

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

Zveřejněná podle §31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2021-303

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

C07K 14/50 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)
A61Q 7/00 (2006.01)
A61P 17/14 (2006.01)
A61P 19/04 (2006.01)
A61P 19/08 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **15.06.2021**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **28.12.2022**
(Věstník č. 52/2022)

- (71) Přihlašovatel:
Enantis s.r.o., Brno, Bohunice, CZ
Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně, Brno, Staré
Brno, CZ
- (72) Původce:
doc. Mgr. Radka Chaloupková, Ph.D., Helvíkovice,
CZ
Mgr. Veronika Štěpánková, Ph.D., Slavkov u Brna,
CZ
Mgr. Eliška Petulová, Těšany, CZ
Mgr. Tereza Ghazalová, Modřice, CZ
prof. Mgr. Jiří Damborský, Dr., Brno, Židenice, CZ
Mgr. David Bednář, Ph.D., Brno, Bohunice, CZ
- (74) Zástupce:
HARBER IP s.r.o., Dukelských hrdinů 567/52,
170 00 Praha 7, Holešovice

(54) Název přihlášky vynálezu:
**Termostabilní polypeptid na bázi FGF18 a
jeho použití**

- (57) Anotace:
Termostabilní polypeptid na bázi FGF18, mající
nebo obsahující sekvenci o alespoň 90% sekvenční
identitě se sekvencí:
LYSR TSGKHIQVLG RRISARGEDG
DKYAQLLVET DTFGSQVRIK GKETEFYLCM
NRKGKLVGKP DGTSKECVFI EKVLENNYTA
FMSAKYPGWY VGFTKKGRPR
KGPKTRENQP DVHFM (SEQ ID NO. 3) přičemž
aminokyseliny vyznačené tučně a podtržením musí
být zachovány. Výhodně je celková délka sekvence
polypeptidu do 227 aminokyselin, výhodněji do
207 aminokyselin. Uvedený polypeptid je vhodný
pro použití v regenerativní medicíně, v ortopedii,
zejména pro léčbu poranění chrupavky či kosti,
nebo v terapeutické či neterapeutické stimulaci
růstu vlasů. Rovněž je vhodný pro použití jako
složka kultivačního média pro kultivaci
chondrocytů.

Termostabilní polypeptid na bázi FGF18 a jeho použití

Oblast techniky

5

Předkládaný vynález se týká upraveného fibroblastového růstového faktoru 18 (Fibroblast Growth Factor 18, FGF18) se zlepšenou teplotní stabilitou v porovnání s divokým typem, a jeho použití ve výzkumu buněčné biologie, regenerativní medicíně a souvisejících biomedicínských aplikacích. Stávající vynález se týká zejména upraveného FGF18 pro použití pro regeneraci chrupavky při osteoartritidě a v dalších aplikacích regenerativní medicíny.

10

Dosavadní stav techniky

Fibroblastový růstový faktor 18, FGF18, patří do rodiny fibroblastových růstových faktorů vázajících heparin. FGF proteiny hrají ústřední roli při prenatálním vývoji, postnatálním růstu a regeneraci různých tkání regulací buněčné proliferace a diferenciaci. FGF18 stimuluje proliferaci a diferenciaci mezenchymálních buněčných linií, zejména srdečních myocytů, osteoblastů a chondrocytů (US6352971B1). FGF18 je nezbytným regulátorem vývoje dlouhých a kalvariálních kostí (Ohbayashi, N. et. al., 2002, Genes Dev. 16: 870-879). FGF18 se dále podílí na alveolárním stádiu vývoje plic, podporuje vývoj tenkého střeva, jater a ledvin (Haque, T. et. al., 2007, Histol. Histopathol. 22: 97-105). FGF18 polypeptid signalizuje prostřednictvím specifické interakce se svým přirozeným ligandem – receptorem FGFR-3C, čímž podporuje chondrogenezi (Davidson, D. et al., 2005, J. Biol. Chem. 280: 20509-20515). FGF18 je rovněž schopen vázat se, a tudíž aktivovat receptor FGFR-2C a FGFR4. Díky schopnosti stimulovat formaci chrupavek, demonstrováné jak na myším modelu osteoartrózy (Liu, Z. et. al., 2002, Genes Dev. 16: 859-869) tak v klinických testech na pacientech trpících osteoartritidou (Eckstein, F. et. al. 2020, Ann Rheum Dis. 79(4): 525–528), je hlavním terapeutickým potenciálem FGF18 regenerace kloubní chrupavky nebo kosti prostřednictvím regulace chondrogeneze, osteogeneze a endochondrální osifikace (Moore, E.E. et al., 2005, Osteoarthritis Cartilage, 13: 623–631). FGF18 dále účinně reguluje růst vlasů (Song, L. et al., 2014, Appl. Microbiol. Biotechnol. 98: 695-704) a zároveň má preventivní účinek vůči radiačnímu poškození vlasových folikulů (Kawano, M. et al., 2016, Adv. Radiat. Oncol. 1(3):170-181), a tudíž může být využit k léčbě alopecie, prevenci radiačně-indukované alopecie, ale i ve vlasové kosmetice.

35

Mezi členy rodiny FGF proteinů, sdílí FGF18 největší sekvenční podobnost s proteinem FGF8 a FGF17. Sekvence FGF18 je vysoce konzervována napříč různými savčími druhy. Lidský FGF18 obsahuje 207 aminokyselin, z nichž prvních 27 převážně hydrofobních aminokyselin tvoří signální sekvenci, sloužící k jeho sekreci. FGF18 dále obsahuje dvě místa pro N-glykosylaci (N39 a N137), přičemž glykosylace není nezbytná pro správnou funkci proteinu, což umožňuje jeho rekombinantní produkci v prokaryotických expresních systémech. Rekombinantní produkce lidského FGF18 v různých kmenech *Escherichia coli* byla popsána v patentové přihlášce WO 2006/063362, kde kromě maturovaného proteinu byla produkována i zkrácená forma FGF18 polypeptidu s C-terminální delecí 11 aminokyselin, vykazující stejnou biologickou aktivitu jako maturovaný FGF18 protein. Patent US8207115B2 popisuje funkční FGF18 polypeptidy zkrácené na C-terminálním konci o 0 až 32 aminokyselin, ze kterých maturovaný FGF18 polypeptid (28-207) a FGF18 polypeptid zkrácený na C-terminálním konci o 11 aminokyselin (28-196) představují preferované formy FGF18 pro léčbu osteoartritických pacientů. Patentový dokument WO2001039788A2 popisuje terapeutické aplikace maturovaného FGF18 polypeptidu a jeho funkčních fragmentů zkrácených na C-terminálním konci o 11 a 32 aminokyselin. Patentový dokument WO2012038953A2 popisuje funkční fragmenty FGF18 polypeptidu N-terminálně zkrácené o 28 až 56 aminokyselin, které vykazují modifikovanou receptorovou specifitu, projevující se dvojnásobným zvýšením nebo snížením aktivity k jednomu z FGF receptorů, nikdy ne ke všem, přičemž jejich schopnost aktivovat přirozený receptor FGFR-3C zůstává zachována.

55

Velký aplikační potenciál FGF18 je limitován jeho přirozenou termodynamickou a procesní nestabilitou projevující se krátkým poločasem života doprovázeným rychlou ztrátou biologické aktivity a velkou náchylností k proteolytické degradaci a agregaci. Např. poločas života FGF18 po aplikaci do kloubní chrupavky je méně než 24 hodin (WO2015/124731), což v terapeutických aplikacích může vést k potřebě častého podávání, a tudíž vysoké ceně léčby způsobené nutností opakované injekční administrace FGF18 pacientům. Kvůli nízké stabilitě FGF18 jsou buňky chrupavky vystaveny fluktuaci jeho koncentrace, což může přispívat k rychlému snížení signalizace, která je pro regeneraci kloubní chrupavky nezbytná. Termodynamická stabilita proteinu je velice důležitá v terapeutických aplikacích, protože nesložené nebo agregované formy proteinu mohou být potenciálně toxické a imunogenní. Z toho důvodu je v léčebných terapiích velká pozornost zaměřena na vývoj optimálních formulací FGF18 polypeptidu s cílem zvýšit jeho stabilitu přidávkem vhodných a kompatibilních stabilizačních aditiv. Příklady takových formulací reprezentují patentové dokumenty US9326944B2 (přídavek různých koncentrací sacharózy a surfaktantu poloxameru 188 do roztoku proteinu před lyofilizací), US9610357B2 (konjugáty funkčních fragmentů FGF18 polypeptidů s karboxypolysacharidy), WO2004032849A2 (formulace FGF18 s kyselinou hyaluronovou), WO2015097236A2 (formulace FGF18 v alginátových a kolagenových hydrogelech), US10293051B2 (formulace FGF18 v xyloglukanových hydrogelech), WO2015124739A1 (FGF18 v kolagenovém nosiči). Nízkou stabilitu FGF18 lze dále překonat přidávkem heparinu (Buchtova, M. et al., 2015, Cell Mol. Life Sci. 72(12): 2445-2459), který chrání protein před teplotní denaturací a prodlužuje jeho poločas života. Použití heparinu ale není u většiny buněk/tkání regulovaných FGF18 *in vivo* fyziologické. Kvůli antikoagulačním vlastnostem heparinu a riziku možných alergických reakcí není vhodné používat takové přípravky pro medicínské a kosmetické účely. Podobně je tomu i v případě stabilizačních aditiv, které mohou vyvolat nežádoucí odpověď imunitního systému, a tudíž jejich využití v terapeutických aplikacích může přinášet celou řadu komplikací.

Alternativní způsob stabilizace FGF18 polypeptidu bez přídavku aditiv představuje modifikace jeho proteinové sekvence metodami proteinového inženýrství. Tento způsob modifikace proteinu lze využít nejen k vylepšení stability proteinu, ale i jeho aktivity nebo receptorové specifity. Nejčastěji studovanými modifikacemi aminokyselinové sekvence FGF18 jsou funkčními fragmenty (i) zkrácené na N-terminálním konci o 28 až 56 aminokyselin s počáteční aminokyselinou vždy nahrazenou za methionin (WO2012038953A2) nebo (ii) zkrácené na C-terminálním konci o 0 až 32 aminokyselin (US8207115B2). Kromě N-terminálně zkrácených variant FGF18 polypeptidu vykazujících zvýšenou specifitu vůči FGFR-3C receptoru ve srovnání s FGF18 wt byla dále popsána FGF18 varianta obsahující kromě delece 50 N-terminálních aminokyselin i jednobodovou konzervativní substituci Leu52 za Ile (alternativně Val nebo Met) vykazující vyšší míru exprese a solubility v *E. coli* BL21(DE3) s nezměněnou biologickou aktivitou v porovnání s odpovídající zkrácenou variantou bez mutace (WO2012038953A2). Dále byly popsány varianty FGF18 polypeptidu bez N- nebo C-terminální delece s modifikovanou receptorovou specifitou obsahující substituce Asn136 a/nebo Asn137 za jiné aminokyseliny (WO2002036732A2). Efekt dosud popsaných aminokyselinových modifikací na stabilitu jednotlivých FGF18 variant však nebyl studován.

45 Podstata vynálezu

Předmětem předkládaného vynálezu je termostabilní polypeptid, který vychází z lidského FGF18 polypeptidu, který může být použit v regenerativní medicíně, biomedicínských aplikacích a kosmetice.

50 Lidský FGF18 polypeptid má aminokyselinovou sekvenci uvedenou zde jako SEQ ID NO. 1, čítající 207 aminokyselin:

55 MYSAPSACTC LCLHFLLLCF QVQVLVAEEN VDFRIHVENQ TRARDDVSRK
QLRLYQLYSR TSGKHIQVLG RRISARGEDG DKYAQLLVET DTFGSQVRIK

GKETEFYLCM NRKGKLVGKP DGTSKECVFI EKVLENNYTA LMSAKYSGWY
 VGFTKKGRPR KGPKTRENQQ DVHFMKRYPK GQPELQKPFK YTTVTKRSRR
 IRPTHPA (SEQ ID NO. 1)

- 5 V rámci předkládaného vynálezu byly nalezeny substituce (záměny) aminokyselin, které vedou k teplotní stabilizaci polypeptidů na bázi FGF18. Bylo zjištěno, že k významné teplotní stabilizaci vede současná přítomnost tří záměn aminokyselin: L141F, S147P a Q170P.

Dále jsou pro teplotní stabilizaci příznivé jedna nebo obě záměny aminokyselin Q85W, E105G.

10

Sekvence MYSAPSACTC LCLHFLLLCF QVQVLVA (SEQ ID NO. 2) v lidském FGF18 v sekvenci SEQ ID NO. 1 odpovídá signálnímu peptidu, který slouží k extracelulární translokaci proteinu a který je následně ze sekvence lidského vyzrálého proteinu proteolyticky odštěpen. Signální peptid tedy může či nemusí být v sekvenci polypeptidů na bázi FGF18 přítomen. V některých provedeních, jako např. v případě jeho rekombinantní produkce v *E. coli*, může být nahrazen jen aminokyselinou methioninem (M). Rovněž C-koncové aminokyseliny sekvence SEQ ID NO. 1 mohou být deletovány.

15

- Podle literatury se obecně za nejkratší funkční fragment FGF18 považuje polypeptid obsahující minimálně aminokyseliny Leu57-Met175 s nebo bez N-terminálního Met.

20

Dále je známo, že polypeptidy FGF18 různých savčích druhů mají při přiložení cca 90% sekvenční identitu, přičemž plní analogické funkce a mají obdobné biologické aktivity.

- 25 Předmětem předkládaného vynálezu je tedy termostabilní polypeptid mající nebo obsahující sekvenci o alespoň 90% sekvenční identitě se sekvencí:

LYSR TSGKHIQVLG RRISARGEDG DKYAQLLVET DTFGSQVRIK GKETEFYLCM
 NRKGKLVGKP DGTSKECVFI EKVLENNYTA FMSAKYPGWY VGFTKKGRPR
 30 KGPKTRENQP DVHFM (SEQ ID NO. 3)

30

přičemž aminokyseliny vyznačené tučně a podtržením musí být zachovány.

- Výhodně je celková délka sekvence polypeptidu do 227 aminokyselin, výhodněji do 207 aminokyselin.

35

Sekvence SEQ ID NO. 3 odpovídá fragmentu Leu57-Met175 sekvence SEQ ID NO. 1. Aminokyseliny vyznačené v sekvenci SEQ ID NO. 3 tučně jsou v pozicích 85, 91 a 114 této sekvence mutovány; což odpovídá záměnám aminokyselin L141F, S147P a Q170P v číslování dle sekvence SEQ ID NO. 1.

40

Termostabilní polypeptid pak v některých provedeních dále obsahuje alespoň jednu nebo obě z následujících záměn aminokyselin:

- 45 - záměnu aminokyseliny E v pozici 49 uvedené sekvence SEQ ID NO. 3 aminokyselinou G (odpovídá E105G v číslování dle sekvence SEQ ID NO. 1);

- záměnu aminokyseliny Q v pozici 29 uvedené sekvence SEQ ID NO. 3 aminokyselinou W (odpovídá Q85W v číslování dle sekvence SEQ ID NO. 1).

50

V některých provedeních může termostabilní polypeptid nést na N-konci sekvence SEQ ID NO. 3 alespoň část sekvence nebo celou sekvenci MYSAPSACTC LCLHFLLLCF QVQVLVAEEN VDFRIHVENQ TRARDDVSRK QLRLYQ (SEQ ID NO. 4). V dalších provedeních může termostabilní polypeptid nést na N-konci sekvence SEQ ID NO. 3 aminokyselinu methionin (M).

55

V některých provedeních může termostabilní polypeptid nést na C-konci sekvence SEQ ID NO. 3 alespoň část sekvence nebo celou sekvenci KRYPK GQPELQKPFK YTTVTKRSRR IRPHTPA (SEQ ID NO. 5). V některých provedeních může termostabilní polypeptid nést v N- nebo C-terminálních částech krátké fúzní aminokyselinové sekvence (tzv. kotvy) v maximální délce až 20 aminokyselin. Uvedená provedení prodloužení na N-konci a C-konci sekvence lze kombinovat.

Ve výhodném provedení je předmětem předkládaného vynálezu termostabilní polypeptid mající nebo obsahující sekvenci o alespoň 90% sekvenční identitě se sekvencí:

10 AEEN VDFRIHVENQ TRARDDVSRK QLRLYQLYSR TSGKHIQVLG RRISARGEDG
DKYAQLLVET DTFGSQVRIK GKETEFYLCM NRKGKLVGKP DGTSKECVFI
EKVLENNYTA FMSAKYPGWY VGFTKKGRPR KGPKTRENQP DVHFMKRYPK
GQPELQKPFK YTTVTKRSR (SEQ ID NO. 6)

15 přičemž aminokyseliny vyznačené tučně a podtržením musí být zachovány.

Výhodně je celková délka sekvence polypeptidu do 227 aminokyselin, výhodněji do 207 aminokyselin.

20 Sekvence SEQ ID NO. 6 odpovídá fragmentu sekvence SEQ ID NO. 1 bez signálního peptidu a s delecí C-terminálních 8 aminokyselin. Aminokyseliny vyznačené v sekvenci SEQ ID NO. 6 tučně jsou v pozicích 115, 121 a 144 této sekvence mutovány; což odpovídá záměnám aminokyselin L141F, S147P a Q170P v číslování dle sekvence SEQ ID NO. 1.

25 Termostabilní polypeptid pak v některých provedeních dále obsahuje alespoň jednu nebo obě z následujících záměn aminokyselin:

- záměnu aminokyseliny E v pozici 79 uvedené sekvence SEQ ID NO. 6 aminokyselinou G (odpovídá mutaci E105G v číslování dle sekvence SEQ ID NO. 1);

30 - záměnu aminokyseliny Q v pozici 59 uvedené sekvence SEQ ID NO. 6 aminokyselinou W (odpovídá mutaci Q85W v číslování dle sekvence SEQ ID NO. 1).

V některých provedeních může termostabilní polypeptid nést na N-konci sekvence SEQ ID NO. 6 alespoň část sekvence nebo celou sekvenci MYSAPSACTC LCLHFLLLCF QVQVLV (SEQ ID NO. 7). V dalších provedeních může termostabilní polypeptid nést na N-konci sekvence SEQ ID NO. 6 aminokyselinu methionin (M). V některých provedeních může termostabilní polypeptid nést na C-konci sekvence SEQ ID NO. 6 alespoň část sekvence nebo celou sekvenci RIRPHTPA (SEQ ID NO. 8). V některých provedeních může termostabilní polypeptid nést v N- nebo C-terminálních částech krátké fúzní aminokyselinové sekvence (tzv. kotvy) v maximální délce až 20 aminokyselin. Uvedená provedení prodloužení na N-konci a C-konci sekvence lze kombinovat.

45 V podrobném popisu i v příkladech provedení přihlášky se používá číslování záměn aminokyselin podle sekvence SEQ ID NO. 1, tj. vztažené na celou sekvenci lidského FGF18, a to i v případě použití zkrácených sekvencí.

Polypeptidy na bázi FGF18 podle předkládaného vynálezu vykazují nezměněnou biologickou aktivitu v buněčné kultuře BaF3 myších B-lymfocytů exprimujících FGFR-3C receptor, který je přirozeným ligandem FGF18 polypeptidu (viz Obrázky 2, 4, 6 a 7). Polypeptidy na bázi FGF18 podle předkládaného vynálezu rovněž vykazují nezměněnou biologickou aktivitu i po dlouhodobé preinkubaci při zvýšené teplotě (jako např. 37 °C nebo 50 °C) (viz Obrázek 8).

55 Termostabilní polypeptidy na bázi FGF18 podle předkládaného vynálezu jsou výhodné zejména kvůli tomu, že jsou významně stabilnější v porovnání s divokým typem FGF18. Tato stabilita je dána inherentní (vnitřní) stabilitou molekuly FGF18; žádné další sloučeniny podporující stabilitu

proteinu, jako například heparin, nemusí být přidány. Přitom zůstává zachována biologická aktivita FGF18. Předmětné polypeptidy na bázi FGF18 mohou být použity v klinických a výzkumných aplikacích.

- 5 Termostabilní polypeptidy na bázi FGF18 podle předkládaného vynálezu mají FGF18 aktivitu a zvýšenou teplotu tání o 9 až 16 °C v porovnání s polypeptidem divokého typu FGF18. Všechny termostabilní polypeptidy na bázi FGF18 podle předkládaného vynálezu byly konstruovány komerční syntézou genu a místně cílenou mutagenezí, klonovány do expresního vektoru pET28b, purifikovány (s čistotou $\geq 90\%$ podle SDS-PAGE analýzy) a následně charakterizovány z hlediska stability a biologické aktivity.

Výhodnější jsou polypeptidy na bázi FGF18 o celkové délce do 227 aminokyselin (výhodněji o celkové délce do 207 aminokyselin), mající nebo obsahující sekvence vybrané z SEQ ID NO. 6, a SEQ ID NO. 9 až SEQ ID NO. 11.

15 AEEN VDFRIHVENQ TRARDDVSRK QLRLYQLYSR TSGKHIQVLG RRISARGEDG
DKYAQLLVET DTFGSQVRIK GKETEFLYLCM NRKGKLVGKP DGTSKECVFI
EKVLENNYTA FMSAKYPGWY VGFTKKGRPR KGPKTRENQP DVHFMKRYPK
GQPELQKPFK YTTVTKRSR (SEQ ID NO. 6)

20 AEEN VDFRIHVENQ TRARDDVSRK QLRLYQLYSR TSGKHIQVLG RRISARGEDG
DKYAQLLVET DTFGSQVRIK GKETEFLYLCM NRKGKLVGKP DGTSKECVFI
EKVLENNYTA FMSAKYPGWY VGFTKKGRPR KGPKTRENQP DVHFMKRYPK
GQPELQKPFK YTTVTKRSR (SEQ ID NO. 9)

25 AEEN VDFRIHVENQ TRARDDVSRK QLRLYQLYSR TSGKHIQVLG RRISARGEDG
DKYAWLLVET DTFGSQVRIK GKETEFLYLCM NRKGKLVGKP DGTSKECVFI
EKVLENNYTA FMSAKYPGWY VGFTKKGRPR KGPKTRENQP DVHFMKRYPK
GQPELQKPFK YTTVTKRSR (SEQ ID NO. 10)

30 AEEN VDFRIHVENQ TRARDDVSRK QLRLYQLYSR TSGKHIQVLG RRISARGEDG
DKYAWLLVET DTFGSQVRIK GKETEFLYLCM NRKGKLVGKP DGTSKECVFI
EKVLENNYTA FMSAKYPGWY VGFTKKGRPR KGPKTRENQP DVHFMKRYPK
GQPELQKPFK YTTVTKRSR (SEQ ID NO. 11)

35

- V některých provedeních může termostabilní polypeptid nést na N-konci kterékoliv ze sekvencí SEQ ID NO. 6 a SEQ ID NO. 9 až 11 alespoň část sekvence nebo celou sekvenci MYSAPSACTC LCLHFLLLCF QVQVLV (SEQ ID NO. 7). V dalších provedeních může termostabilní polypeptid nést na N-konci kterékoliv ze sekvencí SEQ ID NO. 6 a 9 až 11 aminokyselinu methionin (M). V některých provedeních může termostabilní polypeptid nést na C-konci kterékoliv ze sekvencí SEQ ID NO. 6 a 9 až 11 alespoň část sekvence nebo celou sekvenci RIRPTHPA (SEQ ID NO. 8). V některých provedeních může termostabilní polypeptid nést v N- nebo C-terminálních částech krátké fúzní aminokyselinové sekvence (tzv. kotvy) v maximální délce až 20 aminokyselin.
- 45 Uvedená provedení prodloužení na N-koncích a C-koncích sekvencí lze kombinovat.

Biologická aktivita polypeptidů na bázi FGF18 podle předkládaného vynálezu může být kvantifikována hodnotou střední efektivní dávky (ED_{50}) pro proliferaci myších B-lymfocytů buněčné linie BaF3 exprimujících FGFR-3C receptor, přičemž hodnota ED_{50} pro tento efekt je ≤ 10 ng/ml.

50

Ve druhém aspektu předkládaný vynález poskytuje termostabilní polypeptidy na bázi FGF18 pro použití jako léčivo.

Zejména poskytuje předkládaný vynález termostabilní polypeptidy na bázi FGF18 pro použití v regenerativní medicíně, jako například pro léčbu poranění chrupavky či poranění kostí.

5 V dalších provedeních poskytuje předkládaný vynález termostabilní polypeptidy na bázi FGF18 pro použití v terapeutické stimulaci růstu vlasů, například pro léčbu i prevenci alopecie.

Dále předkládaný vynález poskytuje použití termostabilních polypeptidů na bázi FGF18 v kosmetice, zejména pro neterapeutickou stimulaci růstu vlasů.

10 Ve třetím aspektu předkládaný vynález poskytuje kultivační médium pro kultivace chondrocytů, zahrnující termostabilní polypeptid na bázi FGF18 podle předkládaného vynálezu, v koncentraci polypeptidu od 10 ng/ml do 1000 ng/ml v kultivačním médiu.

15 Podrobný popis vynálezu

Definice

20 Definice termínů, v této specifikaci použitých, jsou uvedeny níže. Pokud není definováno jinak, všechny technické a vědecké termíny zde použité mají stejný význam, jak je běžně chápáno odborníkem v oboru.

V aminokyselinových sekvencích v tomto textu jsou používány standardní jednopísmenné zkratky aminokyselin:

25

Aminokyselina A je alanin.

Aminokyselina C je cystein.

Aminokyselina D je kyselina asparagová.

Aminokyselina E je kyselina glutamová.

30

Aminokyselina F je fenylalanin.

Aminokyselina G je glycin.

Aminokyselina H je histidin.

Aminokyselina I je isoleucin.

Aminokyselina K je lysin.

35

Aminokyselina L je leucin.

Aminokyselina M je methionin.

Aminokyselina N je asparagin.

Aminokyselina P je prolin.

Aminokyselina Q je glutamin.

40

Aminokyselina R je arginin.

Aminokyselina S je serin.

Aminokyselina T je threonin.

Aminokyselina V je valin.

Aminokyselina W je tryptofan.

45

Aminokyselina Y je tyrosin.

Zde použitý termín „termostabilita“ je synonymum s termínem „teplotní stabilita“ polypeptidu a zahrnuje termodynamickou a kinetickou stabilitu polypeptidu. Termodynamická stabilita polypeptidu se vztahuje k rovnováze mezi molekulami polypeptidu nacházejícími se v nativním (z angl. native), tedy správně strukturně uspořádaném, stavu a denaturovaném (z angl. unfolded), tedy strukturně neuspořádaném nebo rozvolněném, stavu polypeptidu, a je definována jako rozdíl Gibbsovy volné energie mezi těmito dvěma stavy polypeptidu. Kinetická stabilita polypeptidu reflektuje rychlost (tedy kinetiku) procesu sbalování a denaturace (strukturního rozvolňování) proteinu a vztahuje se k energetické bariéře oddělující nativní stav polypeptidu od jeho nefunkčních

50

forem (nesložené nebo rozvolněné stavy polypeptidu, ireverzibilně denaturovaný polypeptid, agregovaný polypeptid).

5 Zde použitý termín „teplota tání“ (T_m , z angl. melting temperature) polypeptidu na bázi FGF18 označuje teplotu, při které je 50 % polypeptidu správně strukturně uspořádáno a 50 % polypeptidu neuspořádáno (denaturováno). Teplota tání je parametrem popisujícím termodynamickou stabilitu polypeptidu. T_m může být měřeno jakoukoli metodou vhodnou pro stanovení teploty tání, jako je např. spektroskopie cirkulárního dichroismu (CD), diferenční skenovací kalorimetrie (DSC) nebo 10 diferenční skenovací fluorimetrie (DSF). CD spektroskopie je metoda vhodná pro monitorování sekundární struktury a konformačních změn proteinů. DSC je termoanalytická metoda, která sleduje tepelné změny, které nastávají u proteinů v průběhu zvyšování nebo snižování teploty, kdy dochází k jejich strukturním změnám. DSF je metoda, která měří teplotní stabilitu terciární struktury proteinu sledováním změny přirozené fluorescence proteinu. I když tyto techniky 15 monitorují odlišné typy strukturních změn během teplotního rozkladu proteinu, relativní hodnoty ΔT_m vypočítané jako rozdíl T_m mezi referenčním divokým typem FGF18 a polypeptidem na bázi FGF18 podle stávajícího vynálezu jsou srovnatelné s variací menší než 1 °C.

Zde použitý termín „poločas proteolytického rozpadu“ polypeptidu na bázi FGF18 označuje čas 20 potřebný k 50% proteolytické degradaci (rozštěpení) FGF18 proteinu za definovaných podmínek procesu. Poločas proteolytického rozpadu je parametrem kinetické stability proteinu. Termíny „proteolytický rozpad“, „proteolytická degradace“ a „proteolytické štěpení“ jsou zde používány jako synonyma.

25 Zde použitý termín „divoký typ“ označuje přirozeně se vyskytující formu FGF18 polypeptidu s nejběžnější aminokyselinovou sekvencí mezi členy druhu.

V příkladech používaný divoký typ FGF18 je rekombinantní lidský FGF18 bez C-terminálních 8 aminokyselin (RIRPHTPA, SEQ ID NO. 8) se sekvencí:

30 AEEN VDFRIHVENQ TRARDDVSRK
QLRLYQLYSR TSGKHIQVLG RRISARGEDG DKYAQLLVET DTFGSQVRIK
GKETEFYLCM NRKGKLVGKP DGTSKECVFI EKVLENNYTA LMSAKYSGWY
VGFTKKGRPR KGPKTRENQQ DVHFMKRYPK GQPELQKPFK YTTVTKRSR (SEQ ID
NO. 12)

35 s molekulovou hmotností 20,1 kDa a délkou 173 aminokyselin nebo jeho analog, který na svém

N-terminálním konci obsahuje His-tag a štěpicí místo pro trombin a na svém C-terminálním konci

40 obsahuje celou sekvenci RIRPHTPA (SEQ ID NO. 8), odpovídající sekvenci:

MGSSHHHHHH SSGLVPRGSH MAEENVDFRI HVENQTRARD DVSRKQLRLY
QLYSRTSGKH IQVLGRRISA RGEDGDKYAQ LLVETDTFGS QVRIKKGKETE
FYLCMNRKGK LVGKPDGTSK ECVFIEKVLE NNYTALMSAK YSGWYVGFTK
45 KGRPRKGPKT RENQQDVHFM KRYPKGQPEL QKPFKYTTVT KRSSRIRPHTPA (SEQ ID
NO. 13)

s molekulovou hmotností 23,4 kDa a délkou 202 aminokyselin.

50 Krátké fúzní aminokyselinové sekvence (tzv. kotvy) v maximální délce až 20 aminokyselin usnadňují expresi a purifikaci rekombinantního polypeptidu. Odborníku v oboru je známo, že obecně připojením kotvy na N- nebo C-terminální konec polypeptidu nedojde k významnému ovlivnění jeho biologické funkce. Kotvy jsou v oboru obecně známy, stejně jako jejich sekvence a jejich použití, a zahrnují např. ALFA-tag, AviTag, C-tag, polyglutamátový tag, polyargininový tag, E-tag, FLAG-tag, HA-tag, His-tag, Myc-tag, NE-tag, Rho1D4-tag, S-tag, Softag1, Softag3, Spot-

tag, Strep-tag, T7-tag, TC tag, Ty tag, V5 tag, VSV-tag, Xpress tag, Isopeptag, SpyTag, SnoopTag, DogTag, nebo SdyTag.

5 Zde použitý termín „polypeptid na bázi FGF18“ označuje polypeptid, který má FGF18 aktivitu a obsahuje sekvenci nebo má sekvenci mající alespoň 90% sekvenční identitu se SEQ ID NO. 3 nebo SEQ ID NO. 6.

10 V příkladech použitý termín „tříbodový mutant FGF18“ nebo „FGF18 3b“ označuje FGF18 polypeptid nesoucí následující aminokyselinové substituce: L141F, S147P a Q170P ve srovnání s divokým typem FGF18. Tříbodový mutant FGF18 má sekvenci:

15 MAEENVDFRI HVENQTRARD DVSRKQLRLY QLYSRTSGKH IQVLGRRISA
RGEDGDKYAQ LLVETDTFGS QVRIK GKETE FYLCMNRK GK LVGKPDGTSK
ECVFIEK VLE NNYTAFM SAK YPGWYVGFTK KGRPRKGPKT RENQPDVHFM
KRYPKGQPEL QKPFKYTTVT KRSRRIRPTH PA (SEQ ID NO. 14)

V příkladech použitý termín „zkrácená varianta tříbodového mutantu FGF18“ nebo „FGF18 3b+ Δ 8^{C-terminus}“ označuje FGF18 polypeptid se sekvencí

20 MAEENVDFRI HVENQTRARD DVSRKQLRLY QLYSRTSGKH IQVLGRRISA
RGEDGDKYAQ LLVETDTFGS QVRIK GKETE FYLCMNRK GK LVGKPDGTSK
ECVFIEK VLE NNYTAFM SAK YPGWYVGFTK KGRPRKGPKT RENQPDVHFM
KRYPKGQPEL QKPFKYTTVT KRSR (SEQ ID NO. 15)

25 Tato sekvence zahrnuje následující aminokyselinové substituce vůči divokému typu FGF18: L141F, S147P a Q170P, a dále zahrnuje delecí 8 aminokyselin v C-terminální části.

30 V příkladech použitý termín „čtyřbodový mutant FGF18“ nebo „FGF18 3b+E105G“ nebo „FGF18 3b+Q85W“ označuje FGF18 polypeptid zahrnující vždy následující tři aminokyselinové substituce: L141F, S147P, Q170P v kombinaci buď s mutací E105G nebo s mutací Q85W, ve srovnání s divokým typem. Konkrétněji je to polypeptid se sekvencí SEQ ID NO. 16 (zahrnující mutace L141F, S147P, Q170P a E105G) nebo polypeptid se sekvencí SEQ ID NO. 17 (zahrnující mutace L141F, S147P, Q170P a Q85W).

35 MAEENVDFRI HVENQTRARD DVSRKQLRLY QLYSRTSGKH IQVLGRRISA
RGEDGDKYAQ LLVETDTFGS QVRIK GKETG FYLCMNRK GK LVGKPDGTSK
ECVFIEK VLE NNYTAFM SAK YPGWYVGFTK KGRPRKGPKT RENQPDVHFM
KRYPKGQPEL QKPFKYTTVT KRSRRIRPTH PA (SEQ ID NO. 16)

40 MAEENVDFRI HVENQTRARD DVSRKQLRLY QLYSRTSGKH IQVLGRRISA
RGEDGDKYAW LLVETDTFGS QVRIK GKETE FYLCMNRK GK LVGKPDGTSK
ECVFIEK VLE NNYTAFM SAK YPGWYVGFTK KGRPRKGPKT RENQPDVHFM
KRYPKGQPEL QKPFKYTTVT KRSRRIRPTH PA (SEQ ID NO. 17)

45 V příkladech použitý termín „pětibodový FGF18 mutant“ nebo „FGF18 5b“ označuje FGF18 polypeptid zahrnující následující aminokyselinové substituce: L141F, S147P, Q170P, E105G a Q85W ve srovnání s divokým typem. V příkladech je to polypeptid se sekvencí SEQ ID NO. 18.

50 MAEENVDFRI HVENQTRARD DVSRKQLRLY QLYSRTSGKH IQVLGRRISA
RGEDGDKYAW LLVETDTFGS QVRIK GKETG FYLCMNRK GK LVGKPDGTSK
ECVFIEK VLE NNYTAFM SAK YPGWYVGFTK KGRPRKGPKT RENQPDVHFM
KRYPKGQPEL QKPFKYTTVT KRSRRIRPTH PA (SEQ ID NO. 18)

55 Tříbodový, dva čtyřbodové a pětibodový mutant jsou také označovány v příkladech či tabulkách výčtem odpovídajících mutací vůči divokému typu.

Zde použitý termín „polypeptid na bázi FGF18“ je synonymem s „FGF18 mutant“ a označuje modifikovanou polypeptidovou sekvenci vykazující jakékoli substituce podle předkládaného vynálezu v porovnání s referenční přirozeně se vyskytující sekvencí divokého typu FGF18 (SEQ ID NO:1). Polypeptidy na bázi FGF18 jsou zejména polypeptidy spadající do rozsahu nároků této patentové přihlášky.

Zde použitý termín „polypeptid“ je synonymem s „protein“.

Zde použitý termín „aktivita FGF18“ je synonymem s termínem „biologická aktivita FGF18“. Myslí se tím biologická aktivita FGF18 polypeptidů nebo polypeptidů na bázi FGF18 podle předkládaného vynálezu. Aktivním (funkčním) polypeptidem se myslí intaktní část aminokyselinové sekvence a struktury předmětného FGF18 proteinu nesoucí všechny funkčně významné aminokyseliny zodpovědné za vazbu na buňku a interakci s heparan sulfáty nebo jejich strukturním analogem heparinem. Biologická aktivita polypeptidů na bázi FGF18 je založena na jejich schopnosti vázat se (interagovat) alespoň s jedním z FGF receptorů, FGFR 1-3, nacházejících se na povrchu buněk. Z izoform FGF receptorů „B“ (IIIB) a „C“ (IIIC), vzniklých alternativním sestřihem extracelulární imunoglobulinové domény III, vykazují předmětné FGF18 polypeptidy nejvyšší vazebnou specifitu k FGFR-3C receptoru. Vazebná interakce polypeptidů na bázi FGF18 s FGF receptory vede k dimerizaci a autofosforylaci těchto receptorů, konkrétně k fosforylaci jejich tyrosin kinázové domény. Tímto způsobem aktivované FGF receptory následně indukují intracelulární signální dráhu vedoucí k fosforylaci i dalších proteinů (jako např. Raf-1, MEK a ERK), které stimulují proliferaci, mobilitu a diferenciaci buněk, což je nezbytné pro jejich správnou biologickou funkci *in vivo*, ale i *in vitro*. Takové buňky mohou zahrnovat například buňky mezenchymálního původu, zejména chondrocyty a osteocyty a buňky s chondrogenním a osteogenním potenciálem, dále také buňky ve specifických mozkových oblastech, játrech, tenkém střevě, v plicních alveolech a další, známé ve stavu techniky tím, že exprimují jeden nebo více FGF receptorů nebo jsou jiným způsobem responzivní na FGF18. Biologickou aktivitu dle předkládaného vynálezu lze měřit metodami známými ve stavu techniky, například testem buněčné proliferace nebo diferenciaci buněk nebo alternativně fosforylací substrátu.

Polypeptid na bázi FGF18 podle předkládaného vynálezu je považován za mající biologickou aktivitu FGF18, pokud má hodnotu ED₅₀ měřenou testem buněčné proliferace s využitím buněčné linie BaF3 myších B-lymfocytů exprimujících FGFR-3C receptor (Ellsworth, J. L. et al. 2002, *Osteoarthritis and Cartilage* 10: 308-320) ≤ 10 ng/ml, což v případě komerčně dostupného FGF18 wt (SEQ ID NO. 12) koresponduje s hodnotou $\leq 0,50$ nM a v případě rekombinantně připraveného FGF18 wt (SEQ ID NO. 13) s hodnotou $\leq 0,43$ nM.

Termín „střední efektivní dávka“ je synonymem s „ED₅₀“ a vyjadřuje koncentraci polypeptidu na bázi FGF18 nebo jeho fragmentu nebo jeho varianty potřebnou k vyvolání 50 % biologického účinku, tedy k dosažení 50 % maximální biologické aktivity.

Pro biologickou aktivitu je potřebná přítomnost funkčního fragmentu FGF18 polypeptidu, který si zachovává FGF18 aktivitu. Funkčním fragmentem se myslí intaktní část FGF18 polypeptidové sekvence a struktury nesoucí všechny funkčně významné aminokyseliny, tedy aminokyseliny zodpovědné za interakci proteinu s FGF receptory a interakci s heparan sulfáty. Z literatury je známo, že biologická aktivita zůstává zachována i po N-terminální delecí až 56 aminokyselin, nebo C-terminální delecí až 32 aminokyselin, nebo jejich kombinace. Podle stávajícího poznání lze za nejkratší funkční fragment považovat FGF18 polypeptid obsahující minimálně aminokyseliny Leu57-Met175 s nebo bez N-terminálního methioninu (číslováno dle SEQ ID NO. 1). Funkční fragmenty FGF18 u savců mají při přiložení cca 90% sekvenční identitu s referenční sekvencí (příslušný funkční fragment sekvence SEQ ID NO. 1). 90% sekvenční identita tedy nenarušuje biologickou aktivitu. V některých provedeních se jedná o alespoň 95%, 96%, 97%, 98%, 99% nebo 100% sekvenční identitu. Polypeptid na bázi FGF18 podle předkládaného vynálezu dále vykazuje také alespoň tři nebo více substitucí v určených pozicích pro zvýšení termostability. Tyto

substituované polypeptidy na bázi FGF18 podle předkládaného vynálezu mají zvýšenou teplotu tání, například T_m zvýšenou o alespoň 9 °C, nebo o alespoň 14 °C, nebo o alespoň 16 °C v porovnání s divokým typem FGF18 (nebo jeho odpovídajícím fragmentem), a také jsou schopny vázat se na alespoň jeden FGF receptor přítomný na povrchu buňky a spustit růst, proliferaci nebo přežití kultivovaných buněk vzhledem k neošetřeným kontrolním buňkám.

Zde použitý termín „mutant“ je synonymem s „varianta“ a označuje polypeptidy na bázi FGF18 nesoucí stabilizující aminokyselinové substituce dle předkládaného vynálezu, které mají zachovanou biologickou aktivitu. Dále mohou polypeptidy na bázi FGF18 nést další mutace (bodové substituce, bodové inserce a bodové delece), pokud je zachována alespoň 90% sekvenční identita v oblasti funkčního fragmentu, tj. v oblasti sekvence SEQ ID NO. 3, resp. sekvence SEQ ID NO. 6. To znamená, že polypeptidy na bázi FGF18 nesou stabilizující aminokyselinové substituce dle stávajícího vynálezu, a alespoň 90 % nebo více % aminokyselin funkčního fragmentu (tj. sekvence SEQ ID NO. 3, resp. sekvence SEQ ID NO. 6). 10% sekvenční variabilita je výhodně reprezentována tzv. konzervativními substitucemi, kdy má nově vkládaná aminokyselina podobné fyzikálně-chemické vlastnosti jako původní nahrazovaná aminokyselina, a u nichž se dle stávajícího poznání v oboru předpokládá nulový nebo minimální dopad na aktivitu a stabilitu proteinu. Příklady konzervativních substitucí zahrnují substituce jedné aminokyseliny s hydrofobním postranním řetězcem za jinou aminokyselinu s hydrofobním postranním řetězcem, nebo substituce jedné nabitě nebo polární aminokyseliny za jinou nabitou nebo polární aminokyselinu. Za konzervativní substituce lze považovat například substituce aminokyselin v rámci každé z následujících skupin: (i) glycin, alanin, valin, leucin a isoleucin, (ii) fenylalanin, tyrosin a tryptofan, (iii) serin a threonin, (iv) kyselina asparagová a kyselina glutamová, (v) glutamin a asparagin a (vi) lysin, arginin a histidin.

Termín „sekvenční identita“ jak je v oboru známo, je vztah mezi dvěma polypeptidovými sekvencemi vyjadřující procentuální aminokyselinovou poziční identitu zjištěnou z porovnání příložených sekvencí. Procenta sekvenční identity jsou vypočtena podílem počtu vzájemně si odpovídacích pozic, ve kterých se nachází identické aminokyseliny v porovnávaných sekvencích, a celkového počtu pozic v segmentu, který je porovnáván s referenční sekvencí, kdy získaný výsledek se následně vynásobí 100. Procentuální sekvenční identita může být snadno vypočtena bioinformatickými metodami známými v oboru techniky. Metody pro zjištění sekvenční identity jsou zakódovány ve veřejně dostupných počítačových programech. Výhodné metody založené na počítačových programech zahrnují bez omezení např. BLASTP, MatGAT, Water (EMBOSS), Matcher (EMBOSS), LALIGN. Pro zjištění sekvenční identity může být také použit dobře známý Smith - Watermanův algoritmus.

Aminokyselinová sekvence podle předkládaného vynálezu může být identická s referenční sekvencí FGF18 polypeptidu, tj. může mít 100% identitu, nebo může obsahovat až do určitého celočíselného počtu aminokyselinových změn (odpovídacích max. 10% sekvenční variabilitě) ve srovnání s referenční sekvencí, takže procento sekvenční identity je nižší než 100 %. Tyto změny se volí ze skupiny alespoň jedné substituce, včetně konzervativní a nekonzervativní substituce, delece, nebo inserce, přičemž uvedené změny se mohou vyskytovat v N-terminálních nebo C-terminálních pozicích referenčního polypeptidu, nebo kdekoli mezi těmito koncovými částmi referenčního polypeptidu, rozprostřené buď jednotlivě mezi aminokyselinami referenčního polypeptidu nebo v jedné nebo více souvislých skupinách referenční sekvence.

U savců, jako např. člověka, opic, myši, krys, králíků, prasat nebo krav jsou sekvence FGF18 polypeptidů vysoce konzervované, s 90% nebo vyšší sekvenční identitou v široké škále jednotlivých savčích druhů. Odborníku v oboru bude zřejmé, že 10% sekvenční variabilita (odpovídající v tomto vynálezu popsané 90% sekvenční identitě) funkčního fragmentu může být také dosažena použitím sekvence FGF18 polypeptidu z jiného savčího druhu než člověka.

Polypeptidy na bázi FGF18 mohou být připraveny genovou syntézou nebo mutagenezí. Obecně je gen kódující polypeptid na bázi FGF18 klonován do expresního vektoru a následně exprimován

v transformovaných hostitelských organismech, výhodně v mikroorganismech. Hostitelský organismus exprimuje cizí gen za produkce FGF18 při daných expresních podmínkách. Gen kódující polypeptid na bázi FGF18 může být také připraven v eukaryotech, jako například v kvasinkách nebo v lidských buňkách.

5

Níže je uveden příklad nukleotidové sekvence rekombinantního divokého typu FGF18 (5'-3') s částí expresního vektoru pET28b. Start kodon atg a stop kodon TAA jsou označeny šedě, N-terminální His-tag (6 x His) je označen tučně s podtržením, štěpicí místo pro trombin je označeno černě a restriční místa pro NcoI, NdeI a XhoI umožňující klonování do expresního vektoru pET28b jsou podtržena (ccatgg – 5' NcoI, CATATG - 5' NdeI a CTCGAG - 3' XhoI). Kódující sekvence divokého typu FGF18 začíná start kodonem atg a končí stop kodonem TAA.

10

CcatgggcagcagccatcatcatcatcacagcagcggcctgggtgccgcgcgccagcCATATGGCCGAAGAAA
 ATGTGGATTTTCGCATCCATGTTGAAAATCAGACCCGTGCACGTGATGATGTTAGCC
 15 GTAAACAGCTGCGTCTGTATCAGCTGTATAGCCGTACCAGCGGTAACATATTCAGG
 TTCTGGGTCGTCGTATTAGCGCACGTGGTGAAGATGGTGATAAATATGCACAGCTGC
 TGGTTGAAACCGATACCTTTGGTAGCCAGGTTCTGATTAAGGTAAGAAACCGAAT
 TCTATCTGTGCATGAACCGCAAAGGTAAACTGGTTGGTAAACCGGATGGCACCAGCA
 AAGAATGTGTGTTTATTGAAAAAGTGCTGGAAAACAACACTACACCGCACTGATGAGC
 20 GCAAAATATAGCGGTTGGTATGTTGGCTTTACCAAAAAGGTCGTCCGCGTAAAGGT
 CCGAAAACACGCGAAAATCAGCAGGATGTTTCATTTTCATGAAGCGTTATCCGAAAGGT
 CAGCCGGAACACTGCAGAAACCGTTCAAATATACCACCGTTACCAACGTAGCCGTCGT
 ATTCGTCCGACACATCCGGCATAAATAGCTCGAG (SEQ ID NO. 19)

25

FGF18 polypeptid použitý pro inzeraci substitucí zde popsaných může být z jakéhokoli savčího zdroje, jako například myši, krys, králíků, primátů, prasat, psů, krav, koní a lidí. Výhodně je FGF18 polypeptid odvozen z lidského zdroje. Mohou být však použity jakékoli biologicky aktivní varianty savčího FGF18 polypeptidu s alespoň 90% nebo s 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% nebo 100% aminokyselinovou sekvenční identitou k aminokyselinové sekvenci lidského proteinu FGF18 (SEQ ID NO. 1) nebo jejím funkčním fragmentům (např. SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 6)

30

Následující příklady prezentují charakterizaci polypeptidů na bázi FGF18, demonstrují účinek vložených substitucí na stabilitu a aktivitu polypeptidů a dále způsob jejich využití v kultivaci chondrocytů. Primární myši chondrocyty použité v příkladech byly připraveny dle Mirando, A.J., et al., 2014, Mol. Biol., 1130: 267-277, BaF3 myši lymfocyty exprimující hlavní varianty FGF receptorů byly připraveny dle Ornitz, D. M. et al. 1996, J. Biol. Chem. 271(25): 15292-15297.

35

40 Objasnění výkresů

Obrázek 1 ukazuje SDS-PAGE gely po expresi a purifikaci FGF18 wt a tříbodového mutantu FGF18 (3b) nesoucího mutace L141F+S147P+Q170P. Rekombinantně produkovaný FGF18 wt (odpovídající sekvenci SEQ ID NO. 13), stejně jako jeho mutant, obsahuje 202 aminokyselin (včetně N-terminální histidinové kotvy a štěpicího místa pro trombin) a má molekulovou hmotnost 23,4 kDa (viz šipka v obrázku). Sloupec wt: rekombinantní FGF18 wt; sloupec 3b: tříbodový mutant FGF18 (L141F+S147P+Q170P); sloupec Mw: hmotnostní marker.

45

Obrázek 2 ukazuje porovnání biologické aktivity tříbodového mutantu FGF18 (3b) (z prvního kola designu) s rekombinantně připraveným FGF18 wt (odpovídající sekvenci SEQ ID NO. 13) a komerčně dostupným FGF18 wt (odpovídající sekvenci SEQ ID NO. 12). Biologická aktivita FGF18 proteinů byla měřena testem proliferace s využitím BaF3 buněk exprimujících FGFR-3C receptor. Graf zobrazuje data ze dvou nezávislých opakování (každý bod pak průměr z celkem 12 hodnot). Naměřená data byla použita jako podklad pro stanovení střední efektivní dávky EC₅₀

50

(FGF18 wt (SEQ ID NO. 12) 5,4 ng/ml; FGF18 wt (SEQ ID NO. 13) 3,1 ng/ml; FGF18 3b 3,2 ng/ml.

5 Obrázek 3 ukazuje SDS-PAGE gel po expresi a purifikaci zkrácené varianty třibodového mutanta FGF18 nesoucího mutace L141F+S147P+Q170P a C-terminální delecí 8 aminokyselin (3b+ $\Delta^{C\text{-terminus}}$). Rekombinantní třibodový mutant FGF18 (L141F+S147P+Q170P) s C-terminální delecí obsahuje 194 aminokyselin (včetně N-terminální histidinové kotvy a štěpicího místa pro trombin) a má molekulovou hmotnost 22,5 kDa. Sloupec CE: bezbuněčný extrakt; sloupec 3b+ $\Delta^{C\text{-terminus}}$: třibodový mutant FGF18 (L141F+S147P+Q170P) s delecí 8 aminokyselin na C-terminálním konci; sloupec Mw: hmotnostní marker.

15 Obrázek 4 ukazuje porovnání biologické aktivity FGF18 wt (SEQ ID NO. 12), třibodového mutanta FGF18 3b (L141F+S147P+Q170P) a zkrácené varianty třibodového mutanta FGF18 nesoucího mutace L141F+S147P+Q170P a C-terminální delecí 8 aminokyselin (3b+ $\Delta^{C\text{-terminus}}$). Biologická aktivita FGF18 proteinů byla měřena testem proliferace s využitím BaF3 buněk exprimujících FGFR-3C receptor. Graf zobrazuje data ze čtyř nezávislých opakování.

20 Obrázek 5 ukazuje SDS-PAGE gely po purifikaci FGF18 wt, třibodového mutanta FGF18 (3b) nesoucího mutace L141F+S147P+Q170P, čtyřbodového mutanta FGF18 (3b+E105G) nesoucího mutace jako mutant třibodový (L141F+S147P+Q170P) + mutaci E105G, čtyřbodového mutanta FGF18 (3b+Q85W) nesoucího mutace jako mutant třibodový (L141F+S147P+Q170P) + mutaci Q85W a pětibodového mutanta FGF18 (5b) nesoucího mutace L141F+S147P+Q170P+E105G+Q85W. Rekombinantně produkováný FGF18 wt (odpovídající sekvenci SEQ ID NO. 13), stejně jako jeho mutanti, obsahuje 202 aminokyselin (včetně N-terminální histidinové kotvy a štěpicího místa pro trombin) a má molekulovou hmotnost 23,4 kDa. Sloupec 3b: třibodový mutant FGF18 (L141F+S147P+Q170P); sloupec 3b+E105G: čtyřbodový mutant FGF18 nesoucí mutace jako mutant třibodový a mutaci E105G; sloupec 3b+Q85W: čtyřbodový mutant FGF18 nesoucí mutace jako mutant třibodový a mutaci Q85W; sloupec 5b: pětibodový mutant FGF18 (L141F+S147P+Q170P +E105G+Q85W); sloupec Mw: hmotnostní marker.

35 Obrázek 6 ukazuje porovnání biologické aktivity pětibodového mutanta FGF18 5b (L141F+S147P+Q170P+E105G+Q85W) s rekombinantně připraveným FGF18 wt (odpovídající sekvenci SEQ ID NO. 13) a komerčně dostupným FGF18 wt (odpovídající sekvenci SEQ ID NO. 12). Biologická aktivita FGF18 proteinů byla měřena testem proliferace s využitím BaF3 buněk exprimujících FGFR-3C receptor. Graf zobrazuje data ze tří nezávislých opakování.

40 Obrázek 7 ukazuje výsledky testování receptorové specifity FGF18 wt (SEQ ID NO. 12), třibodového mutanta FGF18 3b (L141F+S147P+Q170P) a pětibodového mutanta FGF18 5b (L141F+S147P+Q170P+E105G+Q85W). Buněčné linie BaF3 myších B-lymfocytů exprimujících hlavní varianty FGF receptorů: FGFR-1B, 1C, 2B, 2C, 3B a 3C byly stimulovány testovanými FGF18 variantami v koncentracích 0 až 10 nM za přítomnosti heparinu (2 μ g/ml) po dobu 48 hodin. Buněčná proliferace indukovaná jednotlivými proteiny byla detekována pomocí proliferacího testu s využitím resazurinu. Grafy znázorňují naměřené hodnoty fluorescence metabolizovaného resazurinu.

50 Obrázek 8 ukazuje testování *in vitro* stability pětibodového mutanta FGF18 5b (Q85W+E105G+L141F +S147P+Q170P) ve srovnání s FGF18 wt (SEQ ID NO. 12) v buněčné kultuře BaF3 exprimující FGFR-3C receptor. Grafy znázorňují schopnost proteinů indukovat buněčnou proliferaci po preinkubaci proteinů při různých teplotách (v koncentraci 100 μ g/ml).

55 Obrázek 9 ukazuje resistenci (odolnost) pětibodového mutanta FGF18 5b nesoucího mutace L141F+S147P+Q170P+E105G+Q85W vůči proteolytické degradaci trypsinem ve srovnání s FGF18 wt (SEQ ID NO. 13). FGF18 polypeptidy byly štěpeny trypsinem při 37 °C v molárním poměru 1:20. Produkty degradační reakce byly vizualizovány pomocí SDS-PAGE analýzy a

následně kvantifikovány denzitometrickou analýzou. Stanovený poločas proteolytického rozpadu pětibodového mutantu FGF18 5b byl šestnáctkrát vyšší ve srovnání s FGF18 wt.

5 Obrázek 10 ukazuje porovnání proliferace myších chondrocytů po 19denní stimulaci pětibodovým mutantem FGF18 5b (L141F+S147P+Q170P+E105G+Q85W) a FGF18 wt (SEQ ID NO. 13). Oba proteiny byly testovány v koncentraci 1000 ng/ml.

10 Příklady uskutečnění vynálezu

Příklad 1. In silico design stabilizujících mutací v FGF18

Pro první kolo in-silico designu potenciálně stabilizujících mutací v proteinu FGF18 byla použita aminokyselinová sekvence lidského FGF18 (<http://www.uniprot.org/uniprot/O76093>) a krystalová
15 struktura (PDB ID 4CJM) v rozlišení 2,7 Å začínající 50. aminokyselinou a končící 190. aminokyselinou. Struktura proteinu byla před výpočty upravena odstraněním ligandů (iontů) a molekul vod. Pro výpočty byly použity všechny čtyři proteinové řetězce, přičemž výpočty probíhaly na každém řetězci zvlášť. Stabilizační účinky všech možných jednobodových mutací v jednotlivých pozicích proteinu byly nejprve analyzovány výpočtem změny Gibbsovy volné
20 energie ($\Delta\Delta G$) po vnesení příslušné jednobodové mutace do proteinu s využitím metody na principu empirického silového pole, kdy hranice $\Delta\Delta G$ pro stabilizující mutace byla stanovena na hodnotu menší než 0 kcal.mol⁻¹. Vnitromolekulární interakce byly dále analyzovány na základě posouzení jejich geometrických parametrů a veškeré mutace, které by narušovaly tyto interakce, byly vyřazeny z dalších analýz. Stejně tak byly vyřazeny mutace v residuích důležitých pro
25 biologickou funkci proteinu (např. residua zodpovědná za interakci s receptory či heparan sulfáty). V dalším kroku byly provedeny výpočty $\Delta\Delta G$ metodou založenou na principu fyzikálního silového pole zohledňujícím flexibilitu proteinové páteře. Hodnota minimální energie z celkem 50 iterací byla použita jako finální parametr popisující stabilizační efekt. Současně byla analyzována konzervovanost jednotlivých residuů v daných pozicích analýzou mnohonásobného sekvenčního
30 příložením pomocí Jensen-Shannon divergence algoritmus. Pro finální výběr stabilizujících mutací byla použito následující kritérium, při kterém změna energie ($\Delta\Delta G$) predikovaná oběma metodami byla menší než 0 kcal/mol, hodnota konzervovanosti residua na dané pozici byla ≤ 8 a vnesené mutace nezpůsobily narušení solných můstků. Tímto kritériem bylo identifikováno 19 stabilizujících mutací, ze kterých byly vybrány 3, které byly zkombinovány do tříbodové varianty
35 (L141F+S147P+Q170P). Číslování mutací odpovídá sekvenci lidského FGF18 (SEQ ID NO:1).

Tabulka 1. Přehled stabilizačních mutací FGF18 vybraných v prvním kole in silico designu. Mutace vybrané pro konstrukci tříbodového mutantu jsou zvýrazněny tučně.

Substituce	Metoda empiric-kého silového pole $\Delta\Delta G$ (kcal/mol)	Metoda fyzikálního silového pole $\Delta\Delta G$ (kcal/mol)	Konzervovanost	Aminokyseliny vyskytující se na dané pozici (z MSA)
R71F	-0,053	-1,868	5	N,P,K,G,Q,R,L
R71M	-0,258	-0,403	5	N,P,K,G,Q,R,L
R71P	-0,898	-1,834	5	N,P,K,G,Q,R,L
R71W	-0,341	-2,842	5	N,P,K,G,Q,R,L
R72Q	-0,040	-2,639	5	Y,S,R,D,P,T,A,N,K
S74F	-0,067	-1,231	5	M,T,N,K,G,S,V,L,R,D
Y83F	-0,365	-0,039	6	H,Y,F,N
Q85W	-0,235	-2,799	7	E,Q,R,L,S,K,N,T
Q96F	-0,719	-2,005	7	H,Q,R,K
Q96Y	-0,283	-2,401	7	H,Q,R,K

T104V	-0,093	-0,174	8	P,T,S
V128I	-0,067	-0,483	5	A,M,T,F,I,L,Q,Y,V
V128W	-0,028	-3,044	5	A,M,T,F,I,L,Q,Y,V
L141F	-1,431	-3,087	7	F,Y,L,W,H
L141Y	-1,537	-2,159	7	F,Y,L,W,H
S147P	-1,819	-2,191	1	T,A,N,K,G,V,S,L,R,D,E,P
S147Y	-1,100	-1,152	1	T,A,N,K,G,V,S,L,R,D,E,P
R166S	-0,411	-1,064	5	I,H,Q,L,R,S,G,K,A,T
Q170P	-1,944	-1,750	7	E,K,N,R,Q,G

Pro druhé kolo in silico designu potenciálně stabilizujících mutací v proteinu FGF18 byl jako templát použit třibodový mutant, jehož stabilita byla ve srovnání s FGF18 wt o 9 °C vyšší se současným zachováním biologické aktivity (viz příklady 3 a 4 níže). Strukturní modely třibodového mutantu FGF18 byly predikovány softwarem Rosetta s využitím Protokolu 16. Z predikovaných strukturních modelů byly následně vybrány 3 modely s nejnižší energií, které byly použity pro výpočty stabilizujících mutací oběma metodami silových polí, stejně jako v prvním kole in silico designu. Pro finální výběr stabilizujících mutací bylo použito přísnější kritérium, tedy změna energie ($\Delta\Delta G$) predikovaná oběma metodami nižší než -1,0 kcal/mol, hodnota konzervovanosti rezidua na dané pozici ≤ 7 a neporušení solných můstků. Tímto kritériem byly identifikovány dvě nové stabilizující mutace.

Tabulka 2. Stabilizační mutace FGF18 vybrané ve druhém kole in silico designu, kde byl jako templát použit třibodový mutant FGF18 (L141F+S147P+Q170P) identifikovaný v prvním kole designu.

Substituce	Metoda empirického silového pole $\Delta\Delta G$ (kcal/mol)	Metoda fyzikálního silového pole $\Delta\Delta G$ (kcal/mol)	Konzervovanost	Aminokyseliny vyskytující se na dané pozici (z MSA)
Q85W	-1,04	-2,54	7	E,Q,R,L,S,K,N,T
E105G	-2,08	-1,91	2	K,G,P,D,Q,S,R,N,E,A

Příklad 2. Syntéza třibodového mutantu FGF18 z prvního kola in silico designu, jeho exprese a purifikace afinitní chromatografií

Gen kódující navržený třibodový mutant FGF18 (nesoucí mutace L141F+S147P+Q170P) byl komerčně syntetizován. Expresní plazmidy (pET28b) nesoucí gen kódující třibodovou variantu FGF18 nebo FGF18 wt byly transformovány do chemokompetentních buněk *E. coli* BL21(DE3) (New England Biolabs). Buňky byly vysety na agarové misky s obsahem kanamycinu (50 $\mu\text{g/ml}$) a následně inkubovány přes noc při 37 °C. Další den bylo vždy jednou kolonií zaočkováno 10 ml LB media s kanamycinem. Buňky byly kultivovány přes noc při 37 °C za stálého třepání. Noční kultura byla použita k zaočkování LB média s kanamycinem. Kultivace probíhala za stálého třepání. Exprese byla indukována pomocí isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosidu (IPTG) ve výsledné koncentraci 0,1 mM. Buňky byly dále kultivovány přes noc při 20 °C. Kultura byla sklizena centrifugací (15 min při 8 000 g a 4 °C) a získaný pelet byl rozsuspendován v purifikačním nanášecím pufru (20 mM fosfátový pufr obsahující 500 mM NaCl a 10 mM imidazol, pH 7,5) a uchován při -80 °C.

Rozmrazené kultury byly za stálého chlazení dezintegrovány ultrazvukovou sonikací a lyzáty byly následně centrifugovány. K purifikaci proteinů byla využita niklová afinitní chromatografie. Eluce proteinů probíhala v lineárním gradientu elučního pufru s postupně se zvyšující koncentrací imidazolu (10-500 mM). Přítomnost proteinu v jednotlivých frakcích byla verifikována pomocí SDS-PAGE elektroforézy. Vypurifikované proteiny byly dialyzovány přes noc při 4 °C proti 20 mM fosfátovému pufru (pH 7,5) obsahujícím 750 mM NaCl a filtrovány přes sterilní filtr s velikostí

pórů 0,22 μm . Koncentrace proteinů byla určena pomocí metody dle Bradfordové a čistota byla zkontrolována pomocí SDS-PAGE elektroforézy. Jednokroková purifikace vedla k získání proteinů s čistotou vyšší než 90 % (Obrázek 1). Výtěžky testovaných proteinů ihned po purifikaci se pohybovaly v rozmezí 9 až 10 mg z litru buněčné kultury. Nicméně u divokého typu FGF18 wt docházelo po dialýze k masivnímu vysrážení proteinu, takže konečný výtěžek FGF18 wt po dialýze byl 5 mg a po lyofilizaci a následné rekonstituci proteinu do roztoku jen 2 mg z 1 litru kultury.

Příklad 3. Stanovení termostability tříbodového mutanta FGF18 získaného z prvního kola in silico designu

Po ověření správného strukturního uspořádání tříbodového mutanta FGF18 pomocí spektroskopie cirkulárního dichroismu (CD) byla následně testována jeho stabilita s využitím CD spektroskopie a diferenční skenovací fluorimetrie, která byla následně porovnána se stabilitou FGF18 wt. Termální denaturace proteinů byla oběma technikami sledována v teplotním rozsahu 25 až 90 $^{\circ}\text{C}$ s rychlostí teplotní rampy 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Naměřené hodnoty teplotní stabilizace jsou shrnuty v Tabulce 3. U nově zkonstruovaného tříbodového mutanta FGF18 nesoucího mutace L141F+S147P+Q170P byl pozorován nárůst teplotní stability o více než 9 $^{\circ}\text{C}$ v porovnání s divokým typem FGF18.

Tabulka 3. Teploty tání¹ FGF18 wt a tříbodového mutanta FGF18 z prvního kola designu měřené dvěma technikami – spektroskopií cirkulárního dichroismu (CD) a diferenční skenovací fluorimetrií (DSF).

FGF18	CD T_m ($^{\circ}\text{C}$)	CD ΔT_m ($^{\circ}\text{C}$)	DSF T_m ($^{\circ}\text{C}$)	DSF ΔT_m ($^{\circ}\text{C}$)
wt (SEQ ID NO. 13)	47,3	-	43,3	-
L141F+S147P+Q170P	57,0	9,7	52,5	9,2

T_m – teplota tání; ΔT_m – změna teploty tání po mutaci; ¹Prezentován je průměr ze tří nezávislých experimentů (průměrné standardní odchylky stanovených teplot tání byly ± 2 $^{\circ}\text{C}$).

Příklad 4. Ověření biologické aktivity tříbodového mutanta FGF18 získaného po prvním kole in silico designu

Biologická aktivita tříbodového mutanta FGF18 byla testována proliferační esejí s využitím myších B-lymfocytů, buněčné linie BaF3 exprimující FGFR-3C receptor. Protein byl analyzován v 96- jamkových destičkách za použití resazurinového testu (Ellsworth, J. L. et al. 2002, Osteoarthritis and Cartilage 10: 308-320). Proliferační aktivita tříbodového mutanta FGF18 (Obrázek 2) byla srovnána s aktivitou komerčně dostupného FGF18 wt (PeproTech, SEQ ID NO. 12) a aktivitou rekombinantně připraveného FGF18 wt (SEQ ID NO. 13). Ze získaných výsledků vyplývá, že míra schopnosti vyvolat proliferační odpověď je téměř totožná u komerčně dostupného FGF18 (ED_{50} 5,4 ng/ml), rekombinantního FGF18 (ED_{50} 3,1 ng/ml) a tříbodové varianty FGF18 (ED_{50} 3,2 ng/ml), protože křivka dávka-odpověď je pro všechny tyto faktory téměř totožná.

Příklad 5. Konstrukce a charakterizace zkrácené varianty tříbodového mutanta FGF18 demonstrující, že delece v C-terminální části proteinu nemá vliv na jeho stabilitu ani aktivitu

Zkrácená forma tříbodového mutanta FGF18 byla konstruována a charakterizována s cílem ověřit, že delece 8 aminokyselin v jeho C-terminální části nebude mít žádný vliv na stabilitu proteinu získanou vnesením tří stabilizujících substitucí a současně neovlivní aktivitu proteinu. Zkrácení C-terminální části proteinu vychází z rekombinantní formy FGF18, zkrácené o 11 aminokyselin v C-terminální části, označované jako Sprifermin a v současné době testované jako potenciální terapie na léčbu osteoartrity. Zkrácená forma tříbodového mutanta FGF18 byla konstruována cílenou mutagenézou s využitím vhodně navrženého primeru dle protokolu QuickChange kitu od firmy Agilent, kdy tříbodový mutant FGF18 byl použit jako templát. Připravený konstrukt v expresním vektoru pET28b obsahující v N-terminální části histidinovou kotvou a štěpící místo pro trombin byl

následně transformován do chemokompetentních buněk *E. coli* BL21(DE3) (New England Biolabs), kultivován při 37 °C a exprimován při OD (600 nm) 0,5 přidavkem IPTG při 20 °C přes noc. Vyprodukovaná biomasa byla sklížena centrifugací (15 min při 8 000 g a 4 °C) a získaný pelet byl rozsuspendován v purifikačním nanášecím pufru (20 mM fosfátový pufr obsahující 500 mM NaCl a 10 mM imidazol, pH 7,5) a uchován při -80 °C.

Rozmrazená kultura byly za stálého chlazení dezintegrována ultrazvukovou sonikací a lyzát byl centrifugován. K purifikaci proteinu byla využita niklová afinitní chromatografie. Eluce proteinu probíhala v lineárním gradientu elučního pufru s postupně se zvyšující koncentrací imidazolu (10 až 500 mM). Přítomnost proteinu v jednotlivých frakcích byla verifikována pomocí SDS-PAGE elektroforézy. Vypurifikovaný protein byl dialyzován přes noc při 4 °C proti 20 mM fosfátovému pufru (pH 7,5) obsahujícím 750 mM NaCl a filtrován přes sterilní filtr s velikostí pórů 0,22 µm. Koncentrace proteinu byla stanovena metodou dle Bradfordové a čistota byla zkontrolována pomocí SDS-PAGE elektroforézy (Obrázek 3). Po purifikaci byl protein připraven ve stejné čistotě jako tříbodový mutant (> 90 %). Stabilita zkrácené formy tříbodového mutantu FGF18 byla testována CD spektroskopií (Tabulka 4), aktivita testem proliferace s využitím BaF3 buněčné linie exprimující FGFR-3C receptor (Obrázek 4). Získané výsledky prokázaly, že delece 8 aminokyselin v jeho C-terminální části nemá žádný vliv na stabilitu a aktivitu proteinu.

Tabulka 4. Porovnání teploty tání¹ tříbodového mutantu FGF18 z prvního kola designu s jeho zkrácenou formou obsahující deleci 8 aminokyselin v C-terminální části. Teploty tání byly měřeny spektroskopií cirkulárního dichroismu (CD).

FGF18	CD T_m (°C)	CD ΔT_m (°C)
wt (SEQ ID NO. 13)	47,3	-
L141F+S147P+Q170P	57,0	9,7
L141F+S147P+Q170P+ $\Delta 8^{C\text{-terminus}}$	56,0	9,6

T_m – teplota tání; ΔT_m – změna teploty tání po mutaci; ¹Prezentován je průměr ze tří nezávislých experimentů (průměrné standardní odchylky stanovených teplot tání byly ± 2 °C).

Příklad 6. Konstrukce vícebodových mutantů FGF18 po druhém kole in silico designu, jejich exprese a purifikace afinitní chromatografií

Vícebodové varianty FGF18 navržené po 2 druhém kole in silico designu, zahrnující dvě čtyřbodové a jednu pětibodovou variantu, byly konstruovány metodou místně cílené mutagenese s využitím vhodně zvolených primerů nesoucích požadované jednobodové a dvoubodové mutace, které byly vnášeny do tříbodové varianty (L141F+S147P+Q170P) jako templátu dle protokolu QuickChange kitu od firmy Agilent. Přítomnost požadovaných mutací byla u nově konstruovaných FGF18 mutantů verifikována sekvenováním. Získané konstrukty v expresním vektoru pET28b obsahující v N-terminální části histidinovou kotvou a štěpicí místo pro trombin byly transformovány do chemokompetentních buněk *E. coli* BL21(DE3) (New England Biolabs), kultivovány při 37 °C a exprimovány při OD (600 nm) 0,5 přidavkem IPTG při 20 °C podobně jako v případě tříbodového mutantu FGF18 z prvního kola designu. Vyprodukovaná biomasa byla sklížena centrifugací (15 min při 8 000 g a 4 °C) a získaný pelet byl rozsuspendován v purifikačním nanášecím pufru (20 mM fosfátový pufr obsahující 500 mM NaCl a 10 mM imidazol, pH 7,5) a uchován při -80 °C.

Rozmrazené kultury byly za stálého chlazení dezintegrovány ultrazvukovou sonikací a lyzáty byly následně centrifugovány. K purifikaci proteinů byla využita niklová afinitní chromatografie. Eluce proteinů probíhala v lineárním gradientu elučního pufru s postupně se zvyšující koncentrací imidazolu (10-500 mM). Přítomnost proteinu v jednotlivých frakcích byla verifikována pomocí SDS-PAGE elektroforézy. Vypurifikované proteiny byly dialyzovány přes noc při 4 °C proti 20 mM fosfátovému pufru (pH 7,5) obsahujícím 750 mM NaCl a filtrovány přes sterilní filtr s velikostí

pórů 0,22 μm . Koncentrace proteinů byla určena pomocí metody dle Bradfordové a čistota byla zkontrolována pomocí SDS-PAGE elektroforézy. Jednokroková purifikace vedla k získání proteinů s čistotou vyšší než 90 % (Obrázek 5). Výtěžky nově zkonstruovaných mutantů FGF18 ihned po purifikaci se pohybovaly v rozmezí 7 až 12 mg z litru buněčné kultury. Nejvyšší průměrný výtěžek proteinu po purifikaci vykazoval pětibodový mutant FGF18 (Q85W+E105G+L141F+S147P+Q170P), který současně vykazoval i nejvyšší odolnost vůči precipitaci během dialýzy. Průměrný výtěžek pětibodového mutantu FGF18 po dialýze byl 10 mg z litru kultury.

10 Příklad 7. Stanovení termostability vícebodových FGF18 mutantů získaných po druhém kole in silico designu

Termální stabilita čtyřbodových a pětibodového mutantu FGF18 byla stanovena pomocí CD spektroskopie a diferenční skenovací fluorimetrie v teplotním rozsahu 25 až 90 $^{\circ}\text{C}$ s rychlostí teplotní rampy 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Naměřené hodnoty teplotní stability FGF18 mutantů jsou shrnuty v Tabulce 5. U všech tří nově zkonstruovaných mutantů FGF18 byl pozorován nárůst teplotní stability o 4 až 6 $^{\circ}\text{C}$ ve srovnání s použitým templátem (tříbodovým mutantem FGF18 nesoucím mutace L141F+S147P+Q170P) a tudíž o 14 až 16 $^{\circ}\text{C}$ ve srovnání s FGF18 wt. Nejvyšší teplotu tání vykazoval pětibodový mutant FGF18, jehož teplota tání vzrostla o 16 $^{\circ}\text{C}$ v porovnání s divokým typem FGF18.

Tabulka 5. Teploty tání¹ vícebodových mutantů FGF18 z druhého kola designu měřené dvěma technikami –spektroskopií cirkulárního dichroismu (CD) a diferenční skenovací fluorimetrií (DSF).

25

FGF18	CD T_m ($^{\circ}\text{C}$)	CD ΔT_m ($^{\circ}\text{C}$)	DSF T_m ($^{\circ}\text{C}$)	DSF ΔT_m ($^{\circ}\text{C}$)
wt (SEQ ID NO. 13)	47,3	-	43,3	-
L141F+S147P+Q170P	57,0	9,7	52,5	9,2
E105G+L141F+S147P+Q170P	62,0	14,7	58,2	14,9
Q85W+L141F+S147P+Q170P	61,3	14,0	57,8	14,5
Q85W+E105G+L141F+S147P+Q170P	62,8	15,5	58,8	15,5

T_m – teplota tání; ΔT_m – změna teploty tání po mutaci; ¹Prezentován je průměr ze tří nezávislých experimentů (průměrné standardní odchylky stanovených teplot tání byly ± 2 $^{\circ}\text{C}$).

30 Příklad 8. Biologická aktivita pětibodového mutantu FGF18

Biologická aktivita pětibodové varianty FGF18 5b (Q85W+E105G+L141F+S147P+Q170P) byla testována proliferační esejí s využitím myších B-lymfocytů, buněčné linie BaF3 exprimující FGFR-3C receptor a porovnána s aktivitou komerčně dostupného FGF18 wt (PeproTech, SEQ ID NO. 12) a aktivitou rekombinantně připraveného FGF18 (SEQ ID NO. 13). Proteiny byly testovány v 96-jamkových destičkách pomocí resazurinového testu (přídavek resazurinu do média detekuje a kvantifikuje buněčnou viabilitu na základě přeměny nefluorescenčního modrého resazurinu na červený fluorescenční resorufin). Z naměřených výsledků vyplývá, že pětibodová varianta FGF18 5b vykazuje porovnatelnou schopnost indukce proliferace jako oba divoké typy FGF18 (Obrázek 6), korelující s očekávanou hodnotou ED₅₀ pro tento efekt ≤ 10 ng/ml (FGF18 5b 0,5 ng/ml; FGF18 wt (SEQ ID NO. 12) 8.6 ng/ml; FGF18 wt (SEQ ID NO. 13) 1,0 ng/ml).

Biologická aktivita pětibodové varianty FGF18 5b (Q85W+E105G+L141F+S147P+Q170P) byla dále testována stanovením receptorové specifity s využitím buněčných linií BaF3 myších B-lymfocytů exprimujících hlavní varianty FGF receptorů: FGFR-1B, 1C, 2B, 2C, 3B a 3C. Tyto klony jsou závislé na přídavku FGF pro indukci proliferace, a proto jsou ideálním systémem pro testování receptorové specifity FGF proteinů. Pokud se testovaný FGF váže na určitý FGFR exprimovaný v daném klonu BaF3 buněk, dojde k proliferaci buněk, a tím nárůstu jejich počtu a

45

celkové metabolické aktivity v médiu. Receptorová specificita byla testována pomocí resazurinového testu. Naměřená data ukázala, že vnesené stabilizující mutace do pětibodového mutantu FGF18 nijak neovlivnily jeho receptorovou specifitu, neboť v závislosti na koncentraci vyvolává, stejně jako FGF18 wt (SEQ ID NO. 12), proliferační odpověď na buněčné linii exprimující receptory FGFR-3C a FGFR-2C. Zatímco u ostatní testovaných linií BaF3 buněk nebyla po přidavku proteinu do média proliferace buněk pozorována téměř vůbec nebo jen až ve velmi vysokých koncentracích (Obrázek 7).

Příklad 9. Pětibodový mutant FGF18 vykazuje zvýšenou termostabilitu v buněčné kultuře myších B-lymfocytů buněčné linie BaF3 produkujících FGFR-2C receptor

Následně byl proveden test teplotní stability pětibodové varianty FGF18 (Q85W+E105G+L141F+S147P+Q170P) v buněčné kultuře ve srovnání s FGF18 wt (SEQ ID NO. 12), při kterém byla testována schopnost proteinů indukovat proliferaci buněk po vystavení různým teplotním podmínkám preinkubace. Preinkubované proteiny byly následně použity ke stimulaci proliferace buněčného klonu BaF3 exprimující FGFR-2C receptor, který v předchozích testech receptorové specificity vykazoval silný proliferační signál vyvolaný přidavkem FGF18. Podmínky preinkubace pro obě varianty FGF18 byly shodné a probíhaly současně při: i) -20 °C, ii) 37 °C po dobu 7 dní a iii) 50 °C po dobu 24 hodin (Obrázek 8). Po vystavení všem testovaným teplotám vykazoval pětibodový mutant FGF18 5b schopnost indukce proliferace BaF3 buněk při výrazně nižších koncentracích ve srovnání s FGF18 wt. Dokonce i po 24hodinové preinkubaci při 50 °C si FGF18 5b udržel svou biologickou aktivitu, zatímco FGF18 wt byl prakticky neaktivní. Naměřené výsledky potvrzují zvýšenou stabilitu pětibodového mutantu FGF18 5b.

Příklad 10. Resistence pětibodového mutantu FGF18 vůči proteolytické degradaci

Ke zjištění odolnosti FGF18 wt (SEQ ID NO. 13) a pětibodového mutantu FGF18 (L141F+S147P+Q170P+E105G+Q85W) vůči proteolytické degradaci byl proveden test štěpení proteolytickým enzymem. Oba FGF18 polypeptidy byly štěpeny trypsinem při 37 °C v molárním poměru 1:20 a následně analyzovány pomocí SDS-PAGE analýzy (Obrázek 9). Následná kvantifikace produktů proteolytického štěpení na SDS-PAGE gelu odhalila, že pětibodový mutant FGF18 vykazuje nejen zvýšenou termostabilitu, ale i vyšší odolnost vůči proteolytické degradaci. Stabilní FGF18 5b podléhá degradaci trypsinem přibližně 16krát pomaleji než FGF18 wt.

Příklad 11. Efektivita pětibodového mutantu FGF18 při indukci proliferace myších chondrocytů

Primární myší chondrocyty získané z chrupavčitých segmentů hrudního koše novorozenejších myší byly týden kultivovány v kompletním kultivačním médiu (DMEM medium, 10% fetální bovinní sérum, 1% penicilin-streptomycin) do dosažení plné konfluency s výměnou média každé dva dny. Poté byly buňky přeneseny do 12jamkových kultivačních destiček obsahujících starvační médium (DMEM, 0,5% fetální bovinní sérum, 1% penicilin-streptomycin) v množství 200 x 103 buněk na jamku. Po 24hodinové inkubaci ve starvačním médiu bylo médium znovu vyměněno za i) kompletní kultivační médium nebo ii) chondrocytární maturační médium (kompletní kultivační médium, 50 µg/ml kyselina askorbová, 10 mM β-glycerolfosfát). Kultivace v maturačním médiu probíhala bez přístupu světla jako prevence degradace kyseliny askorbové v médiu. Pro účely testování biologické aktivity stabilního pětibodového mutantu FGF18 5b (L141F+S147P+Q170P+E105G+Q85W) byly chondrocyty kultivovány za standardních kultivačních podmínek (37 °C, 5 % CO₂) a stimulovány přidavkem růstového faktoru v koncentraci 1000 ng/ml. Stimulační účinky FGF18 na nezralé chondrocyty (kultivované v kompletním kultivačním médiu) nebo na dozrávající chondrocyty (kultivované v maturačním médiu) byly detekovány pomocí proliferačního testu založeném na metabolické buněčné konverzi nefluorescenčního resazurinu na fluorescenční resorufin, který je detekován při emisní vlnové délce 590 nm po excitaci při 560 nm. Výsledky srovnání proliferační aktivity FGF18 wt (SEQ ID NO. 13) a pětibodového mutantu FGF18 5b jsou ukázány na Obrázku 10. Tento příklad ukazuje,

že efektivita pětibodového mutanta FGF18 indukovat proliferaci myších chondrocytů je srovnatelná s aktivitou divokého typu FGF18.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Polypeptid na bázi FGF18, mající nebo obsahující sekvenci o alespoň 90% sekvenční identitě se sekvencí:

LYSR TSGKHIQVLG RRISARGEDG DKYAQLLVET DTFGSQVRIK GKETEFLYLCM
NRKGKLVGKP DGTSKECVFI EKVLENNYTA F MSAKY P GWY VGFTKKGRPR
KGPKTRENQ P DVHFM (SEQ ID NO. 3)

přičemž aminokyseliny vyznačené tučně a podtržením musí být zachovány.

2. Polypeptid podle nároku 1, který má celkovou délku sekvence polypeptidu do 227 aminokyselin, výhodněji do 207 aminokyselin.

3. Polypeptid podle nároku 1 nebo 2, obsahující dále alespoň jednu z následujících záměn aminokyselin nebo obě následující záměny aminokyselin:

- záměnu aminokyseliny E v pozici 49 uvedené sekvence SEQ ID NO. 3 aminokyselinou G;
- záměnu aminokyseliny Q v pozici 29 uvedené sekvence SEQ ID NO. 3 aminokyselinou W.

4. Polypeptid podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, dále nesoucí:

- na N-konci sekvence SEQ ID NO. 3 alespoň část sekvence nebo celou sekvenci MYSAPSACTC
LCLHFLLLCF QVQVLVAEEN VDFRIHVENQ TRARDDVSRK QLRLYQ (SEQ ID NO. 4),
nebo

- na N-konci sekvence SEQ ID NO. 3 aminokyselinu methionin (M);

a/nebo

- na C-konci sekvence SEQ ID NO. 3 alespoň část sekvence nebo celou sekvenci KRYPK
GQPELQKPFK YTTVTKRSRR IRPHTPA (SEQ ID NO. 5);

a/nebo

- v N- nebo C-terminální části fúzní aminokyselinové sekvence (kotvy) v maximální délce až 20 aminokyselin.

5. Polypeptid podle nároku 1, mající nebo obsahující sekvenci o alespoň 90% sekvenční identitě se sekvencí:

AEEN VDFRIHVENQ TRARDDVSRK QLRLYQLYSR TSGKHIQVLG RRISARGEDG
DKYAQLLVET DTFGSQVRIK GKETEFLYLCM NRKGKLVGKP DGTSKECVFI
EKVLENNYTA F MSAKY P GWY VGFTKKGRPR KGPKTRENQ P DVHFMKRYPK
GQPELQKPFK YTTVTKRSR (SEQ ID NO. 6)

přičemž aminokyseliny vyznačené tučně a podtržením musí být zachovány.

6. Polypeptid podle nároku 5, který má celkovou délku sekvence polypeptidu do 227 aminokyselin, výhodněji do 207 aminokyselin.

7. Polypeptid podle nároku 5 nebo 6, obsahující alespoň jednu z následujících záměn aminokyselin nebo obě následující záměny aminokyselin:

- záměnu aminokyseliny E v poloze 79 uvedené sekvence SEQ ID NO. 6 aminokyselinou G;
- záměnu aminokyseliny Q v poloze 59 uvedené sekvence SEQ ID NO. 6 aminokyselinou W.

8. Polypeptid podle kteréhokoliv z nároků 5 až 7, dále nesoucí:

- na N-konci sekvence SEQ ID NO. 6 alespoň část sekvence nebo celou sekvenci MYSAPSACTC
LCLHFLLLCF QVQVLV (SEQ ID NO. 7), nebo

- na N-konci sekvence SEQ ID NO. 6 aminokyselinu methionin (M);

a/nebo

- na C-konci sekvence SEQ ID NO. 6 alespoň část sekvence nebo celou sekvenci RIRPHTPA
(SEQ ID NO. 8);

a/nebo

- v N- nebo C-terminální části fúzní aminokyselinové sekvence (kotvy) v maximální délce až 20 aminokyselin.

9. Polypeptid podle nároku 1, mající nebo obsahující sekvenci vybranou z:

AEEN VDFRIHVENQ TRARDDVSRK QLRLYQLYSR TSGKHIQVLG RRISARGEDG
DKYAQLLVET DTFGSQVRIK GKETEFYLCM NRKGKLVGKP DGTSKECVFI
EKVLENNYTA **F**MSAKY **P**GWY VGFTKKGRPR KGPKTRENQ **P**DVHFMKRYPK
GQPELQKPFK YTTVTKRSR (SEQ ID NO. 6);

5

AEEN VDFRIHVENQ TRARDDVSRK QLRLYQLYSR TSGKHIQVLG RRISARGEDG
DKYAQLLVET DTFGSQVRIK GKET **G**FYLCM NRKGKLVGKP DGTSKECVFI
EKVLENNYTA **F**MSAKY **P**GWY VGFTKKGRPR KGPKTRENQ **P**DVHFMKRYPK
GQPELQKPFK YTTVTKRSR (SEQ ID NO. 9);

10

AEEN VDFRIHVENQ TRARDDVSRK QLRLYQLYSR TSGKHIQVLG RRISARGEDG
DKYA **W**LLVET DTFGSQVRIK GKETEFYLCM NRKGKLVGKP DGTSKECVFI
EKVLENNYTA **F**MSAKY **P**GWY VGFTKKGRPR KGPKTRENQ **P**DVHFMKRYPK
GQPELQKPFK YTTVTKRSR (SEQ ID NO. 10);

15

AEEN VDFRIHVENQ TRARDDVSRK QLRLYQLYSR TSGKHIQVLG RRISARGEDG
DKYA **W**LLVET DTFGSQVRIK GKET **G**FYLCM NRKGKLVGKP DGTSKECVFI
EKVLENNYTA **F**MSAKY **P**GWY VGFTKKGRPR KGPKTRENQ **P**DVHFMKRYPK
GQPELQKPFK YTTVTKRSR (SEQ ID NO. 11);

přičemž celková délka sekvence polypeptidu je do 227 aminokyselin.

10. Polypeptid podle kteréhokoli z nároků 1 až 9 pro použití jako léčivo.

20

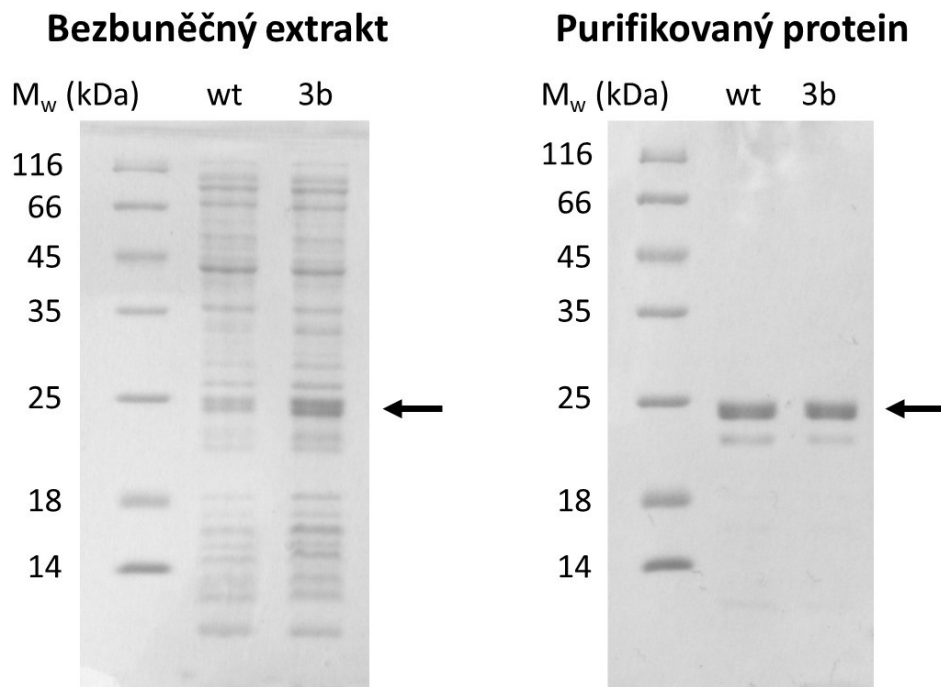
11. Polypeptid podle kteréhokoli z nároků 1 až 9 pro použití v regenerativní medicíně, v ortopedii, zejména pro léčbu poranění chrupavky či kosti, nebo v terapeutické stimulaci růstu vlasů.

12. Použití polypeptidu podle kteréhokoli z nároků 1 až 9 v kosmetice, zejména pro neterapeutickou stimulaci růstu vlasů.

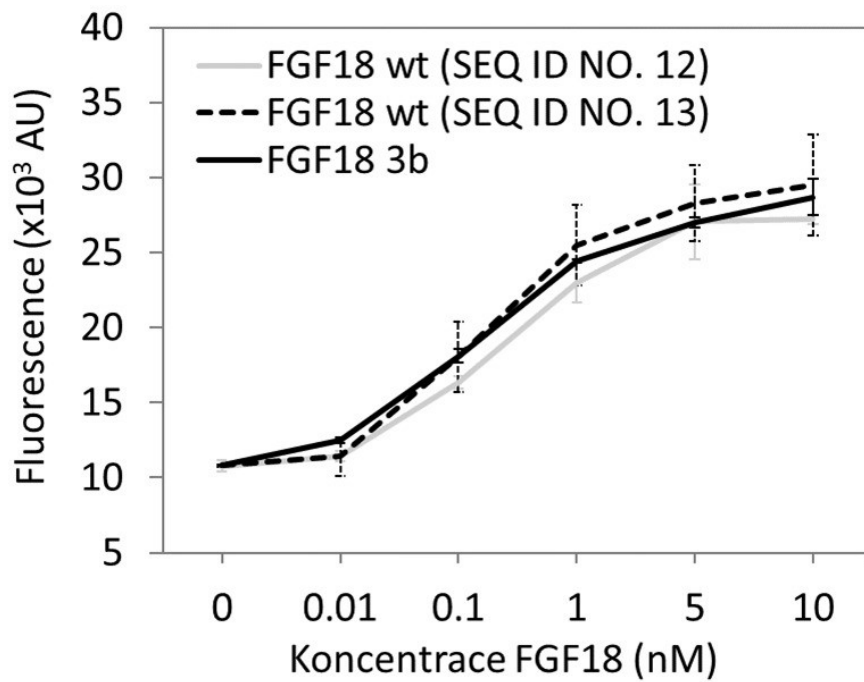
25

13. Kultivační médium pro kultivaci chondrocytů, **vyznačující se tím**, že obsahuje polypeptid podle kteréhokoli z nároků 1 až 9 v rozsahu koncentrací polypeptidu 10 ng/μl až 1000 ng/μl.

19 výkresů

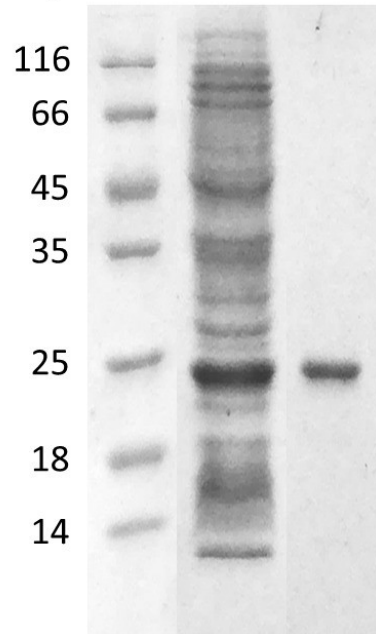


Obr. 1

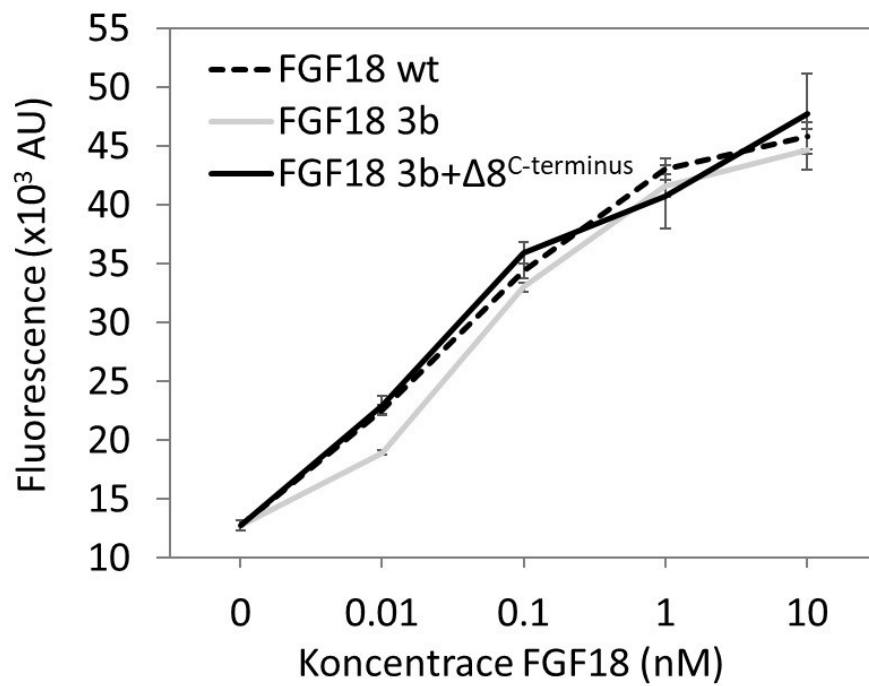


Obr. 2

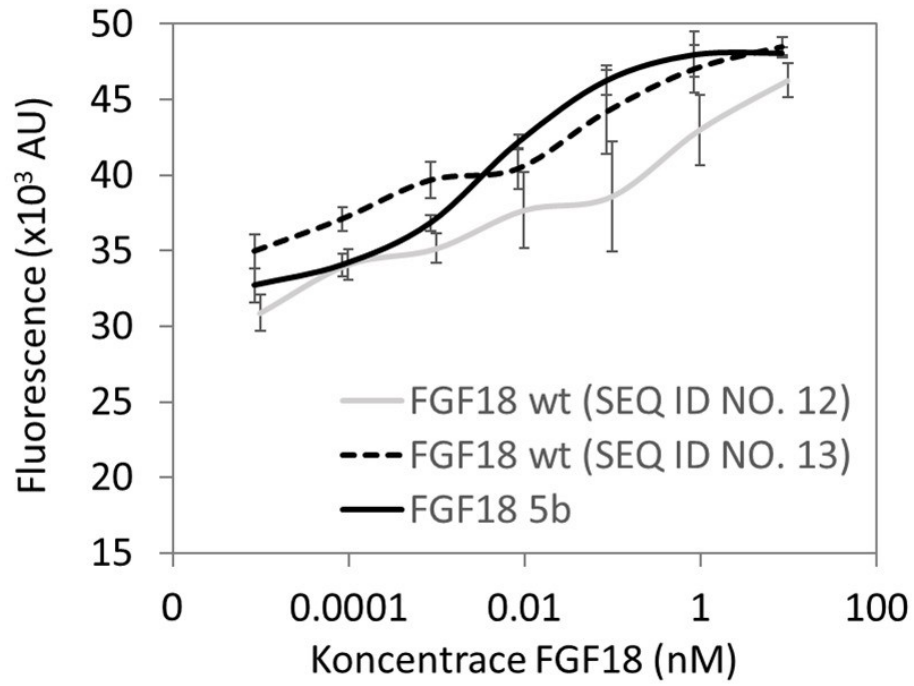
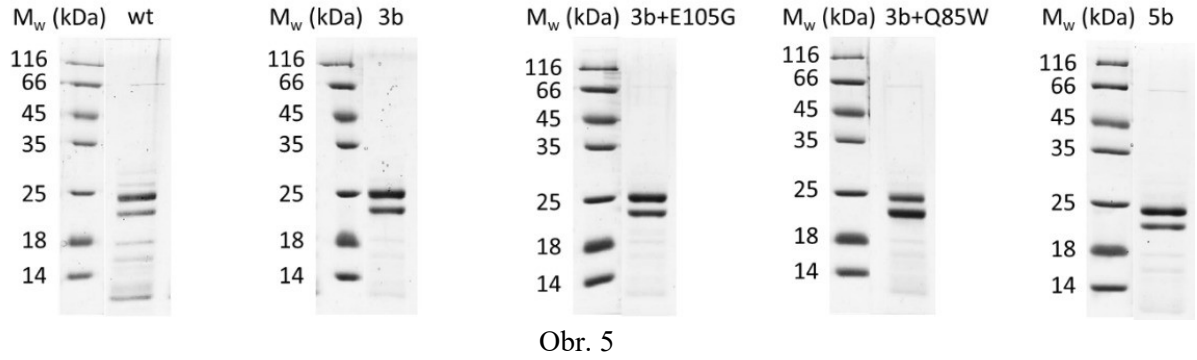
M_w (kDa) CE 3b+ $\Delta 8^{C\text{-terminus}}$

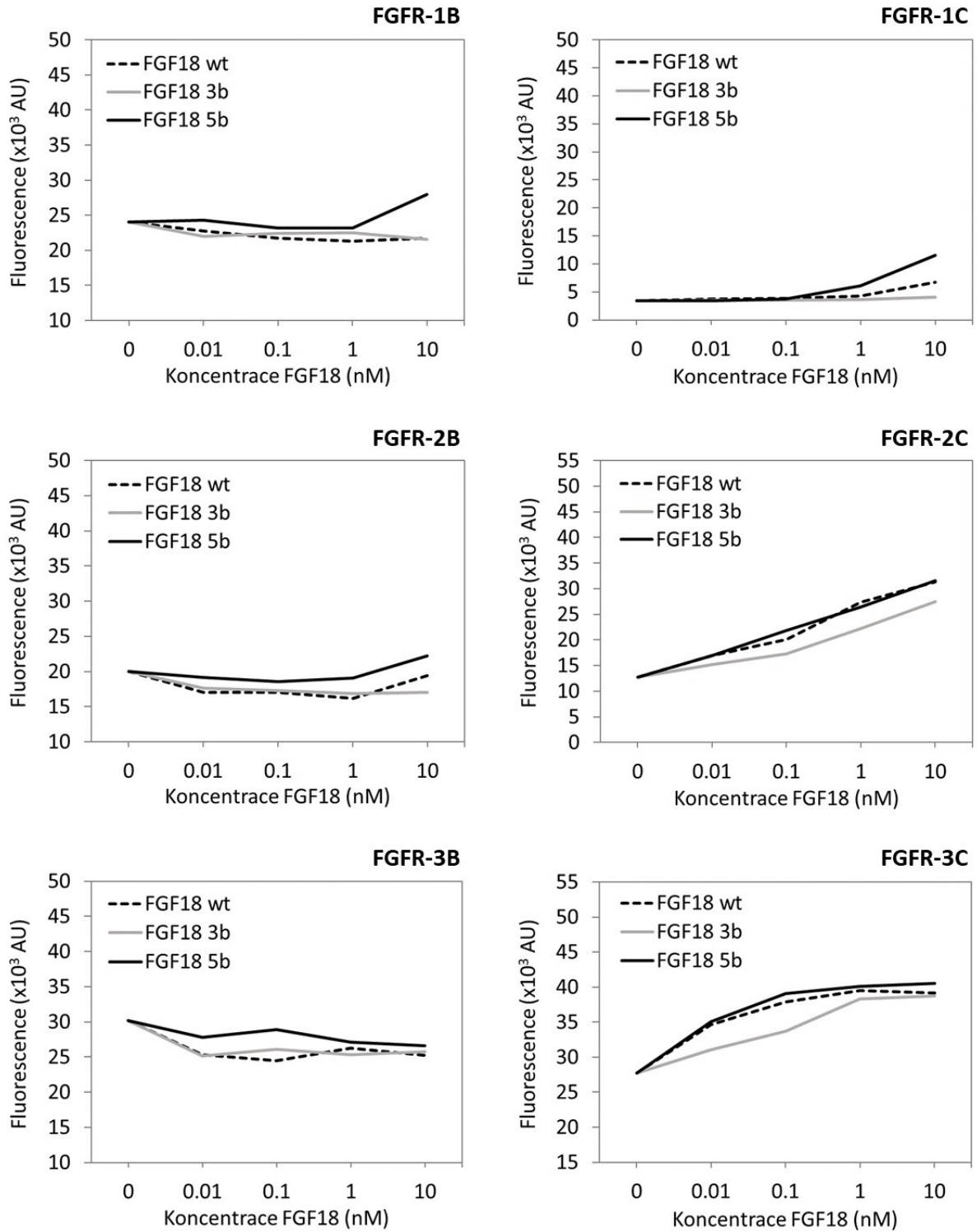


Obr. 3

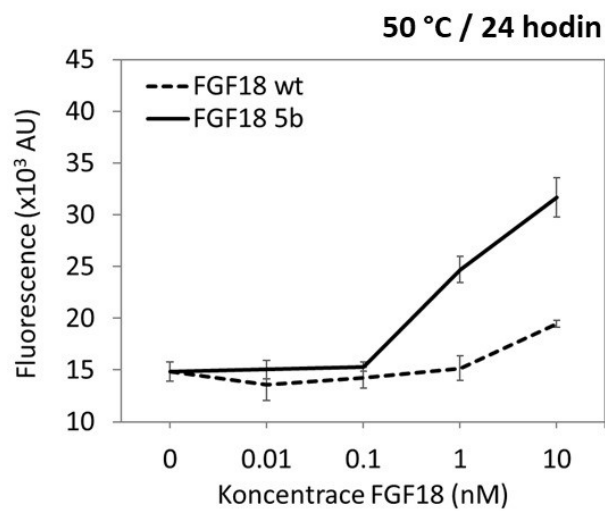
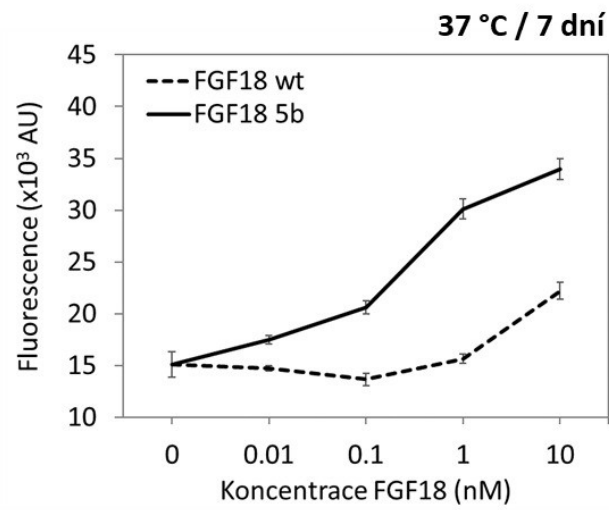
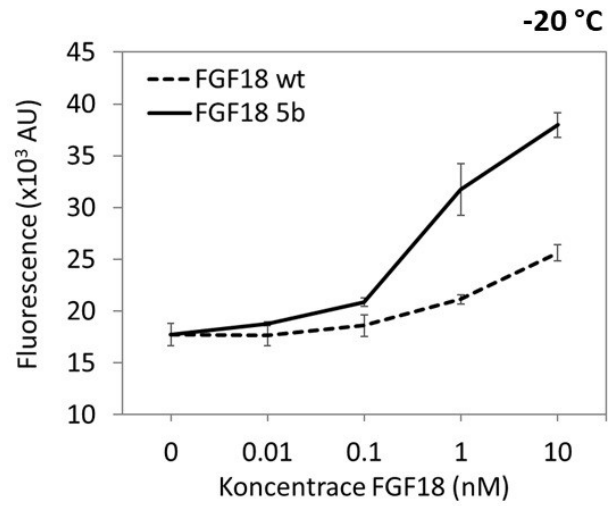


Obr. 4

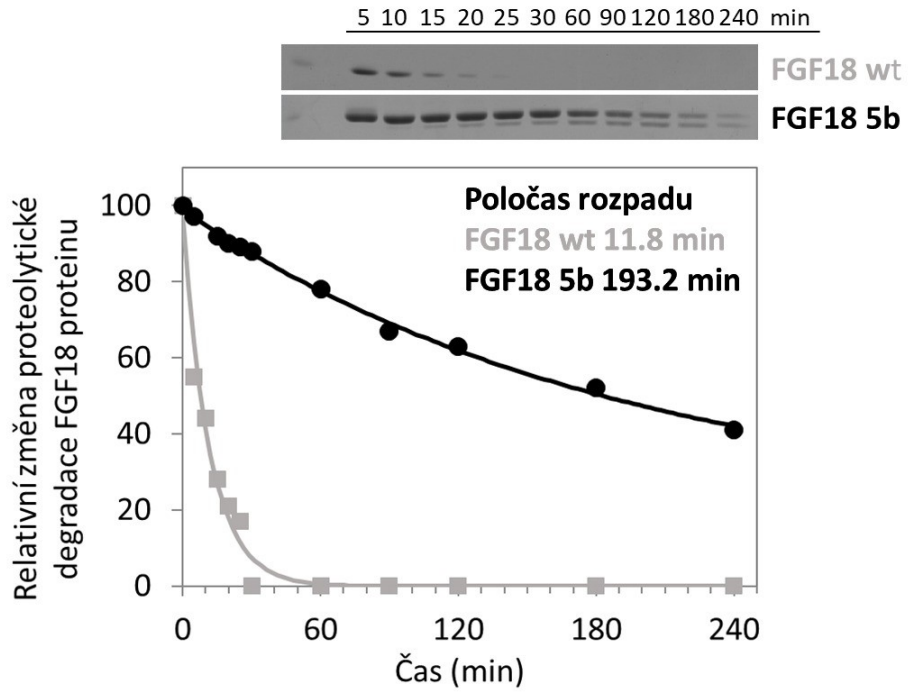




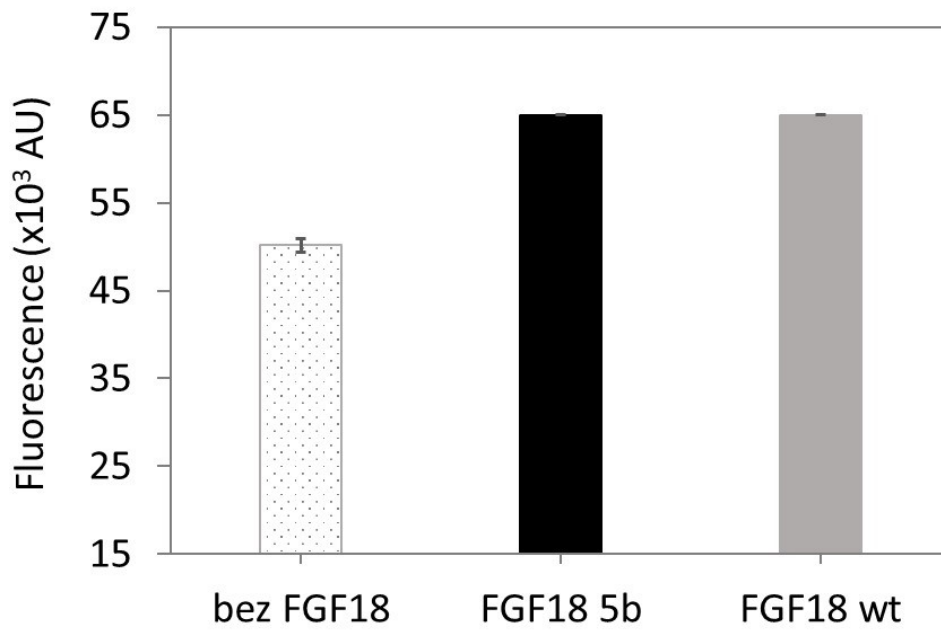
Obr. 7



Obr. 8



Obr. 9



Obr. 10

SEQUENCE LISTING

<110> Enantis, s.r.o.; Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně
 <120> Termostabilní polypeptid na bázi FGF18 a jeho použití
 <130> P
 <160> 19
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 207
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1

Met Tyr Ser Ala Pro Ser Ala Cys Thr Cys Leu Cys Leu His Phe Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Cys Phe Gln Val Gln Val Leu Val Ala Glu Glu Asn Val Asp
 20 25 30

Phe Arg Ile His Val Glu Asn Gln Thr Arg Ala Arg Asp Asp Val Ser
 35 40 45

Arg Lys Gln Leu Arg Leu Tyr Gln Leu Tyr Ser Arg Thr Ser Gly Lys
 50 55 60

His Ile Gln Val Leu Gly Arg Arg Ile Ser Ala Arg Gly Glu Asp Gly
 65 70 75 80

Asp Lys Tyr Ala Gln Leu Leu Val Glu Thr Asp Thr Phe Gly Ser Gln
 85 90 95

Val Arg Ile Lys Gly Lys Glu Thr Glu Phe Tyr Leu Cys Met Asn Arg
 100 105 110

Lys Gly Lys Leu Val Gly Lys Pro Asp Gly Thr Ser Lys Glu Cys Val
 115 120 125

Phe Ile Glu Lys Val Leu Glu Asn Asn Tyr Thr Ala Leu Met Ser Ala
 130 135 140

Lys Tyr Ser Gly Trp Tyr Val Gly Phe Thr Lys Lys Gly Arg Pro Arg
 145 150 155 160

Lys Gly Pro Lys Thr Arg Glu Asn Gln Gln Asp Val His Phe Met Lys
 165 170 175

Arg Tyr Pro Lys Gly Gln Pro Glu Leu Gln Lys Pro Phe Lys Tyr Thr
 180 185 190

Thr Val Thr Lys Arg Ser Arg Arg Ile Arg Pro Thr His Pro Ala
 195 200 205

<210> 2
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met Tyr Ser Ala Pro Ser Ala Cys Thr Cys Leu Cys Leu His Phe Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Cys Phe Gln Val Gln Val Leu Val Ala
 20 25

<210> 3
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> mutated functional fragment of FGF18

<400> 3

Leu Tyr Ser Arg Thr Ser Gly Lys His Ile Gln Val Leu Gly Arg Arg
 1 5 10 15

Ile Ser Ala Arg Gly Glu Asp Gly Asp Lys Tyr Ala Gln Leu Leu Val
 20 25 30

Glu Thr Asp Thr Phe Gly Ser Gln Val Arg Ile Lys Gly Lys Glu Thr
 35 40 45

Glu Phe Tyr Leu Cys Met Asn Arg Lys Gly Lys Leu Val Gly Lys Pro
 50 55 60

Asp Gly Thr Ser Lys Glu Cys Val Phe Ile Glu Lys Val Leu Glu Asn
 65 70 75 80

Asn Tyr Thr Ala Phe Met Ser Ala Lys Tyr Pro Gly Trp Tyr Val Gly
 85 90 95

Phe Thr Lys Lys Gly Arg Pro Arg Lys Gly Pro Lys Thr Arg Glu Asn
 100 105 110

Gln Pro Asp Val His Phe Met
 115

<210> 4
 <211> 56
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> N-terminal extension

<400> 4

Met Tyr Ser Ala Pro Ser Ala Cys Thr Cys Leu Cys Leu His Phe Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Cys Phe Gln Val Gln Val Leu Val Ala Glu Glu Asn Val Asp
 20 25 30

Phe Arg Ile His Val Glu Asn Gln Thr Arg Ala Arg Asp Asp Val Ser
 35 40 45

Arg Lys Gln Leu Arg Leu Tyr Gln
 50 55

<210> 5
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> C-terminal extension

<400> 5

Lys Arg Tyr Pro Lys Gly Gln Pro Glu Leu Gln Lys Pro Phe Lys Tyr
 1 5 10 15

Thr Thr Val Thr Lys Arg Ser Arg Arg Ile Arg Pro Thr His Pro Ala
 20 25 30

<210> 6
 <211> 173
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> mutated functional fragment of FGF18

<400> 6

Ala Glu Glu Asn Val Asp Phe Arg Ile His Val Glu Asn Gln Thr Arg
 1 5 10 15

Ala Arg Asp Asp Val Ser Arg Lys Gln Leu Arg Leu Tyr Gln Leu Tyr
 20 25 30

Ser Arg Thr Ser Gly Lys His Ile Gln Val Leu Gly Arg Arg Ile Ser
 35 40 45

Ala Arg Gly Glu Asp Gly Asp Lys Tyr Ala Gln Leu Leu Val Glu Thr
 50 55 60

Asp Thr Phe Gly Ser Gln Val Arg Ile Lys Gly Lys Glu Thr Glu Phe
 65 70 75 80

Tyr Leu Cys Met Asn Arg Lys Gly Lys Leu Val Gly Lys Pro Asp Gly
 85 90 95

Thr Ser Lys Glu Cys Val Phe Ile Glu Lys Val Leu Glu Asn Asn Tyr
 100 105 110

Thr Ala Phe Met Ser Ala Lys Tyr Pro Gly Trp Tyr Val Gly Phe Thr
 115 120 125

Lys Lys Gly Arg Pro Arg Lys Gly Pro Lys Thr Arg Glu Asn Gln Pro
 130 135 140

Asp Val His Phe Met Lys Arg Tyr Pro Lys Gly Gln Pro Glu Leu Gln
 145 150 155 160

Lys Pro Phe Lys Tyr Thr Thr Val Thr Lys Arg Ser Arg
 165 170

<210> 7
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> N-terminal extension

<400> 7

Met Tyr Ser Ala Pro Ser Ala Cys Thr Cys Leu Cys Leu His Phe Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Cys Phe Gln Val Gln Val Leu Val
 20 25

<210> 8
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> C-terminal extension

<400> 8

Arg Ile Arg Pro Thr His Pro Ala
 1 5

<210> 9
 <211> 173
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> mutated functional fragment of FGF18

<400> 9

Ala Glu Glu Asn Val Asp Phe Arg Ile His Val Glu Asn Gln Thr Arg
 1 5 10 15

Ala Arg Asp Asp Val Ser Arg Lys Gln Leu Arg Leu Tyr Gln Leu Tyr
 20 25 30

Ser Arg Thr Ser Gly Lys His Ile Gln Val Leu Gly Arg Arg Ile Ser
 35 40 45

CZ 2021 - 303 A3

Ala Arg Gly Glu Asp Gly Asp Lys Tyr Ala Gln Leu Leu Val Glu Thr
50 55 60

Asp Thr Phe Gly Ser Gln Val Arg Ile Lys Gly Lys Glu Thr Gly Phe
65 70 75 80

Tyr Leu Cys Met Asn Arg Lys Gly Lys Leu Val Gly Lys Pro Asp Gly
85 90 95

Thr Ser Lys Glu Cys Val Phe Ile Glu Lys Val Leu Glu Asn Asn Tyr
100 105 110

Thr Ala Phe Met Ser Ala Lys Tyr Pro Gly Trp Tyr Val Gly Phe Thr
115 120 125

Lys Lys Gly Arg Pro Arg Lys Gly Pro Lys Thr Arg Glu Asn Gln Pro
130 135 140

Asp Val His Phe Met Lys Arg Tyr Pro Lys Gly Gln Pro Glu Leu Gln
145 150 155 160

Lys Pro Phe Lys Tyr Thr Thr Val Thr Lys Arg Ser Arg
165 170

<210> 10

<211> 173

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> mutated functional fragment of FGF18

<400> 10

Ala Glu Glu Asn Val Asp Phe Arg Ile His Val Glu Asn Gln Thr Arg
1 5 10 15

Ala Arg Asp Asp Val Ser Arg Lys Gln Leu Arg Leu Tyr Gln Leu Tyr
20 25 30

Ser Arg Thr Ser Gly Lys His Ile Gln Val Leu Gly Arg Arg Ile Ser
35 40 45

Ala Arg Gly Glu Asp Gly Asp Lys Tyr Ala Trp Leu Leu Val Glu Thr
50 55 60

Asp Thr Phe Gly Ser Gln Val Arg Ile Lys Gly Lys Glu Thr Glu Phe
65 70 75 80

Tyr Leu Cys Met Asn Arg Lys Gly Lys Leu Val Gly Lys Pro Asp Gly
85 90 95

Thr Ser Lys Glu Cys Val Phe Ile Glu Lys Val Leu Glu Asn Asn Tyr
100 105 110

Thr Ala Phe Met Ser Ala Lys Tyr Pro Gly Trp Tyr Val Gly Phe Thr
 115 120 125

Lys Lys Gly Arg Pro Arg Lys Gly Pro Lys Thr Arg Glu Asn Gln Pro
 130 135 140

Asp Val His Phe Met Lys Arg Tyr Pro Lys Gly Gln Pro Glu Leu Gln
 145 150 155 160

Lys Pro Phe Lys Tyr Thr Thr Val Thr Lys Arg Ser Arg
 165 170

<210> 11
 <211> 173
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> mutated functional fragment of FGF18

<400> 11

Ala Glu Glu Asn Val Asp Phe Arg Ile His Val Glu Asn Gln Thr Arg
 1 5 10 15

Ala Arg Asp Asp Val Ser Arg Lys Gln Leu Arg Leu Tyr Gln Leu Tyr
 20 25 30

Ser Arg Thr Ser Gly Lys His Ile Gln Val Leu Gly Arg Arg Ile Ser
 35 40 45

Ala Arg Gly Glu Asp Gly Asp Lys Tyr Ala Trp Leu Leu Val Glu Thr
 50 55 60

Asp Thr Phe Gly Ser Gln Val Arg Ile Lys Gly Lys Glu Thr Gly Phe
 65 70 75 80

Tyr Leu Cys Met Asn Arg Lys Gly Lys Leu Val Gly Lys Pro Asp Gly
 85 90 95

Thr Ser Lys Glu Cys Val Phe Ile Glu Lys Val Leu Glu Asn Asn Tyr
 100 105 110

Thr Ala Phe Met Ser Ala Lys Tyr Pro Gly Trp Tyr Val Gly Phe Thr
 115 120 125

Lys Lys Gly Arg Pro Arg Lys Gly Pro Lys Thr Arg Glu Asn Gln Pro
 130 135 140

Asp Val His Phe Met Lys Arg Tyr Pro Lys Gly Gln Pro Glu Leu Gln
 145 150 155 160

Lys Pro Phe Lys Tyr Thr Thr Val Thr Lys Arg Ser Arg
 165 170

<210> 12
 <211> 173
 <212> PRT
 <213> artificial

 <220>
 <223> recombinant human FGF18

 <400> 12
 Ala Glu Glu Asn Val Asp Phe Arg Ile His Val Glu Asn Gln Thr Arg
 1 5 10 15

 Ala Arg Asp Asp Val Ser Arg Lys Gln Leu Arg Leu Tyr Gln Leu Tyr
 20 25 30

 Ser Arg Thr Ser Gly Lys His Ile Gln Val Leu Gly Arg Arg Ile Ser
 35 40 45

 Ala Arg Gly Glu Asp Gly Asp Lys Tyr Ala Gln Leu Leu Val Glu Thr
 50 55 60

 Asp Thr Phe Gly Ser Gln Val Arg Ile Lys Gly Lys Glu Thr Glu Phe
 65 70 75 80

 Tyr Leu Cys Met Asn Arg Lys Gly Lys Leu Val Gly Lys Pro Asp Gly
 85 90 95

 Thr Ser Lys Glu Cys Val Phe Ile Glu Lys Val Leu Glu Asn Asn Tyr
 100 105 110

 Thr Ala Leu Met Ser Ala Lys Tyr Ser Gly Trp Tyr Val Gly Phe Thr
 115 120 125

 Lys Lys Gly Arg Pro Arg Lys Gly Pro Lys Thr Arg Glu Asn Gln Gln
 130 135 140

 Asp Val His Phe Met Lys Arg Tyr Pro Lys Gly Gln Pro Glu Leu Gln
 145 150 155 160

 Lys Pro Phe Lys Tyr Thr Thr Val Thr Lys Arg Ser Arg
 165 170

<210> 13
 <211> 202
 <212> PRT
 <213> artificial

 <220>
 <223> recombinant human FGF18

 <400> 13
 Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
 1 5 10 15

CZ 2021 - 303 A3

Arg Gly Ser His Met Ala Glu Glu Asn Val Asp Phe Arg Ile His Val
 20 25 30

Glu Asn Gln Thr Arg Ala Arg Asp Asp Val Ser Arg Lys Gln Leu Arg
 35 40 45

Leu Tyr Gln Leu Tyr Ser Arg Thr Ser Gly Lys His Ile Gln Val Leu
 50 55 60

Gly Arg Arg Ile Ser Ala Arg Gly Glu Asp Gly Asp Lys Tyr Ala Gln
 65 70 75 80

Leu Leu Val Glu Thr Asp Thr Phe Gly Ser Gln Val Arg Ile Lys Gly
 85 90 95

Lys Glu Thr Glu Phe Tyr Leu Cys Met Asn Arg Lys Gly Lys Leu Val
 100 105 110

Gly Lys Pro Asp Gly Thr Ser Lys Glu Cys Val Phe Ile Glu Lys Val
 115 120 125

Leu Glu Asn Asn Tyr Thr Ala Leu Met Ser Ala Lys Tyr Ser Gly Trp
 130 135 140

Tyr Val Gly Phe Thr Lys Lys Gly Arg Pro Arg Lys Gly Pro Lys Thr
 145 150 155 160

Arg Glu Asn Gln Gln Asp Val His Phe Met Lys Arg Tyr Pro Lys Gly
 165 170 175

Gln Pro Glu Leu Gln Lys Pro Phe Lys Tyr Thr Thr Val Thr Lys Arg
 180 185 190

Ser Arg Arg Ile Arg Pro Thr His Pro Ala
 195 200

<210> 14
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> 3-point mutant

<400> 14

Met Ala Glu Glu Asn Val Asp Phe Arg Ile His Val Glu Asn Gln Thr
 1 5 10 15

Arg Ala Arg Asp Asp Val Ser Arg Lys Gln Leu Arg Leu Tyr Gln Leu
 20 25 30

Tyr Ser Arg Thr Ser Gly Lys His Ile Gln Val Leu Gly Arg Arg Ile
 35 40 45

Ser Ala Arg Gly Glu Asp Gly Asp Lys Tyr Ala Gln Leu Leu Val Glu
50 55 60

Thr Asp Thr Phe Gly Ser Gln Val Arg Ile Lys Gly Lys Glu Thr Glu
65 70 75 80

Phe Tyr Leu Cys Met Asn Arg Lys Gly Lys Leu Val Gly Lys Pro Asp
85 90 95

Gly Thr Ser Lys Glu Cys Val Phe Ile Glu Lys Val Leu Glu Asn Asn
100 105 110

Tyr Thr Ala Phe Met Ser Ala Lys Tyr Pro Gly Trp Tyr Val Gly Phe
115 120 125

Thr Lys Lys Gly Arg Pro Arg Lys Gly Pro Lys Thr Arg Glu Asn Gln
130 135 140

Pro Asp Val His Phe Met Lys Arg Tyr Pro Lys Gly Gln Pro Glu Leu
145 150 155 160

Gln Lys Pro Phe Lys Tyr Thr Thr Val Thr Lys Arg Ser Arg Arg Ile
165 170 175

Arg Pro Thr His Pro Ala
180

<210> 15
<211> 174
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> 3-point mutant - shortened

<400> 15

Met Ala Glu Glu Asn Val Asp Phe Arg Ile His Val Glu Asn Gln Thr
1 5 10 15

Arg Ala Arg Asp Asp Val Ser Arg Lys Gln Leu Arg Leu Tyr Gln Leu
20 25 30

Tyr Ser Arg Thr Ser Gly Lys His Ile Gln Val Leu Gly Arg Arg Ile
35 40 45

Ser Ala Arg Gly Glu Asp Gly Asp Lys Tyr Ala Gln Leu Leu Val Glu
50 55 60

Thr Asp Thr Phe Gly Ser Gln Val Arg Ile Lys Gly Lys Glu Thr Glu
65 70 75 80

Phe Tyr Leu Cys Met Asn Arg Lys Gly Lys Leu Val Gly Lys Pro Asp
85 90 95

CZ 2021 - 303 A3

Gly Thr Ser Lys Glu Cys Val Phe Ile Glu Lys Val Leu Glu Asn Asn
 100 105 110

Tyr Thr Ala Phe Met Ser Ala Lys Tyr Pro Gly Trp Tyr Val Gly Phe
 115 120 125

Thr Lys Lys Gly Arg Pro Arg Lys Gly Pro Lys Thr Arg Glu Asn Gln
 130 135 140

Pro Asp Val His Phe Met Lys Arg Tyr Pro Lys Gly Gln Pro Glu Leu
 145 150 155 160

Gln Lys Pro Phe Lys Tyr Thr Thr Val Thr Lys Arg Ser Arg
 165 170

<210> 16
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> 4-point mutant

<400> 16

Met Ala Glu Glu Asn Val Asp Phe Arg Ile His Val Glu Asn Gln Thr
 1 5 10 15

Arg Ala Arg Asp Asp Val Ser Arg Lys Gln Leu Arg Leu Tyr Gln Leu
 20 25 30

Tyr Ser Arg Thr Ser Gly Lys His Ile Gln Val Leu Gly Arg Arg Ile
 35 40 45

Ser Ala Arg Gly Glu Asp Gly Asp Lys Tyr Ala Gln Leu Leu Val Glu
 50 55 60

Thr Asp Thr Phe Gly Ser Gln Val Arg Ile Lys Gly Lys Glu Thr Gly
 65 70 75 80

Phe Tyr Leu Cys Met Asn Arg Lys Gly Lys Leu Val Gly Lys Pro Asp
 85 90 95

Gly Thr Ser Lys Glu Cys Val Phe Ile Glu Lys Val Leu Glu Asn Asn
 100 105 110

Tyr Thr Ala Phe Met Ser Ala Lys Tyr Pro Gly Trp Tyr Val Gly Phe
 115 120 125

Thr Lys Lys Gly Arg Pro Arg Lys Gly Pro Lys Thr Arg Glu Asn Gln
 130 135 140

Pro Asp Val His Phe Met Lys Arg Tyr Pro Lys Gly Gln Pro Glu Leu
 145 150 155 160

CZ 2021 - 303 A3

Gln Lys Pro Phe Lys Tyr Thr Thr Val Thr Lys Arg Ser Arg Arg Ile
 165 170 175

Arg Pro Thr His Pro Ala
 180

<210> 17
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> 4-point mutant

<400> 17

Met Ala Glu Glu Asn Val Asp Phe Arg Ile His Val Glu Asn Gln Thr
 1 5 10 15

Arg Ala Arg Asp Asp Val Ser Arg Lys Gln Leu Arg Leu Tyr Gln Leu
 20 25 30

Tyr Ser Arg Thr Ser Gly Lys His Ile Gln Val Leu Gly Arg Arg Ile
 35 40 45

Ser Ala Arg Gly Glu Asp Gly Asp Lys Tyr Ala Trp Leu Leu Val Glu
 50 55 60

Thr Asp Thr Phe Gly Ser Gln Val Arg Ile Lys Gly Lys Glu Thr Glu
 65 70 75 80

Phe Tyr Leu Cys Met Asn Arg Lys Gly Lys Leu Val Gly Lys Pro Asp
 85 90 95

Gly Thr Ser Lys Glu Cys Val Phe Ile Glu Lys Val Leu Glu Asn Asn
 100 105 110

Tyr Thr Ala Phe Met Ser Ala Lys Tyr Pro Gly Trp Tyr Val Gly Phe
 115 120 125

Thr Lys Lys Gly Arg Pro Arg Lys Gly Pro Lys Thr Arg Glu Asn Gln
 130 135 140

Pro Asp Val His Phe Met Lys Arg Tyr Pro Lys Gly Gln Pro Glu Leu
 145 150 155 160

Gln Lys Pro Phe Lys Tyr Thr Thr Val Thr Lys Arg Ser Arg Arg Ile
 165 170 175

Arg Pro Thr His Pro Ala
 180

```

<210> 18
<211> 182
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> 5-point mutant

<400> 18
Met Ala Glu Glu Asn Val Asp Phe Arg Ile His Val Glu Asn Gln Thr
1          5          10          15

Arg Ala Arg Asp Asp Val Ser Arg Lys Gln Leu Arg Leu Tyr Gln Leu
20          25          30

Tyr Ser Arg Thr Ser Gly Lys His Ile Gln Val Leu Gly Arg Arg Ile
35          40          45

Ser Ala Arg Gly Glu Asp Gly Asp Lys Tyr Ala Trp Leu Leu Val Glu
50          55          60

Thr Asp Thr Phe Gly Ser Gln Val Arg Ile Lys Gly Lys Glu Thr Gly
65          70          75          80

Phe Tyr Leu Cys Met Asn Arg Lys Gly Lys Leu Val Gly Lys Pro Asp
85          90          95

Gly Thr Ser Lys Glu Cys Val Phe Ile Glu Lys Val Leu Glu Asn Asn
100         105         110

Tyr Thr Ala Phe Met Ser Ala Lys Tyr Pro Gly Trp Tyr Val Gly Phe
115         120         125

Thr Lys Lys Gly Arg Pro Arg Lys Gly Pro Lys Thr Arg Glu Asn Gln
130         135         140

Pro Asp Val His Phe Met Lys Arg Tyr Pro Lys Gly Gln Pro Glu Leu
145         150         155         160

Gln Lys Pro Phe Lys Tyr Thr Thr Val Thr Lys Arg Ser Arg Arg Ile
165         170         175

Arg Pro Thr His Pro Ala
180

```

```

<210> 19
<211> 620
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> example of coding sequence

```



```

<400> 19
ccatgggcag cagccatcat catcatcatc acagcagcgg cctgggtgccg cgcggcagcc      60
atatggccga agaaaatgtg gatcttcgca tccatggtga aaatcagacc cgtgcacgtg      120
atgatgtag  cagtaaacag ctgcgtctgt atcagctgta tagccgtacc agcggtaaac      180
atattcaggt tctgggtcgt cgtattagcg cacgtggtga agatggtgat aaatatgcac      240
agctgctggt tgaaacccgat acctttggta gccaggttcg tattaaggt aaagaaaccg      300
aattctatct gtgcatgaac cgcaaaggta aactggttgg taaaccggat ggcaccagca      360
aagaatgtgt gtttattgaa aaagtgctgg aaaacaacta caccgcactg atgagcgcaa      420
aatatagcgg ttggtatggt ggctttacca aaaaaggtag tccgcgtaaa ggtccgaaaa      480
cacgcgaaaa tcagcaggat gttcatttca tgaagcgtta tccgaaaggc cagccggaac      540
tgcagaaacc gttcaaatat accaccgtta ccaaaccgtg ccgtcgtatt cgtccgacac      600
atccggcata atagctcgag                                     620

```