Tyr Gly Gln Lys Ala Ile Leu Phe
115 120 125

Leu Pro Leu Pro Val Ala Ser Asp
130 135

25 <210> 35

<211> 322

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

30

<220>

<223> FGF1 (1 - 155 AK) FGF1_Димер (155 AK)

<400> 35

Met Ala Glu Gly Glu Ile Thr Thr Phe Thr Ala Leu Thr Glu Lys Phe
1 5 10 15
Asn Leu Pro Pro Gly Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu Leu Tyr Cys Ser
 20 25 30
5 Asn Gly Gly His Phe Leu Arg Ile Leu Pro Asp Gly Thr Val Asp Gly
 35 40 45
Thr Arg Asp Arg Ser Asp Gln His Ile Gln Leu Gln Leu Ser Ala Glu
 50 55 60
Ser Val Gly Glu Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu Thr Gly Gln Tyr Leu
10 65 70 75 80
Ala Met Asp Thr Asp Gly Leu Leu Tyr Gly Ser Gln Thr Pro Asn Glu
 85 90 95
Glu Cys Leu Phe Leu Glu Arg Leu Glu Glu Asn His Tyr Asn Thr Tyr
 100 105 110
15 Ile Ser Lys Lys His Ala Glu Lys Asn Trp Phe Val Gly Leu Lys Lys
 115 120 125
Asn Gly Ser Cys Lys Arg Gly Pro Arg Thr His Tyr Gly Gln Lys Ala
 130 135 140
Ile Leu Phe Leu Pro Leu Pro Val Arg Ser Asp Gly Gly Gly Gly Ser
20 145 150 155 160
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ala Glu Gly Glu Ile Thr Thr
 165 170 175
Phe Thr Ala Leu Thr Glu Lys Phe Asn Leu Pro Pro Asn Tyr Lys Lys
 180 185 190
25 Pro Lys Leu Leu Tyr Cys Ser Asn Gly Gly His Phe Leu Arg Ile Leu
 195 200 205
Pro Asp Gly Thr Val Asp Gly Thr Arg Asp Arg Ser Asp Gln His Ile
 210 215 220
Gln Leu Gln Leu Ser Ala Glu Ser Val Gly Glu Val Tyr Ile Lys Ser
30 225 230 235 240
Thr Glu Thr Gly Gln Tyr Leu Ala Met Asp Thr Asp Gly Leu Leu Tyr
 245 250 255
Gly Ser Gln Thr Pro Asn Glu Glu Cys Leu Phe Leu Glu Arg Leu Glu
 260 265 270

Glu Asn His Tyr Asn Thr Tyr Ile Ser Lys Lys His Ala Glu Lys Asn
275 280 285
Trp Phe Val Gly Leu Lys Lys Asn Gly Ser Cys Lys Arg Gly Pro Arg
290 295 300
5 Thr His Tyr Gly Gln Lys Ala Ile Leu Phe Leu Pro Leu Pro Val Arg
305 310 315 320
Ser Asp

10 <210> 36
<211> 322
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

15
<220>
<223> FGF1 (1 - 155 АК) FGF1_Димер (155 АК)

<400> 36

20 Met Ala Glu Gly Glu Ile Thr Thr Phe Thr Ala Leu Thr Glu Lys Phe
1 5 10 15
Asn Leu Pro Pro Gly Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu Leu Tyr Cys Ser
20 25 30
Asn Gly Gly His Phe Leu Arg Ile Leu Pro Asp Gly Thr Val Asp Gly
25 35 40 45
Thr Arg Asp Arg Ser Asp Gln His Ile Gln Leu Gln Leu Ser Ala Glu
50 55 60
Ser Val Gly Glu Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu Thr Gly Gln Tyr Leu
65 70 75 80
30 Ala Met Asp Thr Asp Gly Leu Leu Tyr Gly Ser Gln Thr Pro Asn Glu
85 90 95
Glu Cys Leu Phe Leu Glu Arg Leu Glu Glu Asn His Tyr Asn Thr Tyr
100 105 110
Ile Ser Lys Lys His Ala Glu Lys Asn Trp Phe Val Gly Leu Lys Lys

		115					120					125				
	Asn	Gly	Ser	Cys	Lys	Arg	Gly	Pro	Arg	Thr	His	Tyr	Gly	Gln	Lys	Ala
		130					135					140				
	Ile	Leu	Phe	Leu	Pro	Leu	Pro	Val	Ala	Ser	Asp	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
5	145						150					155				160
	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Glu	Gly	Glu	Ile	Thr	Thr
					165					170					175	
	Phe	Thr	Ala	Leu	Thr	Glu	Lys	Phe	Asn	Leu	Pro	Pro	Asn	Tyr	Lys	Lys
				180					185					190		
10	Pro	Lys	Leu	Leu	Tyr	Cys	Ser	Asn	Gly	Gly	His	Phe	Leu	Arg	Ile	Leu
				195					200					205		
	Pro	Asp	Gly	Thr	Val	Asp	Gly	Thr	Arg	Asp	Arg	Ser	Asp	Gln	His	Ile
		210					215					220				
	Gln	Leu	Gln	Leu	Ser	Ala	Glu	Ser	Val	Gly	Glu	Val	Tyr	Ile	Lys	Ser
15	225					230					235					240
	Thr	Glu	Thr	Gly	Gln	Tyr	Leu	Ala	Met	Asp	Thr	Asp	Gly	Leu	Leu	Tyr
					245					250					255	
	Gly	Ser	Gln	Thr	Pro	Asn	Glu	Glu	Cys	Leu	Phe	Leu	Glu	Arg	Leu	Glu
				260					265					270		
20	Glu	Asn	His	Tyr	Asn	Thr	Tyr	Ile	Ser	Lys	Lys	His	Ala	Glu	Lys	Asn
			275						280					285		
	Trp	Phe	Val	Gly	Leu	Lys	Lys	Asn	Gly	Ser	Cys	Lys	Arg	Gly	Pro	Arg
		290					295					300				
	Thr	His	Tyr	Gly	Gln	Lys	Ala	Ile	Leu	Phe	Leu	Pro	Leu	Pro	Val	Ala
25	305					310					315					320
	Ser	Asp														

<210> 37

30 <211> 285

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> FGF1 (22 - 155 АК) FGF1_Димер (Δ155 АК)

<400> 37

5 Met Ala Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu Leu Tyr Cys Ser Asn Gly Gly
1 5 10 15
His Phe Leu Arg Ile Leu Pro Asp Gly Thr Val Asp Gly Thr Arg Asp
 20 25 30
Arg Ser Asp Gln His Ile Gln Leu Gln Leu Ser Ala Glu Ser Val Gly
10 35 40 45
Glu Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu Thr Gly Gln Tyr Leu Ala Met Asp
 50 55 60
Thr Asp Gly Leu Leu Tyr Gly Ser Gln Thr Pro Asn Glu Glu Cys Leu
65 70 75 80
15 Phe Leu Glu Arg Leu Glu Glu Asn His Tyr Asn Thr Tyr Ile Ser Lys
 85 90 95
Lys His Ala Glu Lys Asn Trp Phe Val Gly Leu Lys Lys Asn Gly Ser
 100 105 110
Cys Lys Arg Gly Pro Arg Thr His Tyr Gly Gln Lys Ala Ile Leu Phe
20 115 120 125
Leu Pro Leu Pro Val Arg Ser Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 130 135 140
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ala Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu Leu Tyr
145 150 155 160
25 Cys Ser Asn Gly Gly His Phe Leu Arg Ile Leu Pro Asp Gly Thr Val
 165 170 175
Asp Gly Thr Arg Asp Arg Ser Asp Gln His Ile Gln Leu Gln Leu Ser
 180 185 190
Ala Glu Ser Val Gly Glu Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu Thr Gly Gln
30 195 200 205
Tyr Leu Ala Met Asp Thr Asp Gly Leu Leu Tyr Gly Ser Gln Thr Pro
 210 215 220
Asn Glu Glu Cys Leu Phe Leu Glu Arg Leu Glu Glu Asn His Tyr Asn
225 230 235 240

Thr Tyr Ile Ser Lys Lys His Ala Glu Lys Asn Trp Phe Val Gly Leu
245 250 255
Lys Lys Asn Gly Ser Cys Lys Arg Gly Pro Arg Thr His Tyr Gly Gln
260 265 270
5 Lys Ala Ile Leu Phe Leu Pro Leu Pro Val Arg Ser Asp
275 280 285

<210> 38

<211> 285

10 <212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

15 <223> FGF1 (22 - 155 АК) FGF1_Димер (Δ155 АК)

<400> 38

Met Ala Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu Leu Tyr Cys Ser Asn Gly Gly
1 5 10 15
20 His Phe Leu Arg Ile Leu Pro Asp Gly Thr Val Asp Gly Thr Arg Asp
20 25 30
Arg Ser Asp Gln His Ile Gln Leu Gln Leu Ser Ala Glu Ser Val Gly
35 40 45
Glu Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu Thr Gly Gln Tyr Leu Ala Met Asp
25 50 55 60
Thr Asp Gly Leu Leu Tyr Gly Ser Gln Thr Pro Asn Glu Glu Cys Leu
65 70 75 80
Phe Leu Glu Arg Leu Glu Glu Asn His Tyr Asn Thr Tyr Ile Ser Lys
85 90 95
30 Lys His Ala Glu Lys Asn Trp Phe Val Gly Leu Lys Lys Asn Gly Ser
100 105 110
Cys Lys Arg Gly Pro Arg Thr His Tyr Gly Gln Lys Ala Ile Leu Phe
115 120 125
Leu Pro Leu Pro Val Ala Ser Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

130 135 140
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ala Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu Leu Tyr
145 150 155 160
Cys Ser Asn Gly Gly His Phe Leu Arg Ile Leu Pro Asp Gly Thr Val
5 165 170 175
Asp Gly Thr Arg Asp Arg Ser Asp Gln His Ile Gln Leu Gln Leu Ser
180 185 190
Ala Glu Ser Val Gly Glu Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu Thr Gly Gln
195 200 205
10 Tyr Leu Ala Met Asp Thr Asp Gly Leu Leu Tyr Gly Ser Gln Thr Pro
210 215 220
Asn Glu Glu Cys Leu Phe Leu Glu Arg Leu Glu Glu Asn His Tyr Asn
225 230 235 240
Thr Tyr Ile Ser Lys Lys His Ala Glu Lys Asn Trp Phe Val Gly Leu
15 245 250 255
Lys Lys Asn Gly Ser Cys Lys Arg Gly Pro Arg Thr His Tyr Gly Gln
260 265 270
Lys Ala Ile Leu Phe Leu Pro Leu Pro Val Ala Ser Asp
275 280 285
20

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Мутеин фактора роста фибробластов 1 (FGF-1) человека с пониженной митогенностью, характеризующийся тем, что он содержит две точечные мутации: в положении аминокислоты S153, причем нумерация положений аминокислот основана на полноразмерной последовательности белка FGF-1 дикого типа, представленной в Последовательности № 1.
2. Мутеин FGF-1 человека по п. 1, характеризующийся тем, что точечная мутация в положении S153 представляет собой мутацию S153A.
3. Мутеин FGF-1 человека по п. 1, характеризующийся тем, что точечная мутация в положении S153 представляет собой мутацию S153R.
4. Мутеин FGF-1 человека по п. 1, характеризующийся тем, что он дополнительно содержит точечную мутацию S154.
5. Мутеин FGF-1 по п. 4, характеризующийся тем, что точечная мутация в положении S154 представляет собой точечную мутацию S154D, и точечная мутация в положении S153 представляет собой точечную мутацию S153D (Последовательность № 27).
6. Мутеин FGF-1 человека по любому из пп. 1 - 5, характеризующийся тем, что он дополнительно содержит по меньшей мере одну стабилизирующую мутацию в положении аминокислоты, выбранном из: Q55, S62 и H108.
7. Мутеин FGF-1 по п. 6, характеризующийся тем, что по меньшей мере одна стабилизирующая мутация в положении аминокислоты Q55, S62 или H108 представляет собой точечную мутацию, выбранную из Q55P, S62I и H108G, соответственно.
8. Мутеин FGF-1, определенный в любом из пп. 6 - 7, характеризующийся тем, что он содержит три стабилизирующие мутации: Q55P, S62I и H108G.
9. Мутеин FGF-1 по п. 8, характеризующийся тем, что он имеет последовательность аминокислот, представленную в Последовательности № 23, в Последовательности № 25 или в Последовательности № 29.
10. Мутеин FGF-1, определенный в любом из пп. 1 - 9, характеризующийся тем, что он дополнительно содержит N-концевую делецию по меньшей мере 19 последовательных аминокислот полноразмерного белка FGF-1.

11. Мутеин FGF-1 по п. 10, характеризующийся тем, что он содержит N-концевую делецию аминокислот E3 - G21 полноразмерного белка FGF-1.

12. Мутеин FGF-1 по любому из пп. 1 - 11, характеризующийся тем, что он содержит точечную мутацию S153A, S153R или комбинацию точечных мутаций S153D
5 и S154D и N-концевой делеции аминокислот E3 - G21 полноразмерного белка FGF-1.

13. Мутеин FGF-1 по п. 12, характеризующийся тем, что он имеет последовательность аминокислот, представленную в Последовательности № 24 (SEQ. 24), в Последовательности № 26 (SEQ. 26) или в Последовательности № 30 (SEQ. 30).

14. Димер мутеинов фактора роста фибробластов 1 (FGF-1) человека с
10 пониженной митогенностью, определенных в любом из пп. 1 - 13.

15. Димер по п. 14, характеризующийся тем, что он представляет собой гомодимер.

16. Димер по п. 14 или 15, характеризующийся тем, что мутеины, образующие димер, соединены линкером, предпочтительно линкером из
15 аминокислот, в частности линкером, который представляет собой последовательность аминокислот GGGGSGGGGSGGGG.

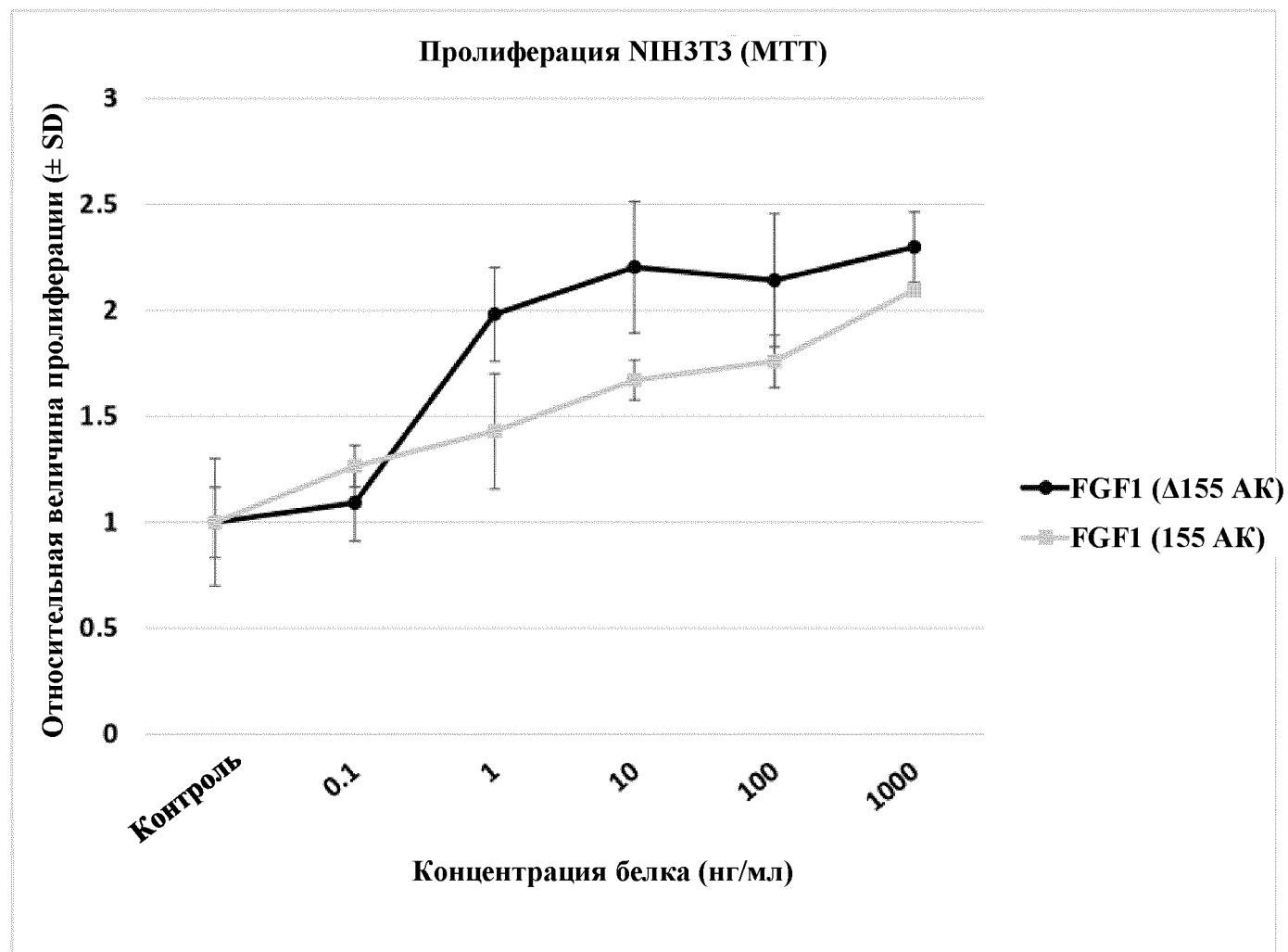
17. Димер по любому из пп. 14 - 16, характеризующийся тем, что он имеет последовательность аминокислот, представленную в Последовательностях №№ 35 -
20 38.

18. Мутеин фактора роста фибробластов 1 (FGF-1) человека с пониженной митогенностью, определенный в любом из пп. 1 - 17, для применения в снижении
20 уровня глюкозы в крови.

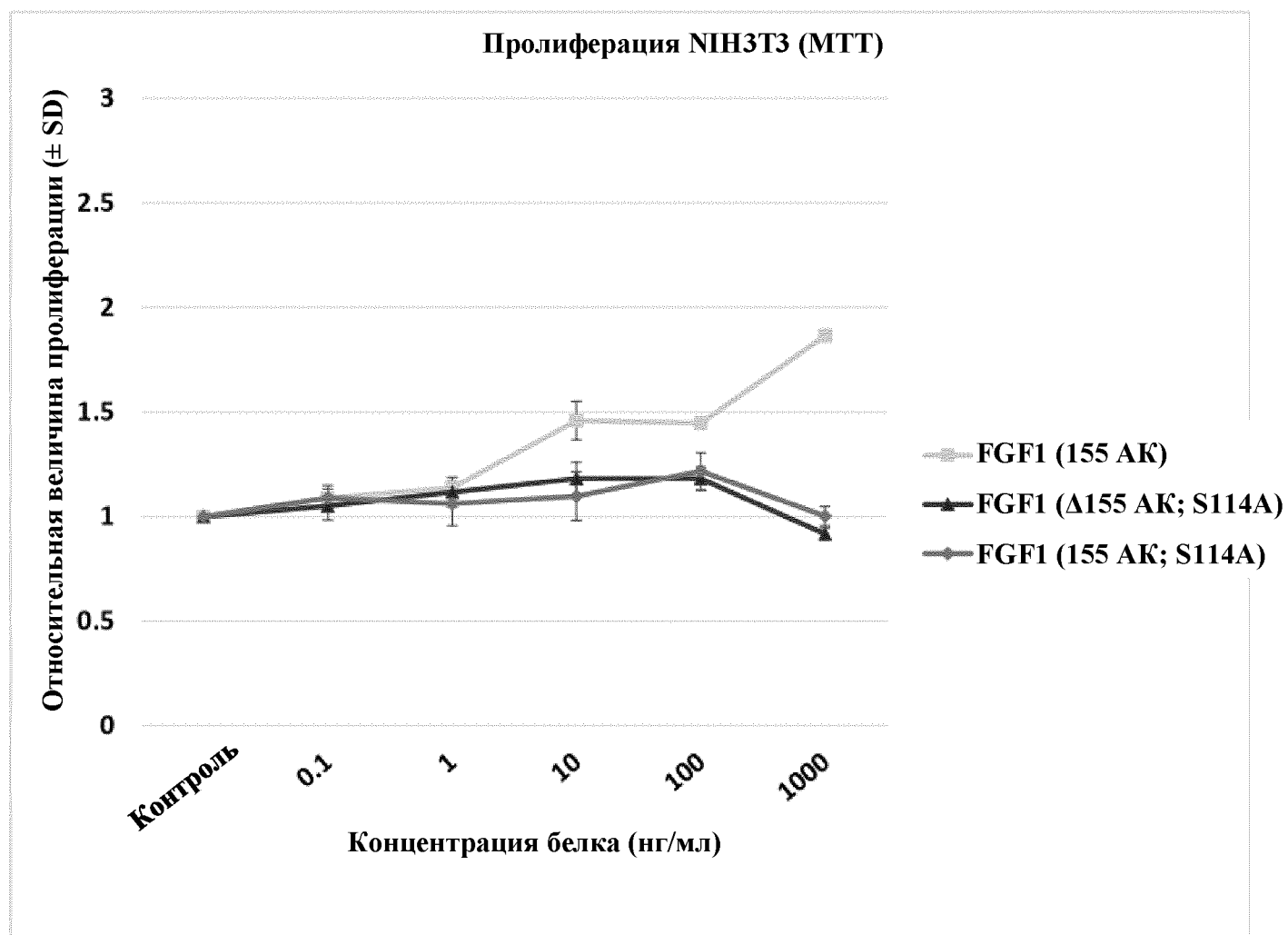
19. Мутеин фактора роста фибробластов 1 (FGF-1) человека с пониженной митогенностью, определенный в любом из пп. 1 - 17, для применения в лечении
25 диабета, в частности диабета 2 типа.

20. Мутеин FGF-1 для применения по п. 18 или 19, характеризующийся тем, что он имеет последовательность аминокислот, представленную в
Последовательностях №№ 23 - 30.

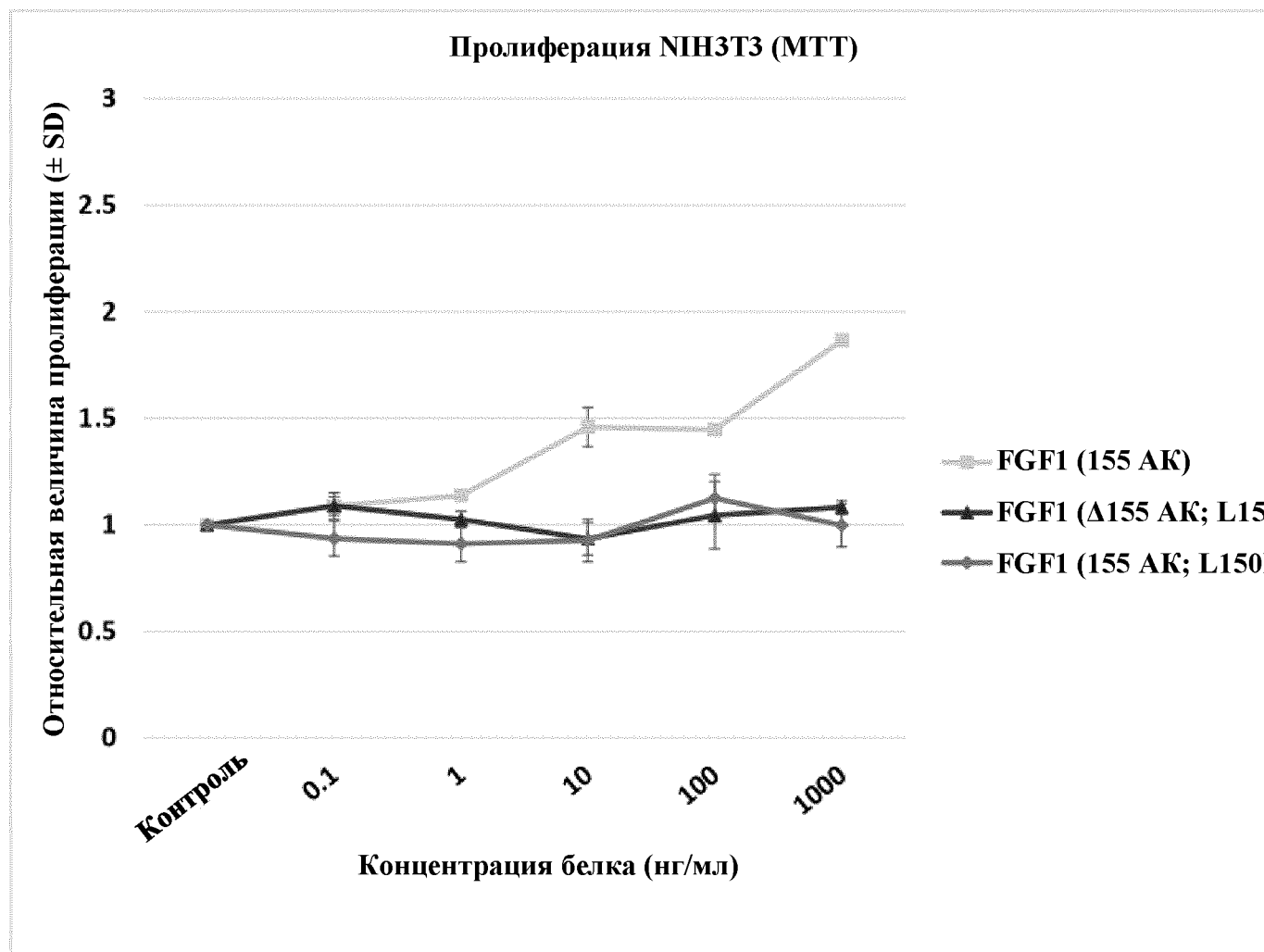
Фиг. 1



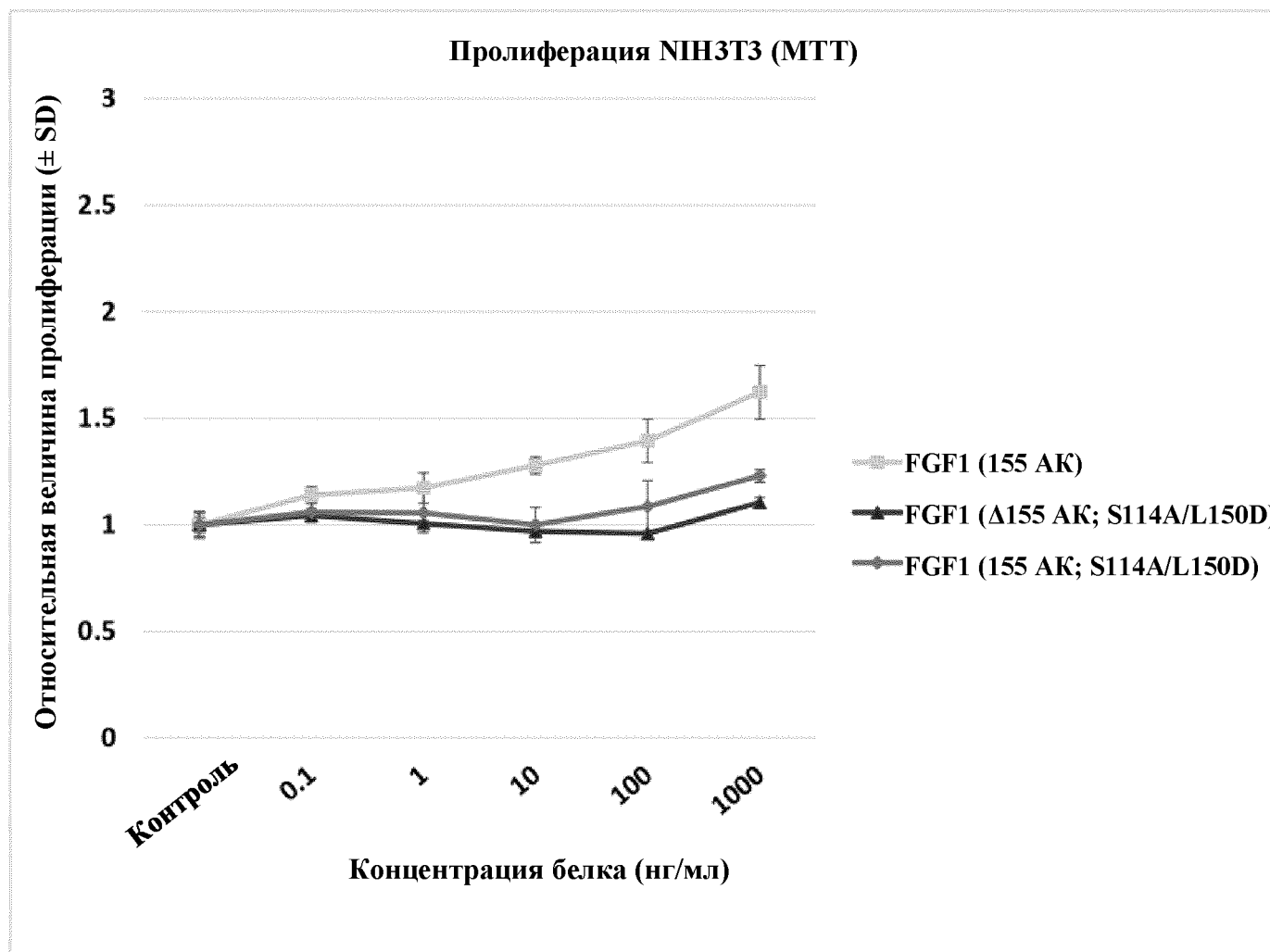
Фиг. 2



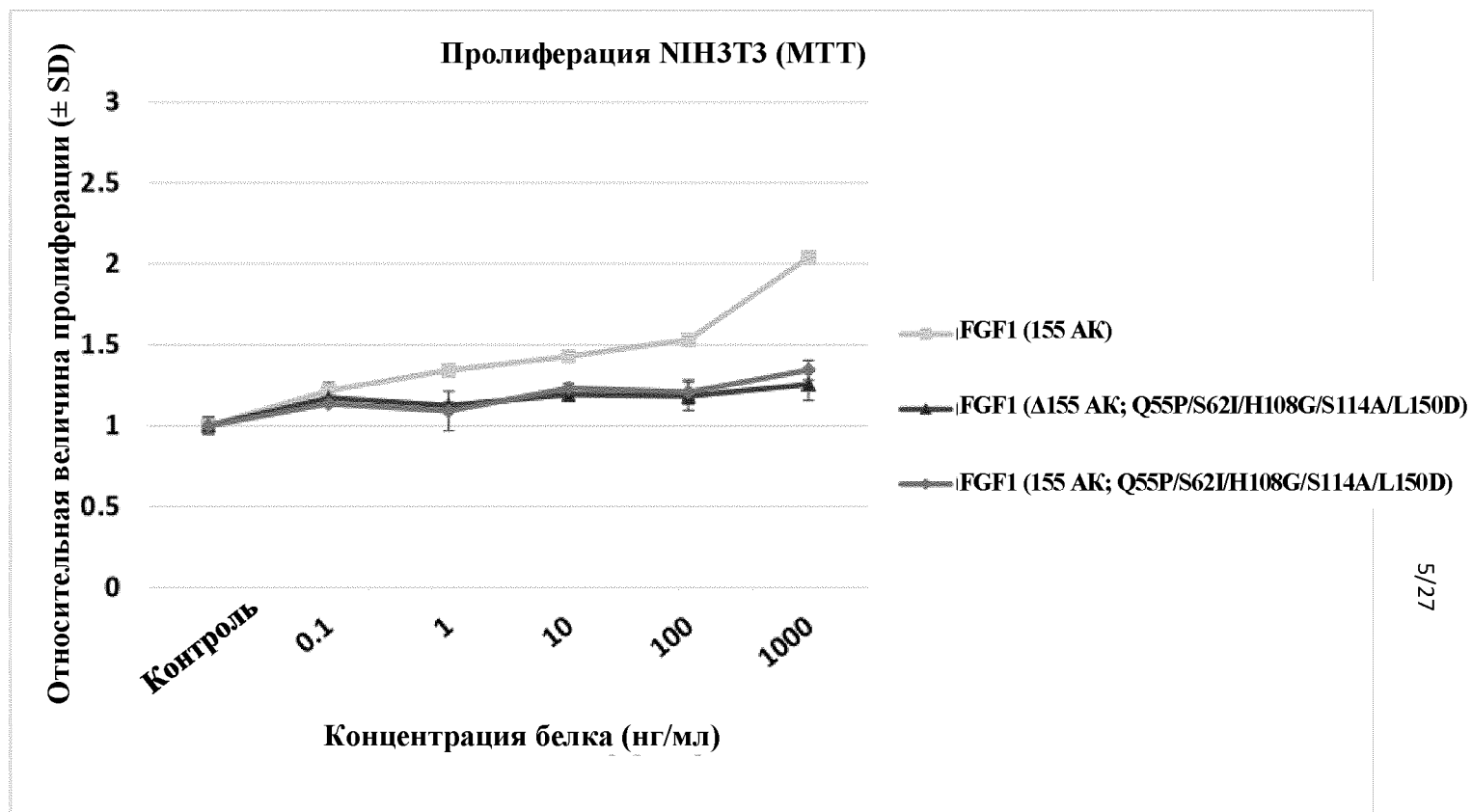
Фиг. 3



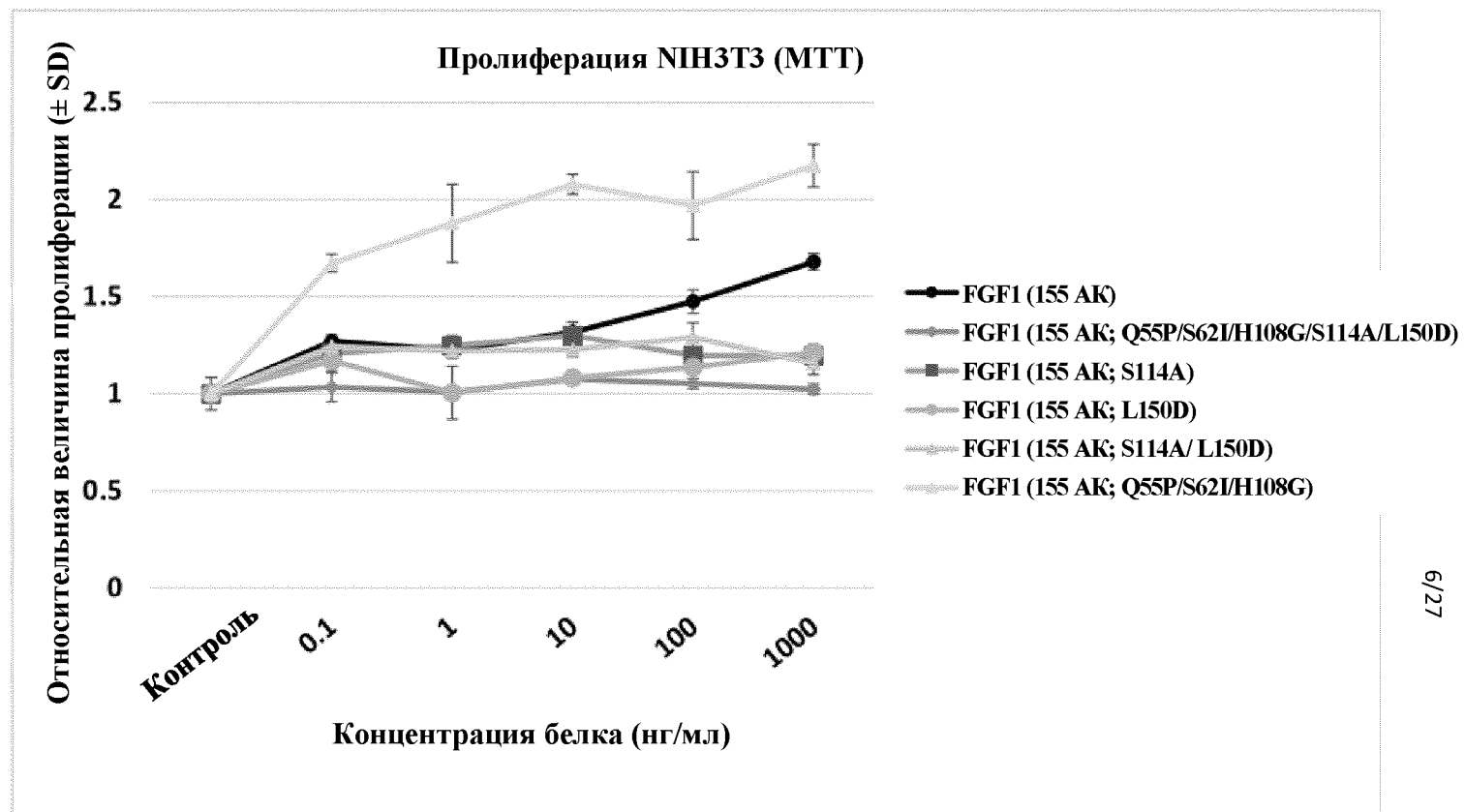
Фиг. 4



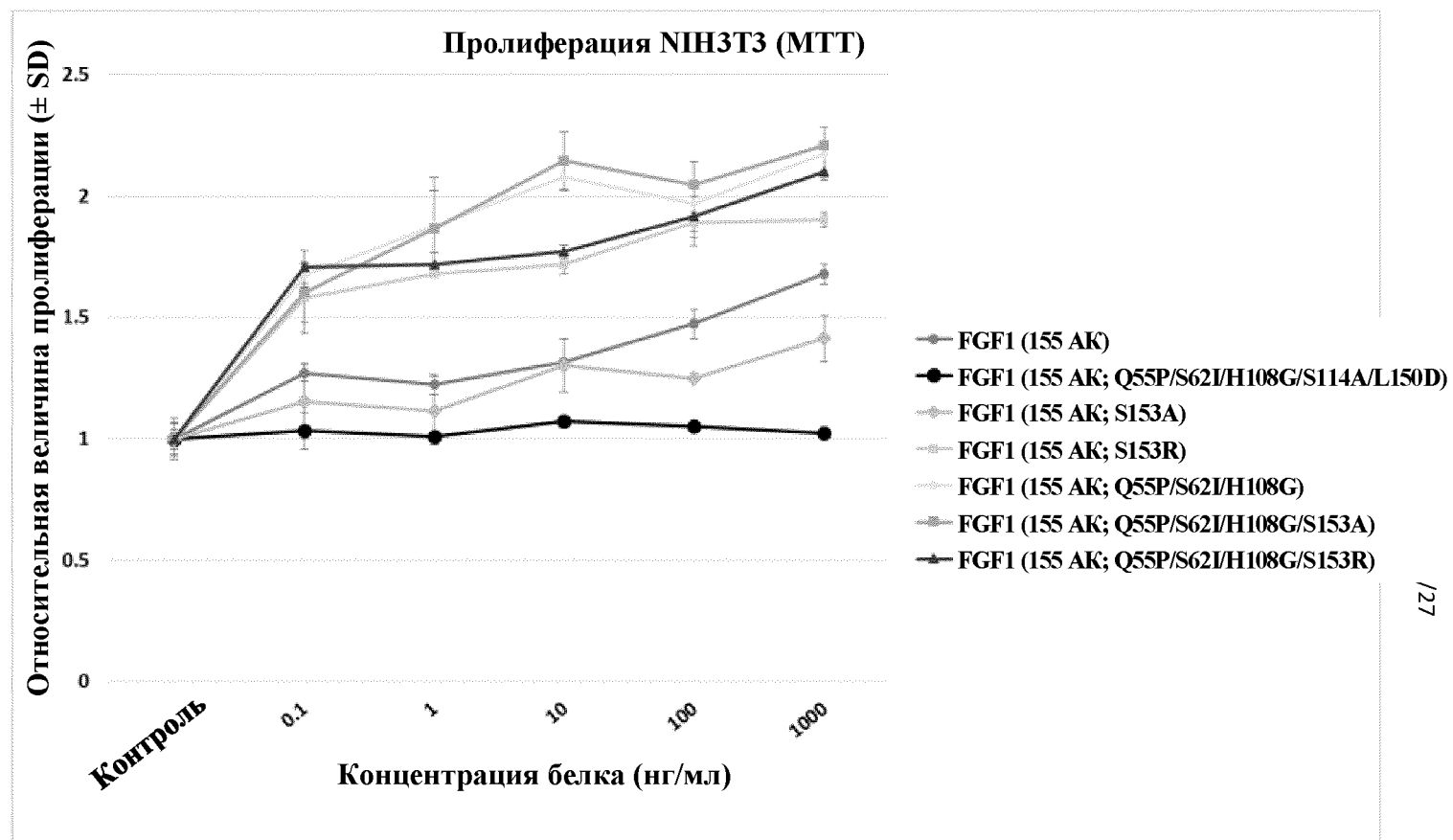
Фиг. 5



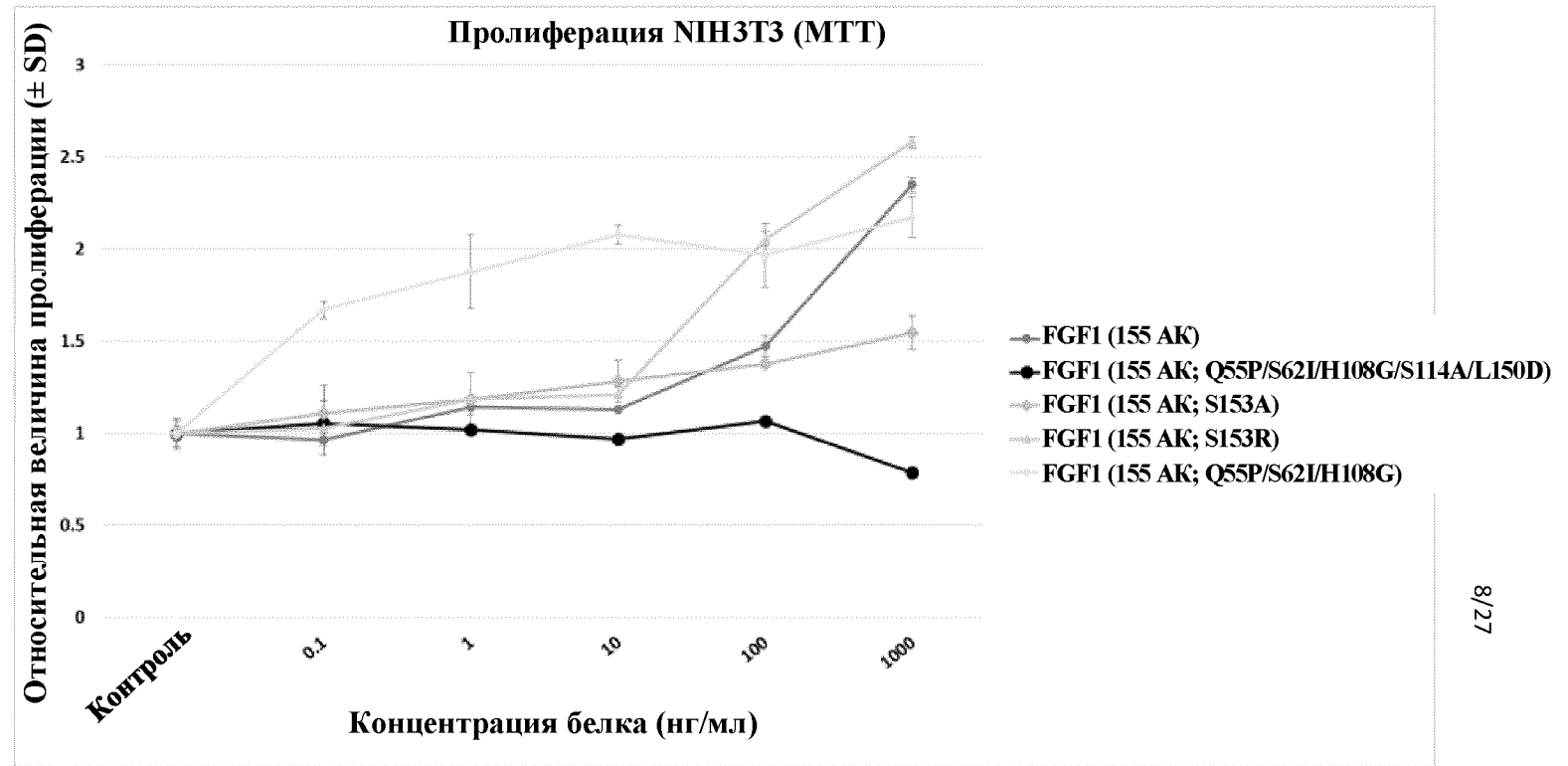
Фиг. 6



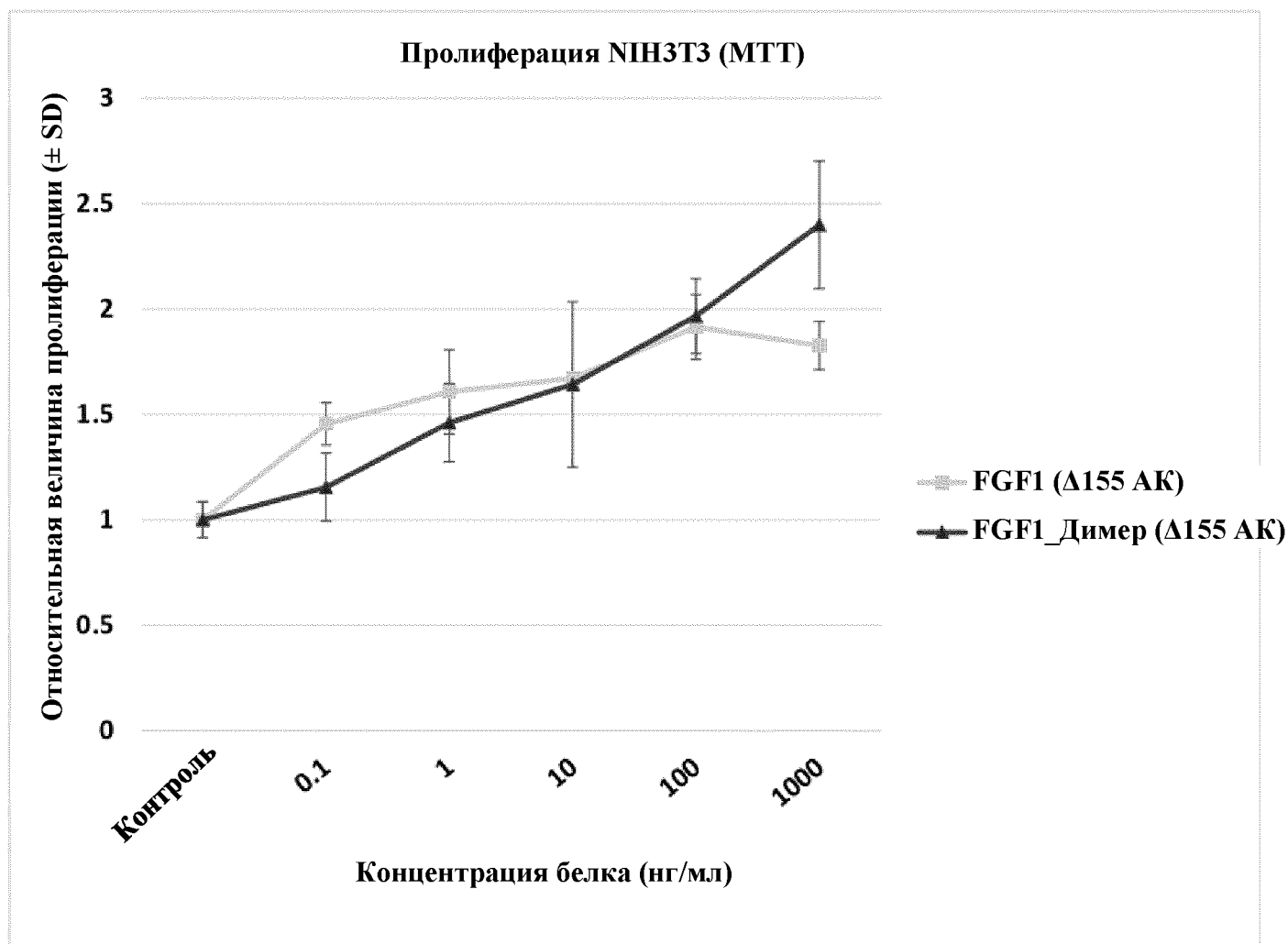
Фиг. 7



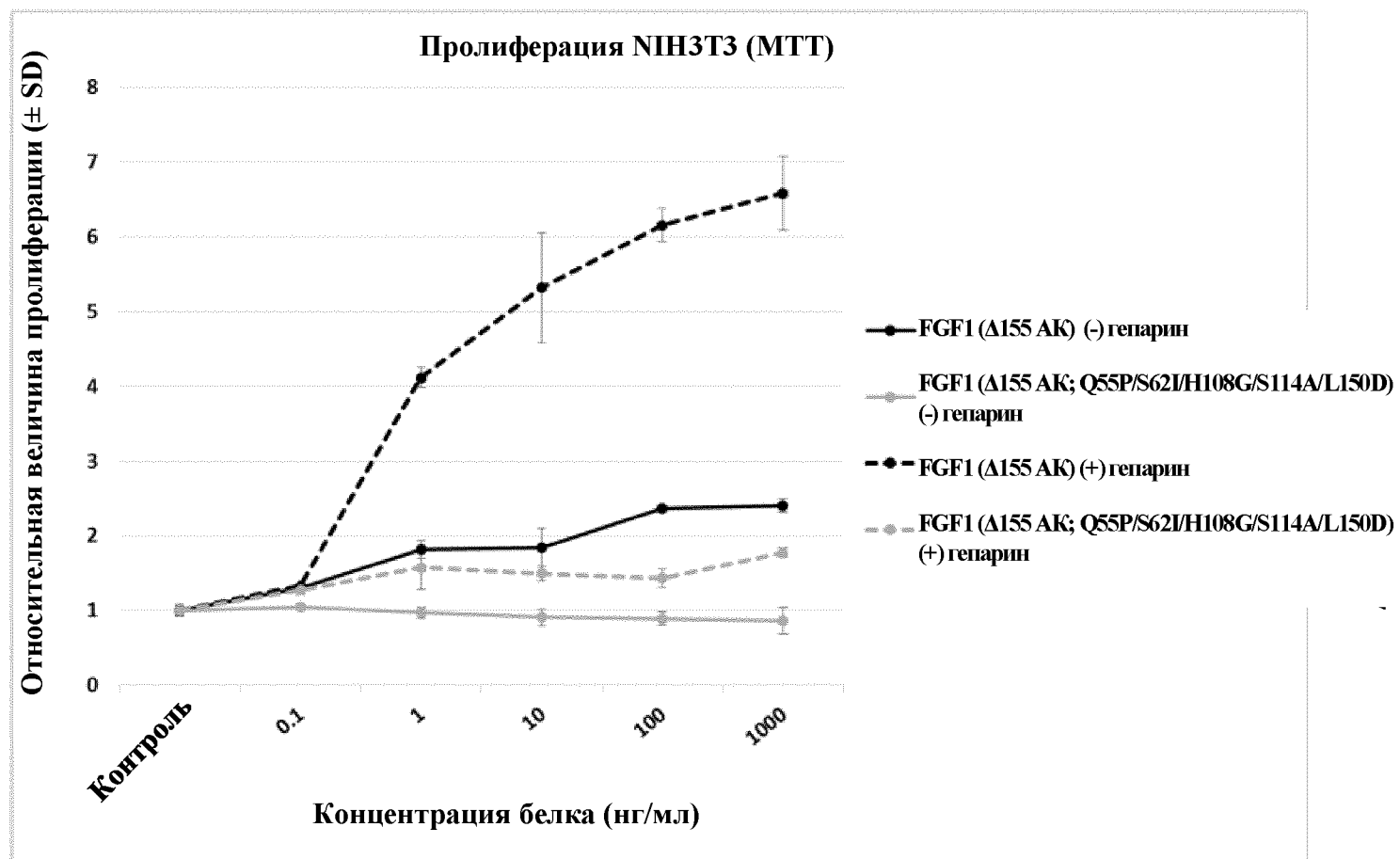
Фиг. 8

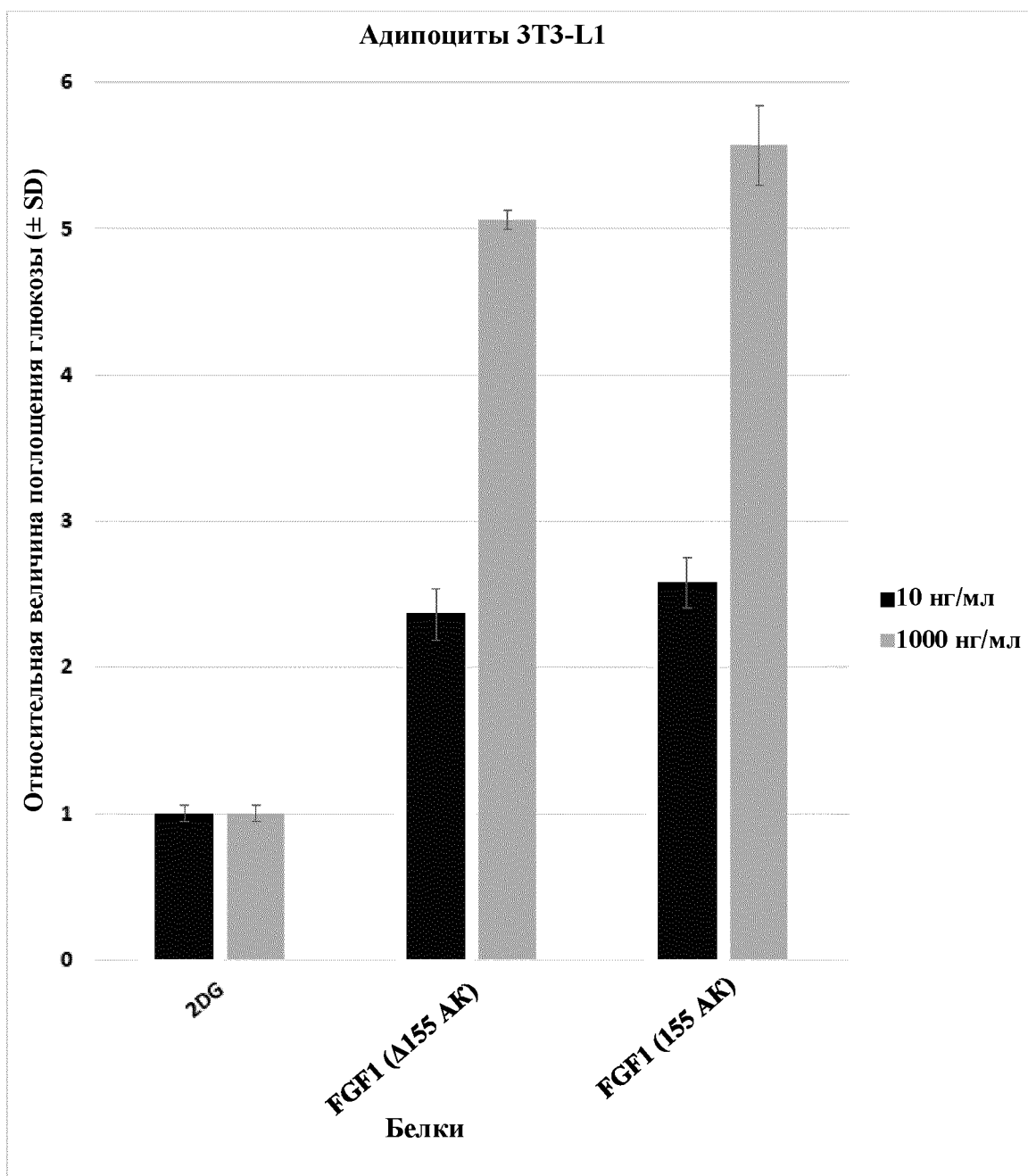


Фиг. 9

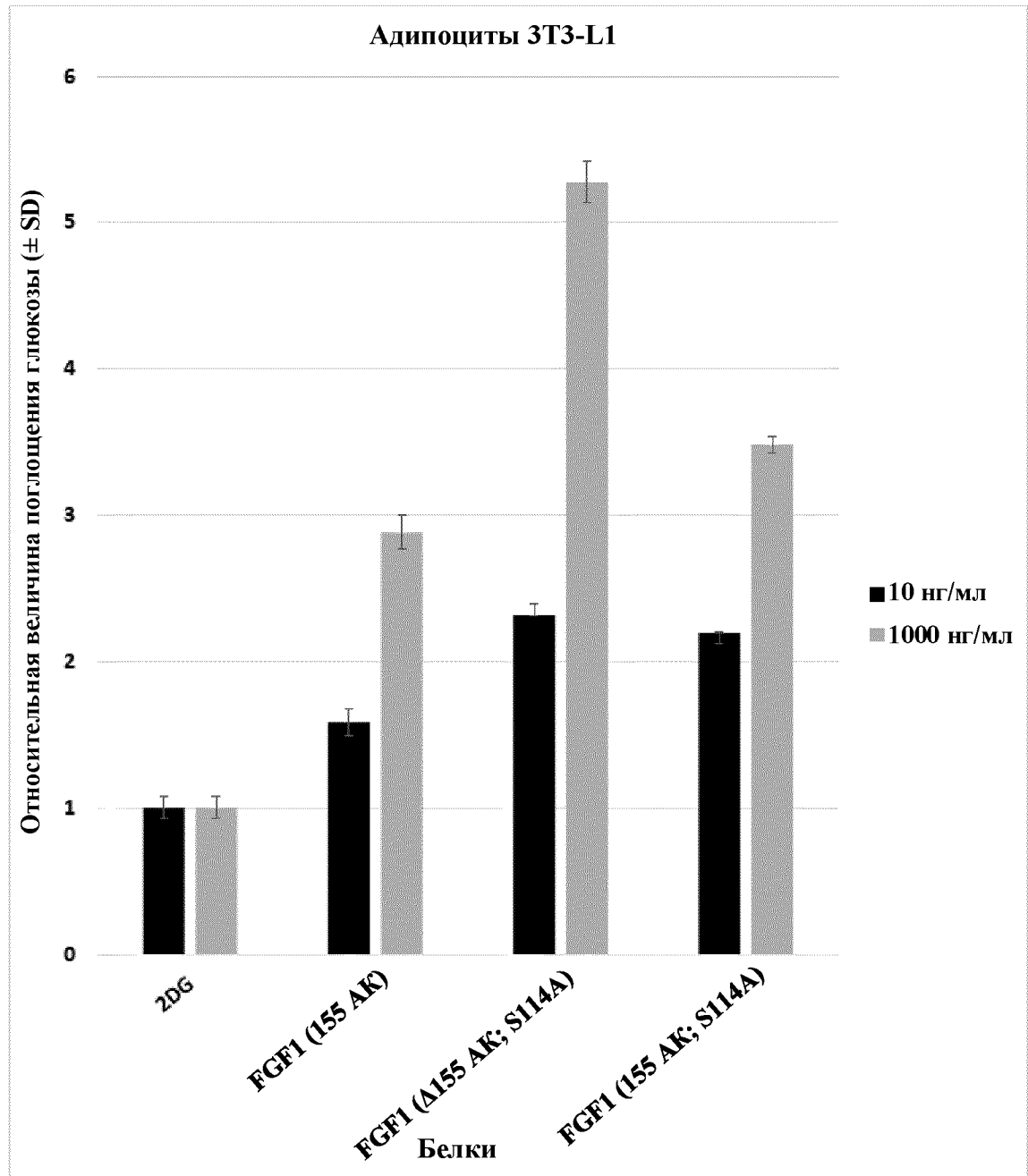


Фиг. 10

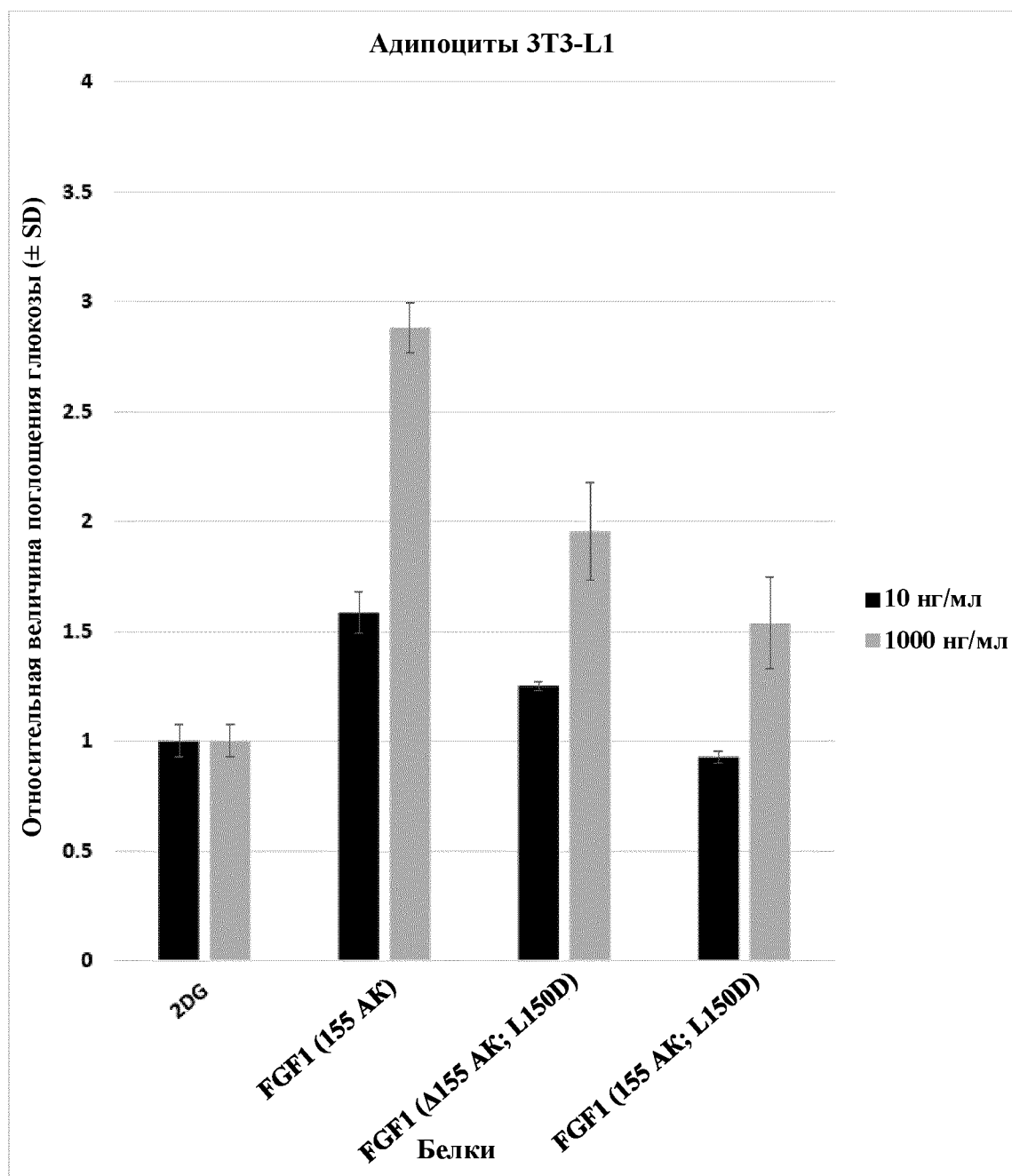




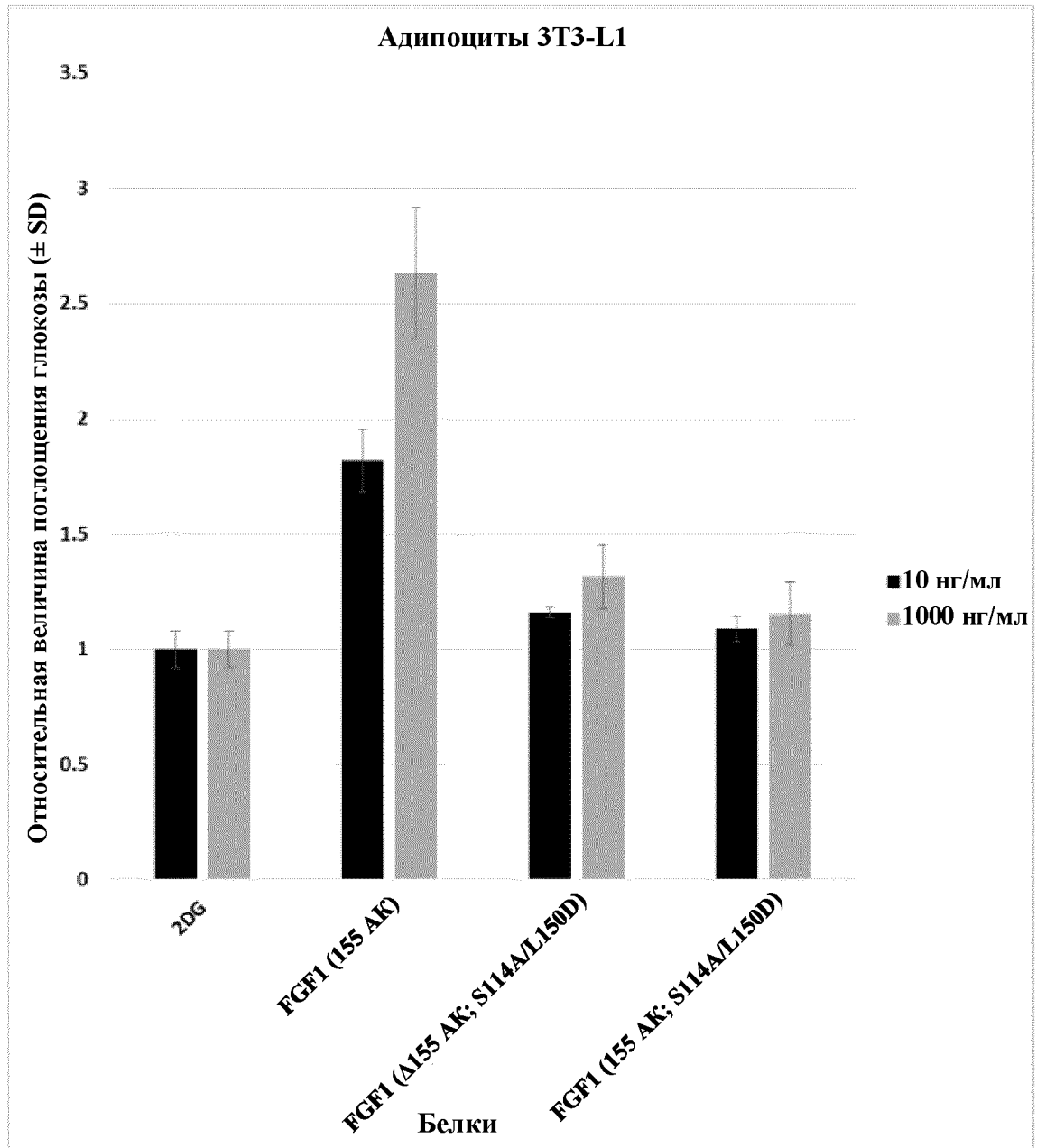
Фиг. 11



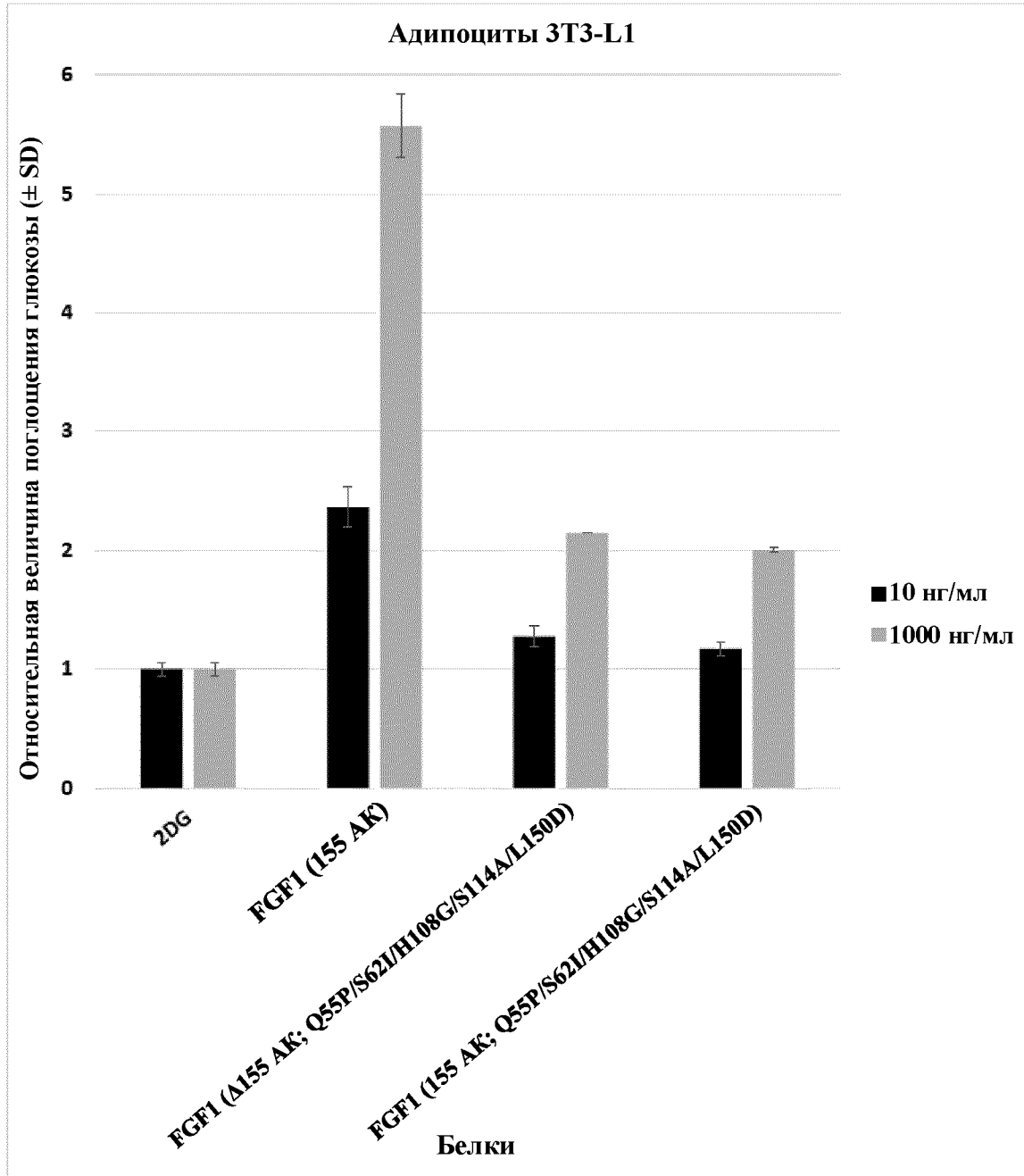
Фиг. 12



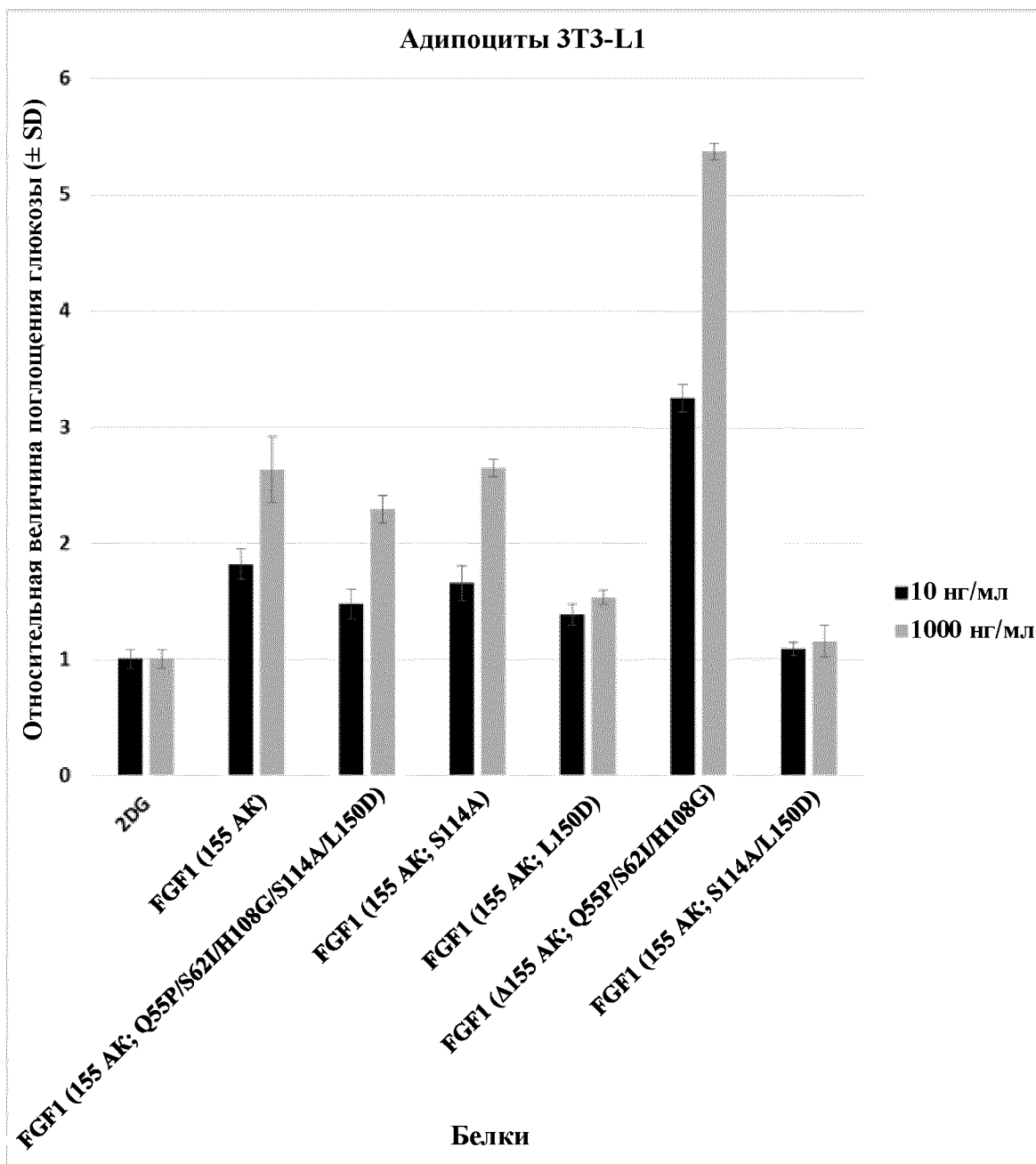
Фиг. 13



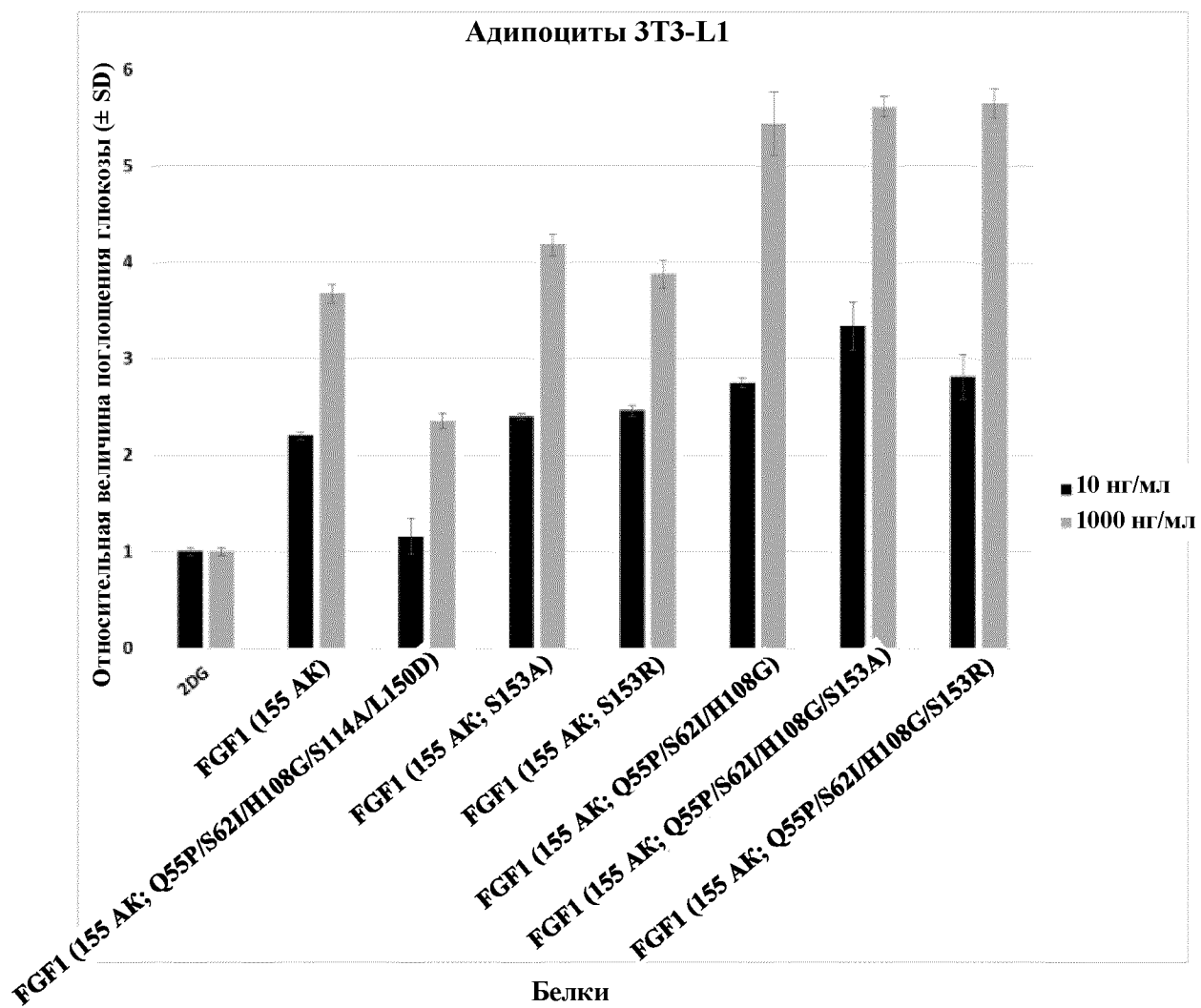
Фиг. 14



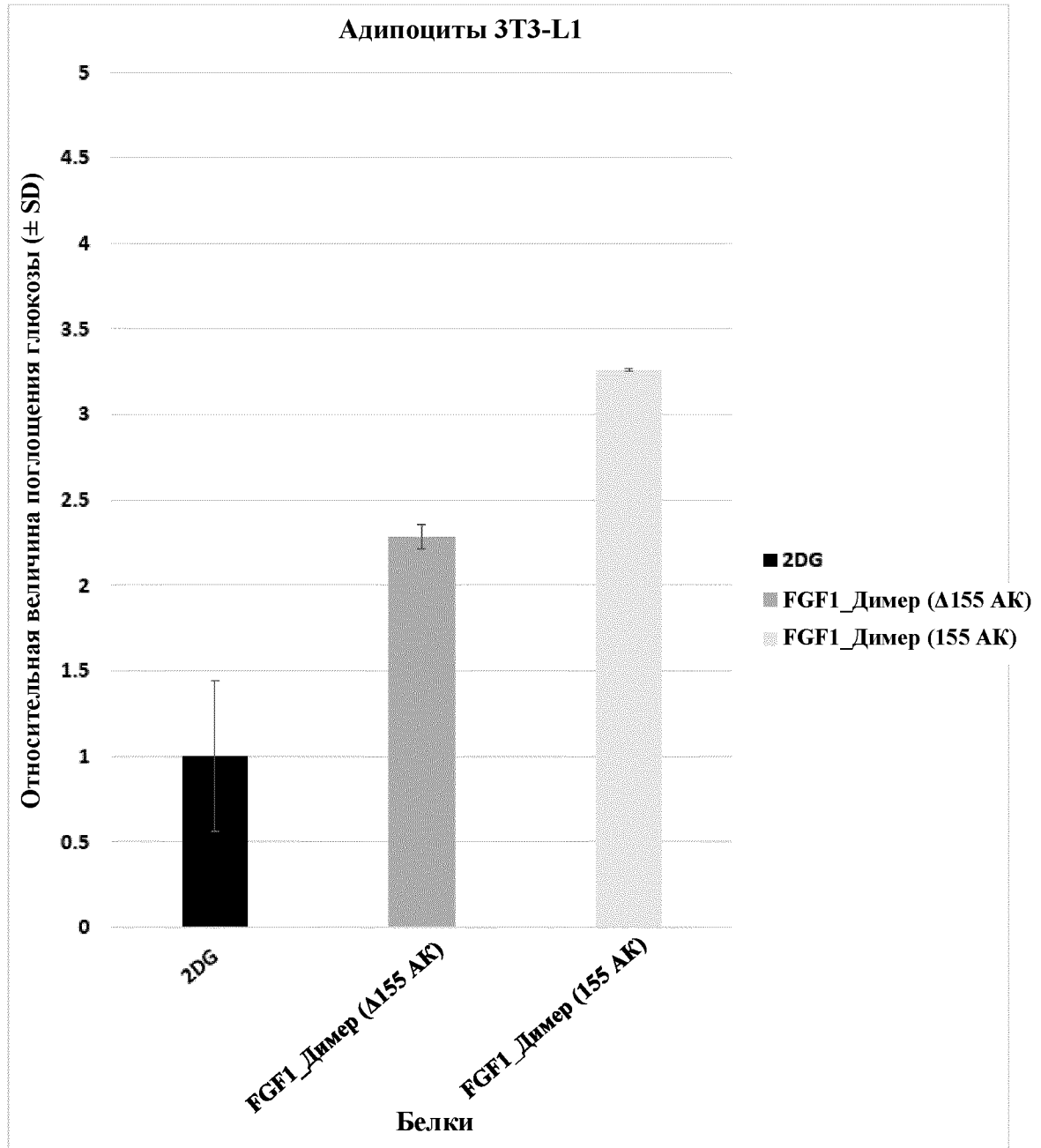
Фиг. 15



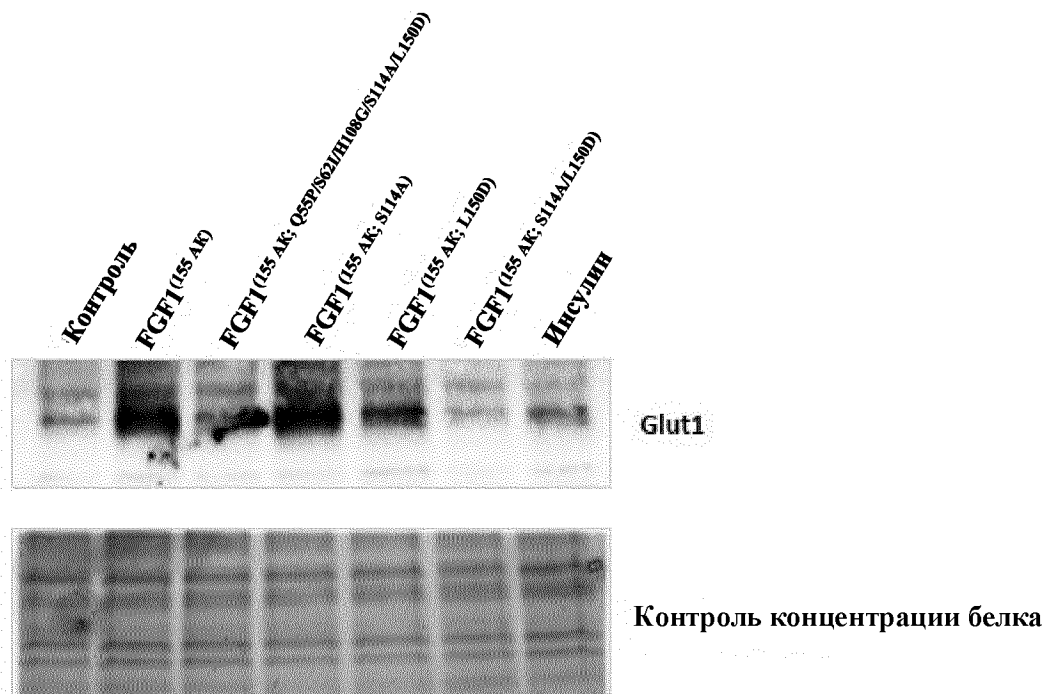
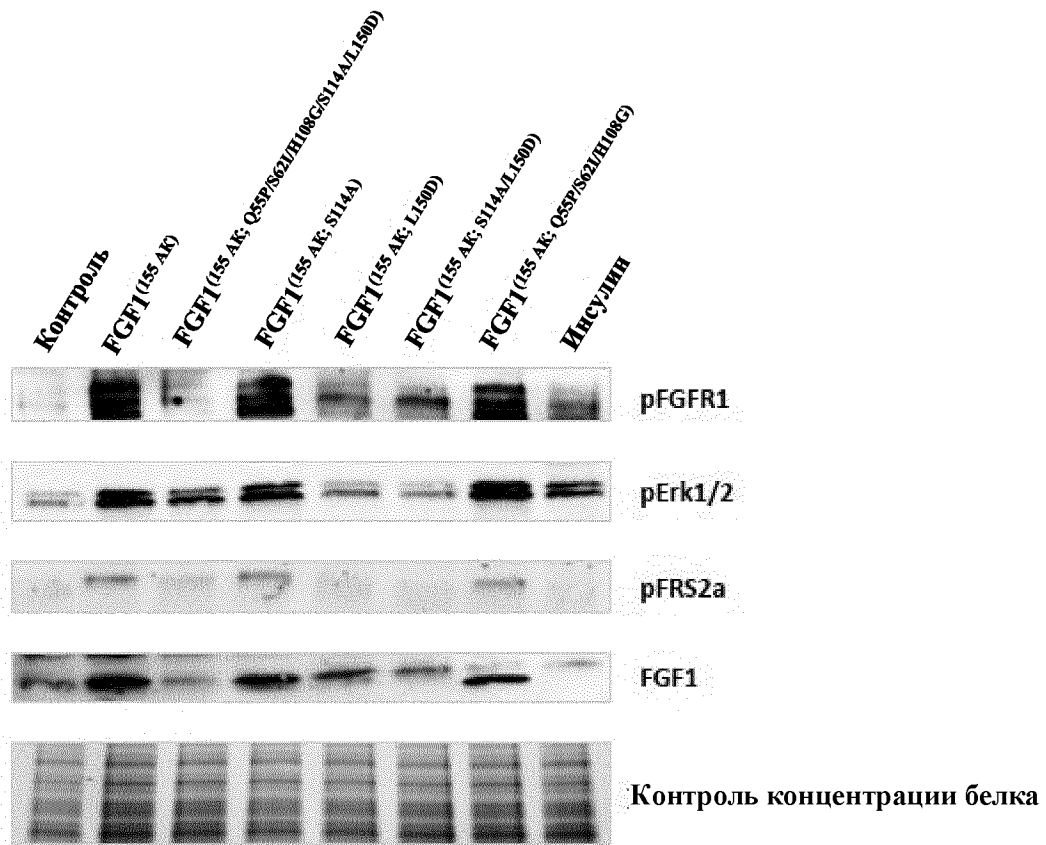
Фиг. 16



Фиг. 17

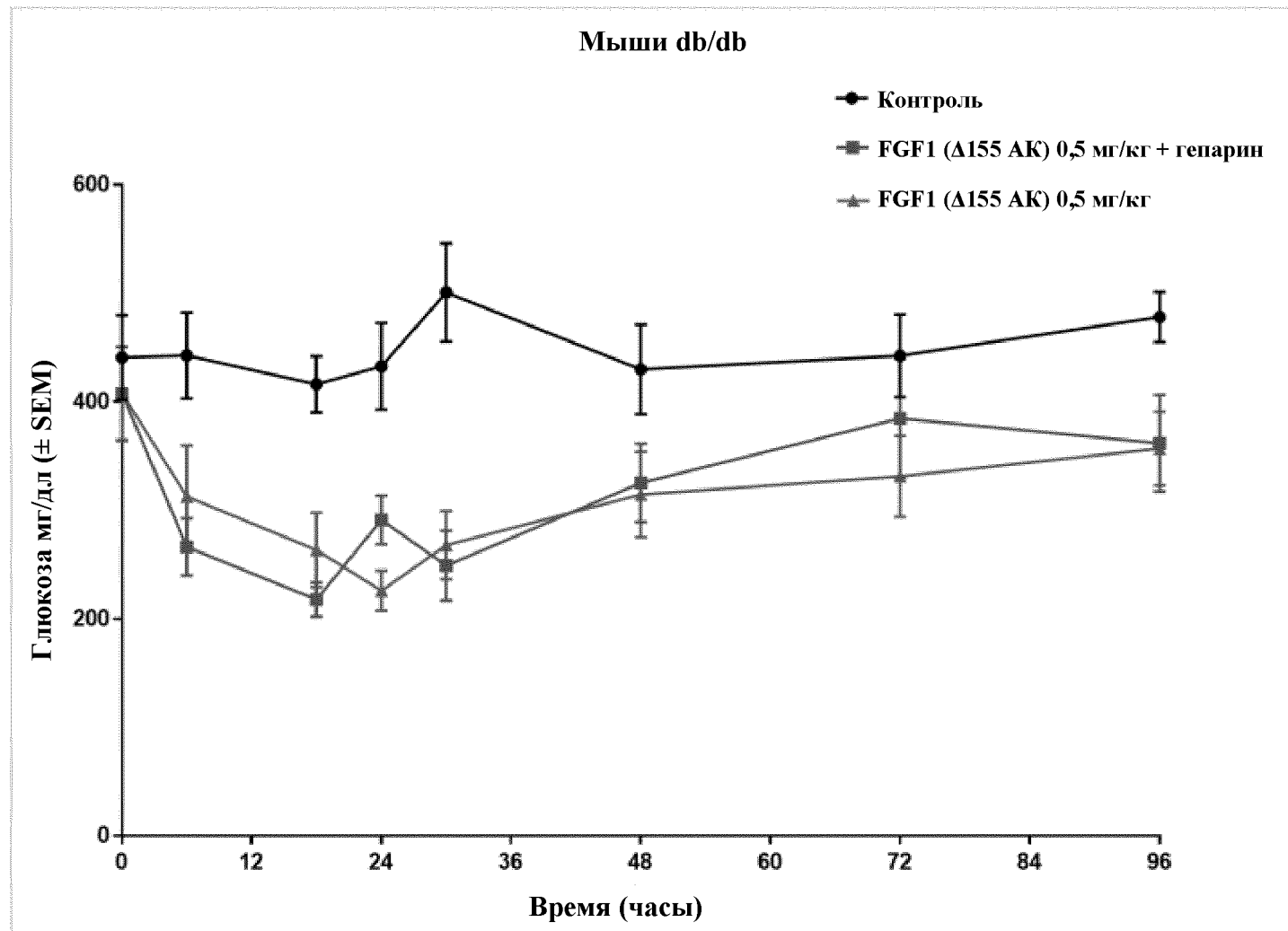


Фиг. 18

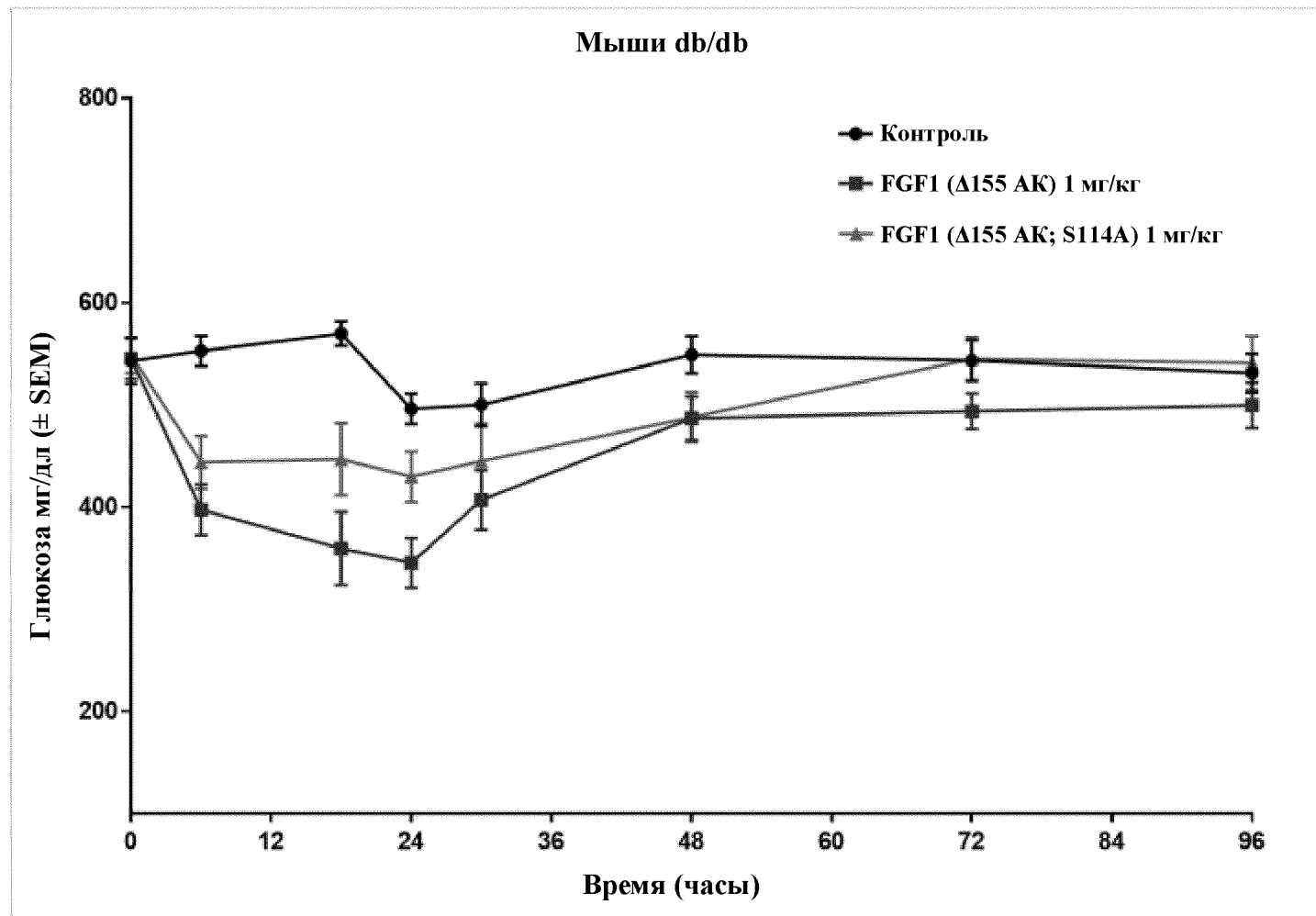


Фиг. 19

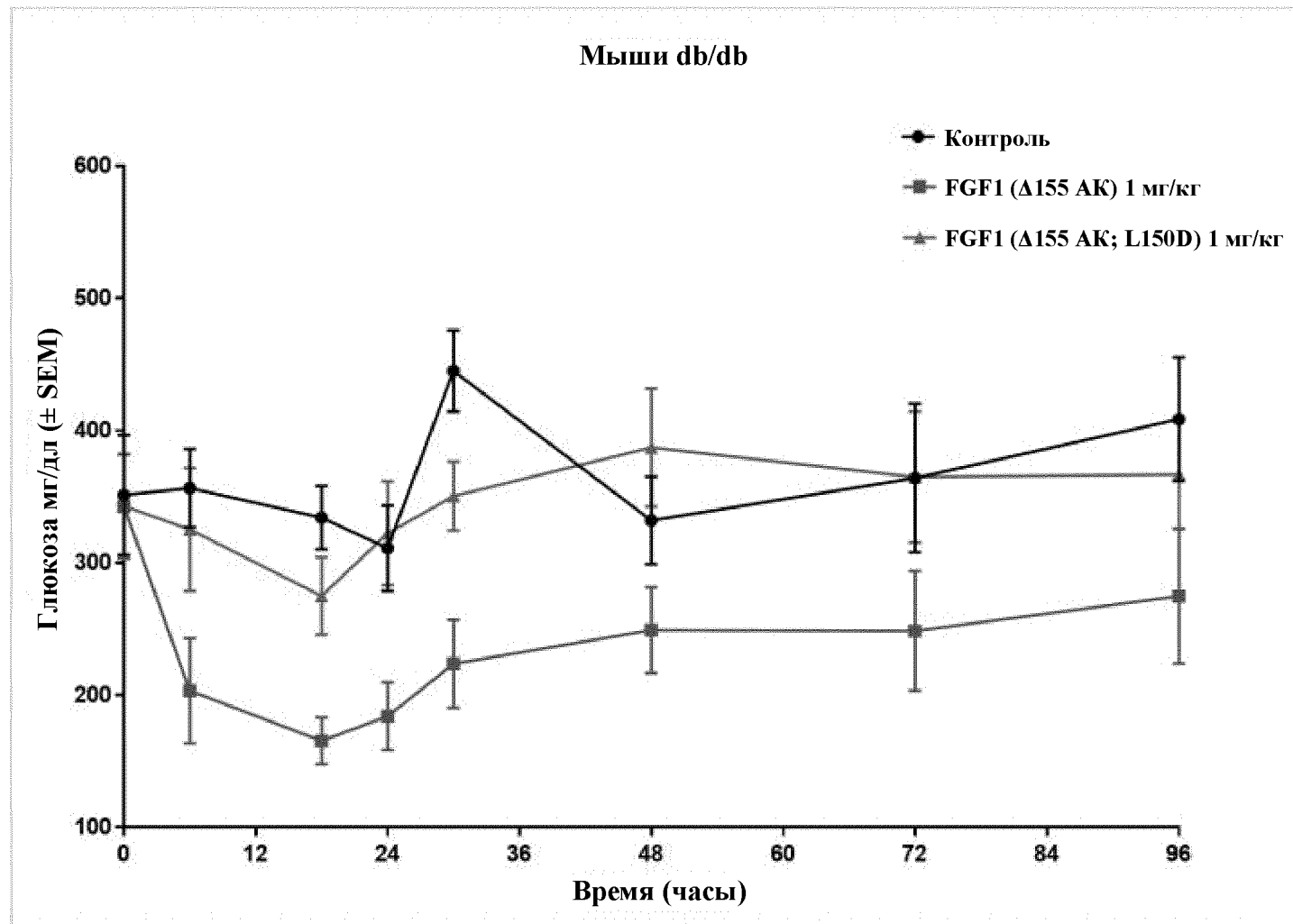
Фиг. 20



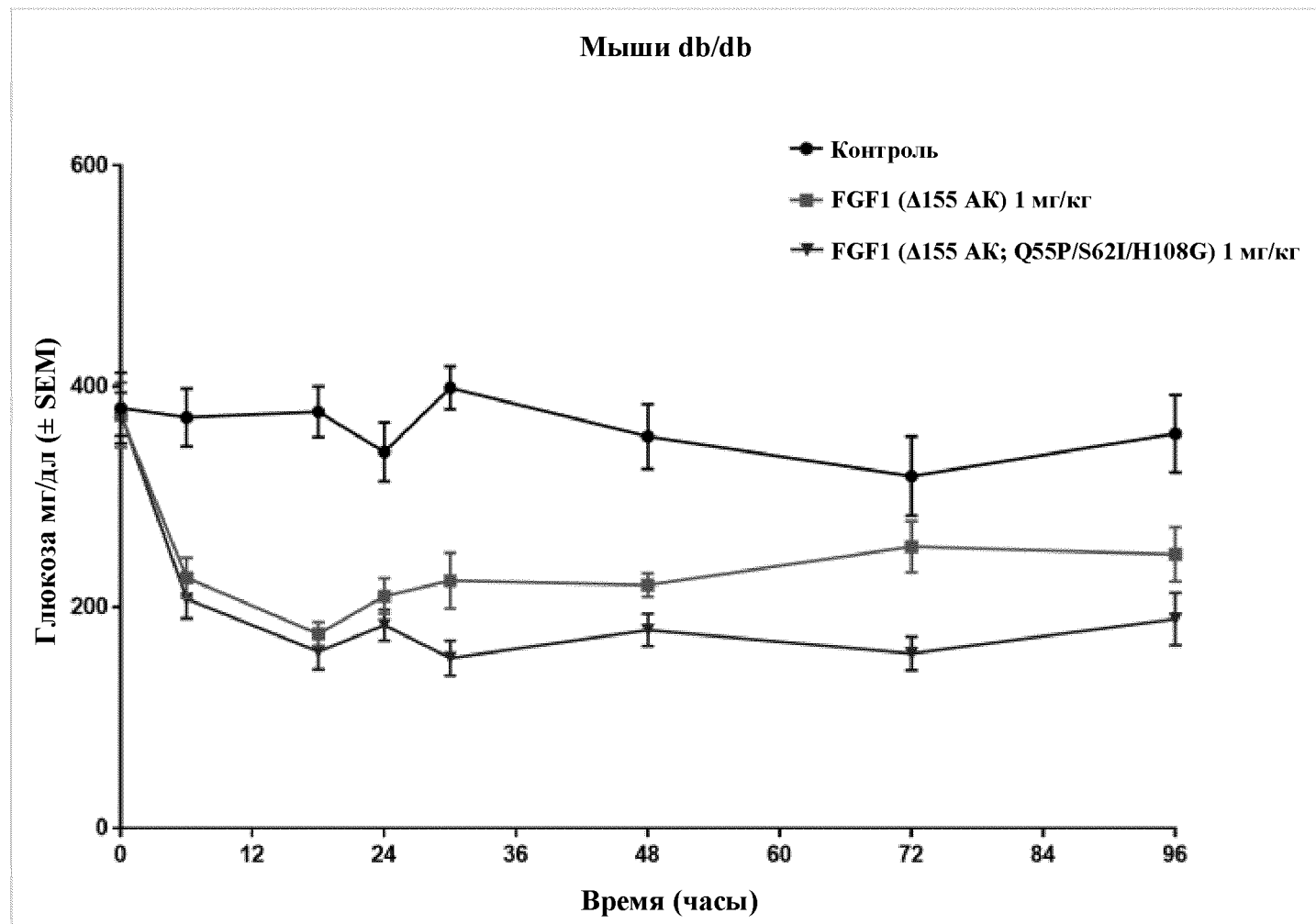
Фиг. 21



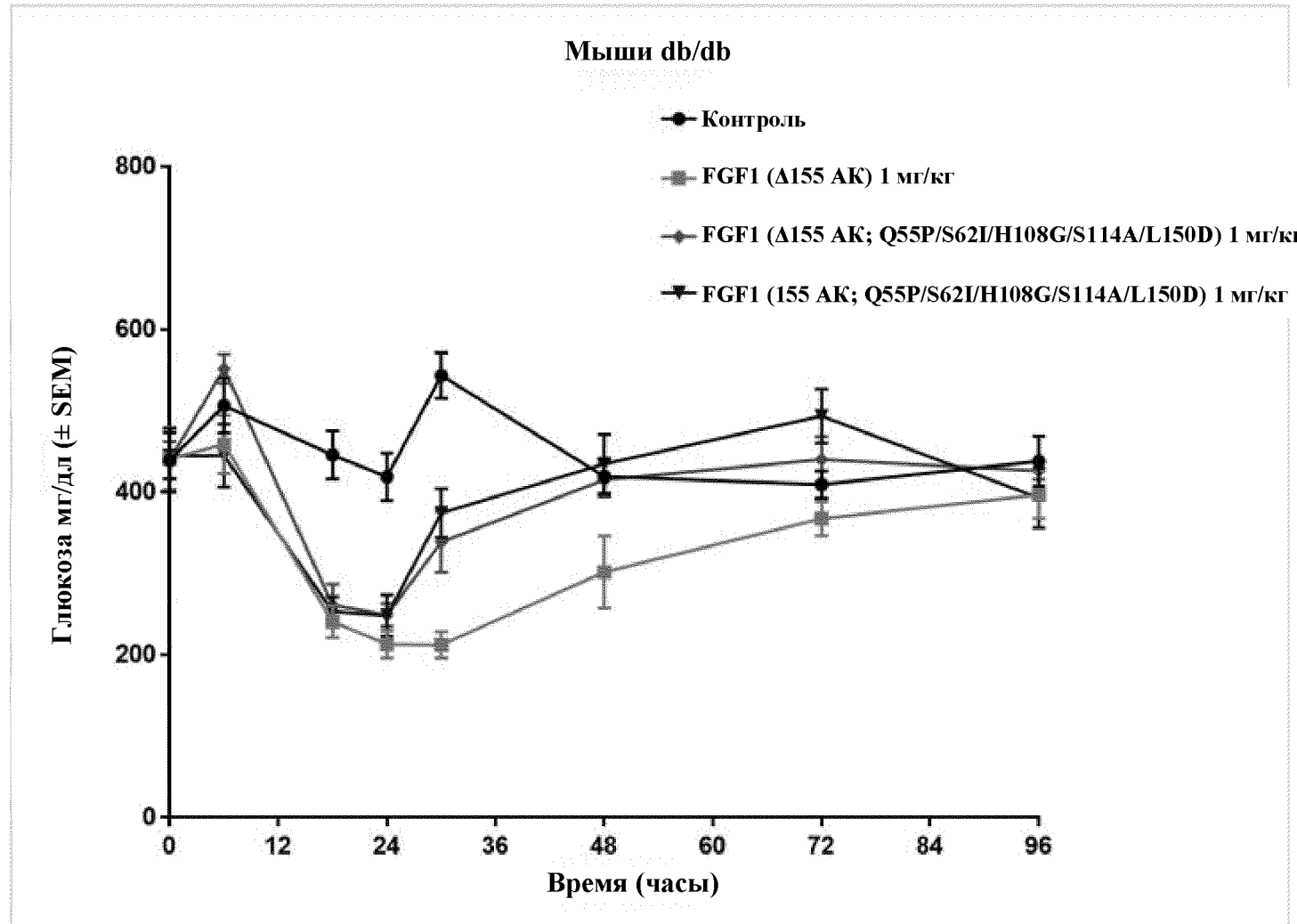
Фиг. 22



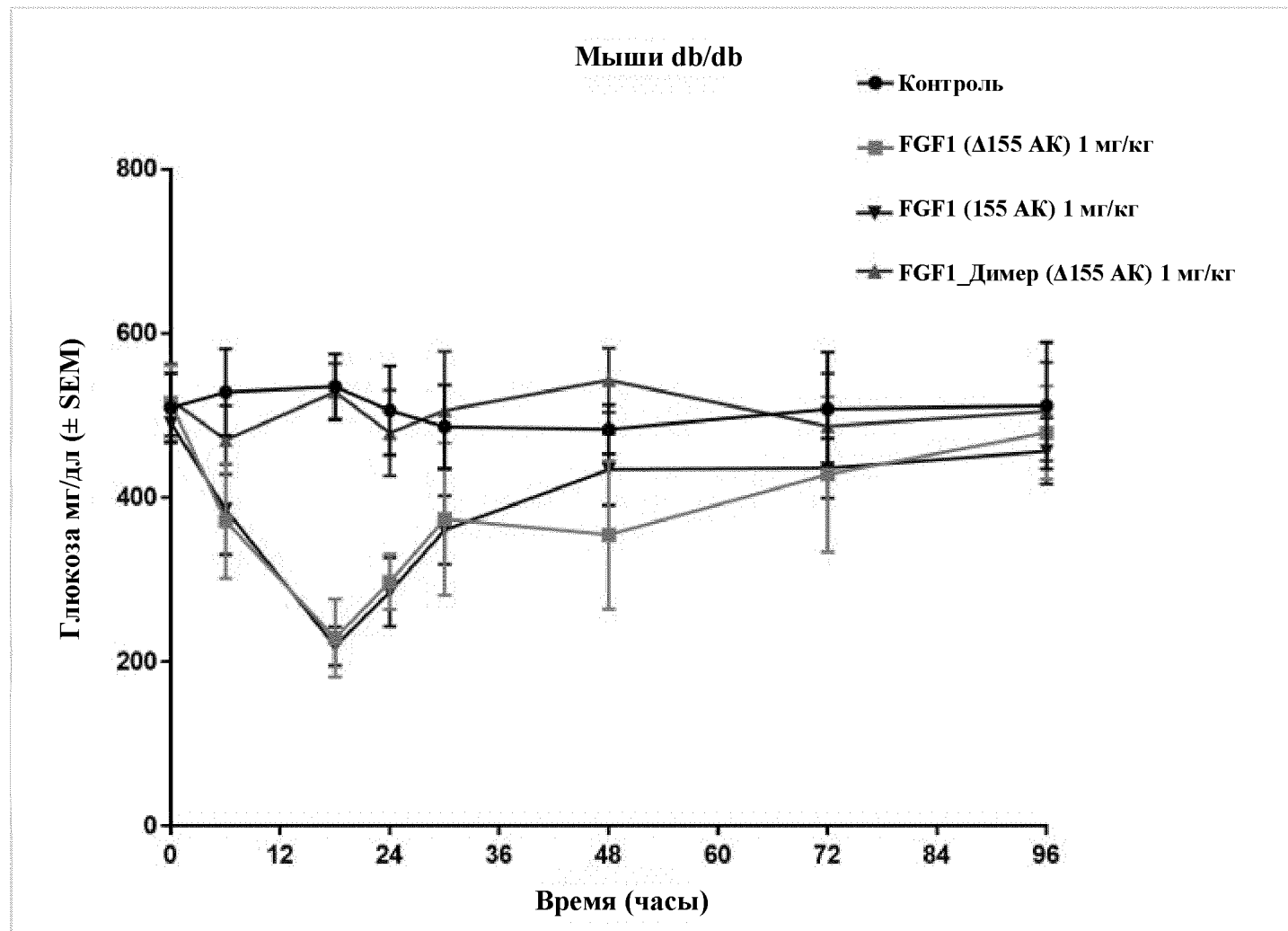
Фиг. 23



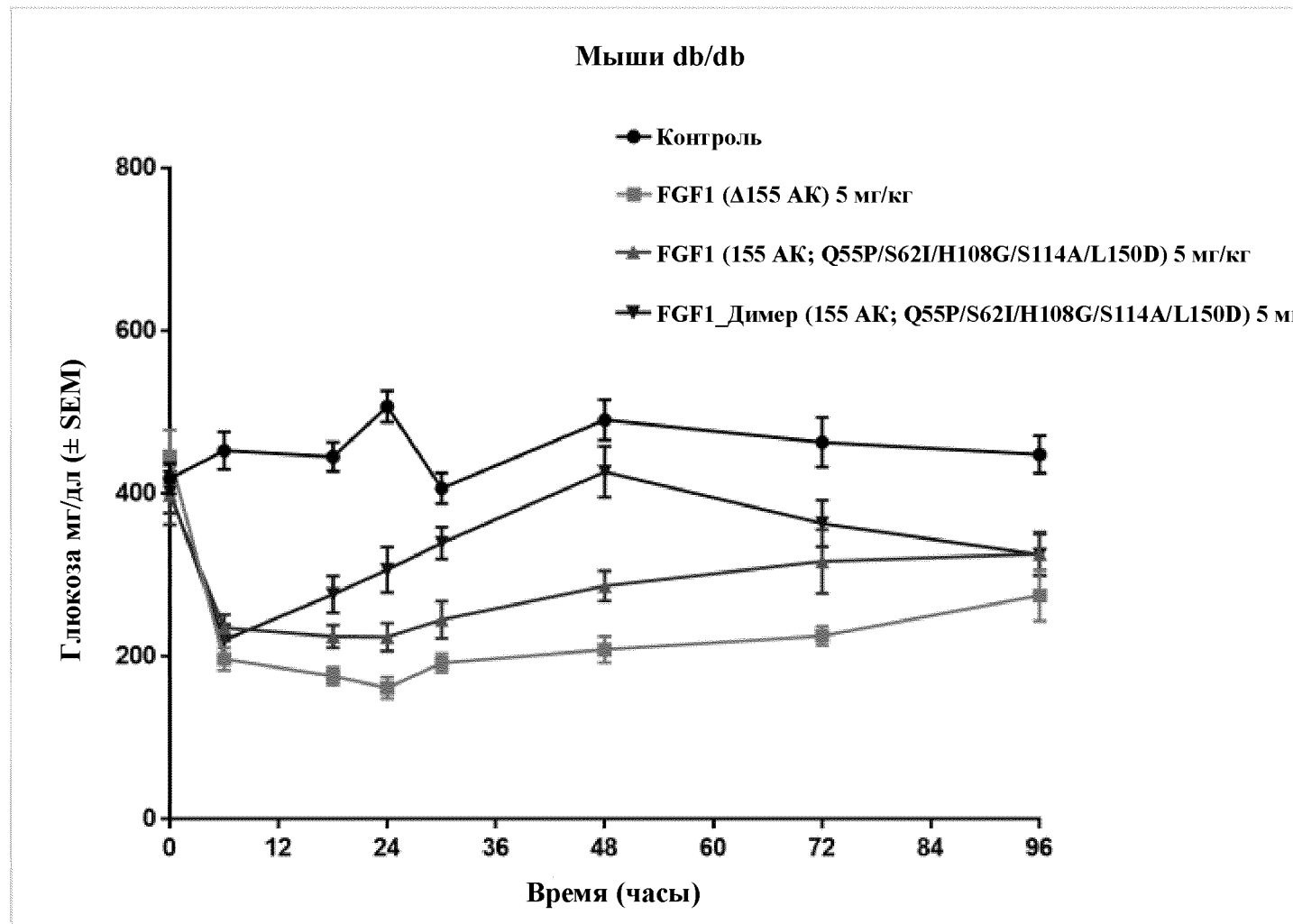
Фиг. 24



Фиг. 25



Фиг. 26



Фиг. 27

