

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

2553-97

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **12. 02. 96**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **13.02.95, 03.07.95**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **95/9502771, 95/9513505**

(33) Země priority: **GB, GB**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **18. 02. 98**
(Věstník č. 2/98)

(86) PCT číslo: **PCT/EP96/00585**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 96/25492**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 N	15/12
C 12 N	5/10
C 07 K	14/47
A 61 K	38/17

(71) Přihlášovatel:

NOVARTIS AG, Basle, CH;

(72) Původce:

Hauber Joachim dr., Vienna, AT;

(74) Zástupce:

Kubát Jan Ing., Přístavní 24, Praha 7,
17000;

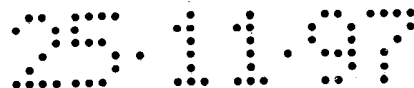
(54) Název přihlášky vynálezu:

Mutantní proteiny, způsob jejich přípravy, farmaceutické prostředky, které je obsahují, a jejich použití

(57) Anotace:

Mutantní proteiny na bázi eIF-5A, které jsou podstatně zbaveny aktivity eIF-5A, a které inhibují funkci Rev a tak vykazují inhibující fenotyp vzhledem k funkci Rev a dále geny nebo sekvence DNA nebo sekvence cDNA kodující tyto proteiny, způsoby jejich přípravy, farmaceutické prostředky, které je obsahují a jejich použití.

CZ 2553-97 A3



Mutantní proteiny, způsob jejich přípravy, farmaceutické prostředky, které je obsahují, a jejich použití

Oblast techniky

Vynález se týká mutantních proteinů, způsobu jejich přípravy, farmaceutických prostředků, které je obsahují a jejich použití.

Dosavadní stav techniky

Replikace viru deficitu lidské imunity (HIV) závisí na funkci virového transaktivačního proteinu Rev. Protein Rev je akumulován v jaderném prostoru hostitelské buňky a váže se přímo a specificky na vysoce strukturovanou sekvenci RNA, nazývanou odezvoový element Rev (RRE), který se vyskytuje na každé neúplně sestřižené virové mRNA. Po navázání, molekuly proteinu Rev konglomerují právě na RRE a spojují se s hostitelským kofaktorem nutným pro transaktivaci Rev, nazývaným eukaryotní iniciační faktor 5A (eIF-5A; starší název: eIF-4D). Výsledkem tohoto spojení je jaderně-cytoplasmatická translokace neúplně sestřižené virové mRNA, následovně umožňující expresi virových strukturních proteinů (např. Gag, Pol, Env) a dále replikaci viru.

Mutantní proteiny Rev s transdominantními (dominantně negativními) fenotypy již byly popsány (viz. např. WO 90/14427). Tyto mutanty Rev jsou dále schopny vazby na RRE RNA, nejsou však schopny funkčního spojení s jejich buněčným kofaktorem, a to kvůli mutaci v aktivační doméně proteinu Rev.

eIF-5A je endogenní protein, potřebný pro normální funkci buňky. Již bylo připraveno několik jeho různých variant (např. J. Biol. Chem. 264 (1989) 18527 - 18530; Mol. Cell. Biol. 11 (1991) 3105 - 3114) a všechny tyto varianty

vykazují nežádoucí vliv na normální buněčné funkce, např. na buněčný růst.

Podstata vynálezu

Nyní bylo zjištěno, že lze připravit takové mutantní formy proteinu eIF-5A, které neblokují endogenní funkci nativního eIF-5A, a normálně nevykazují aktivitu proteinu eIF-5A, inhibují však funkci proteinu Rev; mají tedy vzhledem k funkci proteinu Rev inhibující fenotyp.

Toto zjištění je velmi překvapující, neboť se nepředpokládalo, že faktor, který je neaktivní v buněčném prostředí přirozeném pro jeho nemutovanou formu, by mohl vykazovat inhibující efekt vůči metabolickým pochodům zahájeným vnějším mikroorganismem, jakým je virus. Také se nepředpokládalo, že takové mutantní formy proteinu eIF-5A včetně genů tohoto proteinu by vůbec mohly existovat, protože protein eIF-5A je nezbytný pro buněčnou regulaci (Biofactors 4 (1993) 95-104; TIBS 18 (1993) 475-479). Bylo předpokládáno, že takové proteiny včetně jejich genů by byli toxické vůči buňce, zatímco však geny a proteiny, které jsou předmětem tohoto vynálezu (obzvláště M13, M14 a M13Δ) jsou neaktivní, netoxické a inhibují protein Rev, například jeho funkci v rámci viru HIV, a tím i replikaci HIV.

Předmětem tohoto vynálezu jsou mutantní formy proteinu eIF-5A, které postrádají svoji přirozenou buněčnou aktivitu eIF-5A (v textu nazývaná - endogenní funkce eIF-5A) a zároveň inhibují funkci proteinu Rev, a mají tedy inhibiční fenotyp vzhledem k funkci Rev; dále jsou předmětem tohoto vynálezu jim odpovídající geny a příslušné sekvence DNA a cDNA, které je kódují.

Výhodné jsou mutanty, které jsou podstatně zbaveny endogenní funkce eIF-5A. Zde uváděným eIF-5A je výhodně

lidský eIF-5A a jeho mutanty jsou výhodně založeny na lidské nativní formě eIF-5A. Zde uváděným virem HIV je výhodně jeho forma HIV-1.

Mutantními proteiny se podle vynálezu rozumí polypeptidy včetně svých modifikovaných forem, jako jsou alelické modifikace nebo jejich fragmenty či deriváty schopné inhibovat funkci proteinu Rev a které výhodně nedisponují téměř žádnou endogenní funkcí eIF-5A. Pro farmaceutické účely se používají výhodně ve vysoce čisté formě, tedy podstatně zbavené substancí z nitrobuněčného prostředí.

Mutace zahrnují výhodně úsek nebo více úseků na polypeptidickém řetězci, začínající přibližně na úrovni odpovídající aminokyselině č. 130 v nativním genomu eIF-5A (obr. 3, identifikační č. sekvence - 17), zejména v úseku zhruba mezi aminokyselinou č. 135 a koncem molekuly, především však mezi č. 135 a č. 139.

Odpovídající geny nebo sekvence DNA nebo cDNA jsou ukázány například v tabulce č. 2 především pro mutanty eIF-5AM13, eIF-5AM14 a eIF-5AM13Δ; dále jimi mohou být takové geny či sekvence, které za přísných podmínek hybridizují se sekvencemi kódujícími zmíněné proteiny nebo geny či sekvence, které s nimi nehybridizují pouze v důsledku degenerace genetického kódu, a zároveň výhodně nehybridizují s geny a sekvencemi odpovídajícími nativním formám.

Předmětem vynálezu jsou dále prokaryotní a eukaryotní hostitelské buňky, do kterých jsou transformované nebo transfektované geny nebo sekvence DNA nebo cDNA definované výše, a to tak, že hostitelská buňka je schopna provést expresi těchto genů nebo sekvencí DNA nebo cDNA. Dále jsou předmětem vynálezu biologicky funkční plasmidové nebo virové vektory DNA, obsahující gen nebo sekvenci DNA nebo cDNA definované výše. Předmětem vynálezu jsou také prokaryotní nebo eukaryotní hostitelské buňky, které jsou stabilně

transformované nebo transfektované vektory DNA výše uvedenými.

Předmětem tohoto vynálezu je dále způsob přípravy genů nebo sekvencí DNA nebo cDNA definovaných výše, a to včetně izolace příslušného nativního genu z odpovídajícího expresního systému, jeho naklonování do příslušného systému, provedení požadované genetické mutace a izolace výsledného mutantu z klonů s požadovanou mutací.

Vynález dále zahrnuje způsob produkce výše definovaných proteinů, který zahrnuje kultivaci prokaryotních nebo eukaryotních hostitelských buněk za přítomnosti vhodných živin a za vhodných kultivačních podmínek, transformovaných nebo transfektovaných geny nebo sekvencemi DNA nebo cDNA definovanými výše, a to takovým způsobem, který umožňuje hostitelským buňkám produkci proteinu a popřípadě izolaci výsledného polypeptidického produktu exprese.

Vynález rovněž zahrnuje farmaceutické prostředky obsahující výše definované proteiny, společně alespoň s jedním farmaceuticky vhodným nosičem, s pomocnou látkou nebo pouze s ředidlem. Nosičem mohou být rovněž buňky izolované z pacientova těla a upravené *in vitro* před jejich aplikací. Vynález dále zahrnuje použití výše definovaných proteinů nebo genů či sekvencí DNA nebo cDNA kódujících tyto proteiny při léčbě onemocnění vyvolaných retroviry, u kterých funkce jejich proteinu Rev závisí na funkci eIF-5A, jako jsou viry HIV, HTLV-I a HTLV-II. Předmětem vynálezu je také jejich použití jako léčiva a jejich použití pro přípravu léčiva pro léčení onemocnění způsobených retroviry, u kterých funkce jejich proteinu Rev závisí na funkci eIF-5A, jako jsou viry HIV, HTLV-I a HTLV-II.

Postupy a metody nutné pro uskutečnění zde uváděného vynálezu jsou v oboru známé. Ačkoli jejich příprava zde není konkrétně uvedena, sloučeniny, reakční činidla, vektory, buněčné linie apod., kterých je zapotřebí pro uskutečnění

tohoto vynálezu, jsou všeobecně známé a běžně dostupné nebo je lze získat již konvenčními metodami ze známých a běžně dostupných zdrojů nebo jim podobné zdroje mohou být připraveny konvenčními metodami z jiných obecně známých a běžně dostupných zdrojů.

Příklady provedení vynálezu

a) Příprava mutantů eIF-5A

Lidská cDNA kódující eIF-5A (J. Cell Biol. 123/6, 1309 - 1320/(1993)) byla inzertována jako HindIII fragment do jediného restrikčního místa HindIII vektoru M13mp18 (Pharmacia, Švédsko). Odpovídající jednořetězcová DNA byla použita pro mutagenezi metodou „oligonukleotidem řízené mutageneze in vitro, verze 2“ (Amersham, UK). Sekvence všech mutantů byly určeny sekvencováním DNA s použitím Sequenase 2.0 z United States Biochemicals. Dále byla v buňkách COS provedena exprese všech mutovaných genů kódujících eIF-5A (viz. Tabulka č. 1), následovaná imunoprecipitační analýzou specifickou pro eIF-5A, kterou byla potvrzena přítomnost požadovaného produktu exprese.

Tabulka 1

Mutanty eIF-5A

Mutant	Pozice (ak)	Mutace (ak)	vázání Rev <i>in vitro</i>	komplementace v kvasinkách
peF-5AM1	4, 5, 6	DLD→EDL	nz.	ano
peF-5AM2	9, 10	TG→DL	nz.	ano
peF-5AM3	15, 16, 17	SAT→ADL	nz.	ano
peF-5AM4	22, 23, 24	CSA→GDL	-	ne
peF-5AM5	43, 44, 45	MST→IDL	-	ne
peF-5AM6	46, 47, 48	SKT→LDL	-	ne
peF-5AM7	64, 65	FT→DL	-	ne
peF-5AM8	69, 70	YE→DL	-	ne
peF-5AM9	75, 76	ST→DL	-	ne
peF-5AM10	98, 99, 100	YLS→LDL	-	ne
peF-5AM11	104, 105, 106	DSG→QDL	nz.	ano
peF-5AM12	126, 127	KY→DL	nz.	ano
peF-5AM13	135, 136	IT→DL	+	ne
peF-5AM14	138, 139	LS→DL	+	ne
peF-5AM15	141, 142, 143	MTE→IDL	nz.	ano
peF-5AM16	149, 150	IK→DL	-	ne
peF-5AM13Δ*	135	DLCCLP-STOP	+	ne

* peIF-5A13Δ je protein o 140 aminokyselinách (ak) po deleci C-terminálu proteinu peIF-5A. Jeho sekvence je: nativní od aminokyseliny č. 1 až po č. 134 a dále aminokyseliny: DLCCLP. Všechny ostatní mutanty jsou vzniklé substitucí aminokyselin.

+ značí aktivitu nativní, - značí žádnou aktivitu, nz. značí nestanovováno.

Nukleotidové sekvence specifických oligonukleotidů použitých pro přípravu uvedených 17 mutantů jsou uvedeny v Tabulce 2 (identifikační č. sekvence 1 až 16). Poslední mutant, M13Δ, byl připraven za použití stejného oligonucleotidu jako M13; chyba v postupu mutageneze však způsobila vznik mutantu M13Δ.

Je nutno vzít na zřetel, že uvedené sekvence nukleotidů jsou pouze reprezentativními ukázkami pro 17 připravených mutantů, a že je možno připravit identické mutanty z celé řady jiných sekvencí, vezmeme-li v úvahu např. odchylky od standardního genetického kódu.

Tabulka 2

Oligonukleotidy použité pro přípravu mutantů eIF-5A

M1:	5'- GGC AGA TGA AGA TCT CTT CGA GAC AGG - 3'
M2:	5'- CTT GGA CTT CGA AGA TCT AGA TGC AGG - 3'
M3:	5 - GCA GGG GCC GCA GAT CTC TTC CCA ATG C - 3'
M4:	5'- CCC AAT GCA GGG AGA TCT ATT ACG TAA G - 3'
M5:	5'- CGT CGA GAT AGA TCT TTC GAA GAC TGG - 3'
M6:	5'- CGA GAT GTC TAC TTT AGA TCT TGG CAA GCA CG - 3'
M7:	5'- GGT ATT GAC ATA GAT CTT GGG AAG AAA TAT G - 3'
M8:	5'- GGG AAG AAA GAT CTA GAT ATC TGC CCG - 3'
M9:	5'- GAT ATC TGC CCA GAT CTT CAT AAT ATG G - 3'
M10:	5'- GGC ATC CAG GAT GGG TTA GAT CTA CTG CTC CAG GAC AGC G - 3'
M11:	5'- CTG CTC CAG GAA GAT CTG GAG GTA CGA G - 3'
M12:	5'- GAG ATT GAG CAA GAT CTC GAC TGT GGA G - 3'
M13:	5'- GAA GAG ATC CTA GAT CTG GTG CTG TCT GCC - 3'
M14:	5'- CCT GAT CAC GGT AGA TCT TGC CAT GAC AGA GG - 3'
M15:	5'- GCT GTC TGC CAT AGA TCT GGA GGC AGC TG - 3'
M16:	5'- GCA GCT GTT GCA GAT CTG GCC ATG GC - 3'

b) Testování buněčné aktivity eIF-5A mutantů eIF-5A
v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae*

Sekvence kódující eIF-5A byly inzertovány do restrikčních míst BamHI a XbaI kvasinkového shuttle-vektoru pRSGAL za použití technologie polymerázové řetězové reakce (PCR). Pro účely testování komplementační kapacity různých mutantů eIF-5A v kvasinkovém kmeni *Saccharomyces cerevisiae* neobsahujícím eIF-5A byla použita plasmidová technologie publikovaná v Mol. Gen. Genet. 244, 646 - 652 (1994).

Výsledky jsou shrnuty v Tabulce 1; několik mutantů eIF-5A, zvláště od peIF-5AM4 až po peIF-5AM10 a dále peIF-5AM13, peIF-5AM16 a peIF-5AM13Δ bylo identifikováno jako nefunkční mutanty proteinu eIF-5A.

c) Vázání in vitro nefunkčních mutovaných proteinů eIF-5A k transkripčnímu proteinu Rev viru HIV s použitím testu změny pohyblivosti v gelu

Geny nativní a všech nefunkčních forem proteinu eIF-5A byly inzertovány mezi restrikční místa BamHI a EcoRI prokaryotního expresního vektoru pGEX-3X (Pharmacia) s použitím polymerázové řetězové reakce a dále byla provedena jejich exprese ve formě fúzních proteinů obsahujících glutathion-S-transferázu (GST) v *Escherichia coli*, následovaná purifikací. Různé fúzní proteiny GST-eIF-5A byly dále použity v testech změny pohyblivosti v gelu spolu s RRE RNA označenou izotopem ^{32}P a s rekombinantním proteinem Rev (Nature 342, 816-819(1989)), podle postupu popsáno v časopise Biochemistry 32, 10497-10505 (1993).

Jako první byl testován vliv nativního proteinu GST-eIF-5A na komplex RRE:Rev. Jak je ukázáno na obrázku 1A, přidavek proteinu GST-eIF-5A do reakční směsi RRE RNA obsahující Rev umožnil detekci komplexu o vyšší molekulové hmotnosti a o jednoznačně snížené pohyblivosti (Obr. 1A, pruhy 5 a 4). Tento nebyl detekovatelný za inkubace RRE RNA spolu s GST nebo se samotným GST-eIF-5A (Obr. 1A, pruhy 2 a 3).

Dále bylo testováno, zda odezva specifická pro protein eIF-5A závisí na přítomnosti aktivační domény v transkripčním proteinu Rev. Za účelem tohoto zjištění byly použity již dříve popsané mutantní proteiny Rev9Δ14 a Rev11Δ14 (Biochemistry 32, 8945-8954 (1993)). Oba tyto proteiny obsahují vnitřní delecii v blízkosti C-terminálu a

vykazují vůči RRE RNA specifickou vaznou afinitu a specificitu, která je porovnatelná s nativní formou Rev. Důležité je, že z proteinu Rev9 Δ 14 byla zcela odstraněna aktivační doména, která však v proteinu Rev11 Δ 14 byla zachována. Nižší molekulová hmotnost obou proteinů způsobila posun proužků komplexu RRE:protein, který bylo obtížné určit při testu změny pohyblivosti v gelu. Výsledky však jednoznačně ukazují, že mutant s odstraněnou aktivační doménou Rev9 Δ 14 není schopen interakce s GST-eIF-5A (Obr. 1A, pruhy 6 a 7). Naproti tomu přidavek GST-eIF-5A k reakční směsi RRE:Rev11 Δ 14 způsobil nový výsledek (Obr. 1A, pruhy 8 a 9; pomaleji se pohybující bod v pruhu 9), který indikuje interakci eIF-5A s aktivační doménou Rev.

Nakonec byly podle stejného postupu testovány vazebné schopnosti různých nefunkčních mutantních proteinů eIF-5A. Jak plyne z obrázku 1B, většina mutantních proteinů GST-eIF-5A ztratila schopnost rozlišovat komplex RRE:Rev (pruhy 4 až 10 a pruh 13). Tři nefunkční mutantní proteiny: GST-eIF-5AM13, GST-eIF-5AM14 a GST-eIF-5AM13 Δ , však prokazují vázání, které je porovnatelné s vázáním nativního proteinu eIF-5A (Obr. 1B, pruh 3 a 11, 12 a 14).

Výsledky tedy ukazují, že mutanty eIF-5AM13, eIF-5AM14 a eIF-5AM13 Δ vyhovují požadavkům pro inhibitory funkce HIV-1 Rev, a to vzhledem:

(1) ke ztrátě endogenní funkce proteinu eIF-5A (viz.

komplementaci v kvasinkách, Tabulka I), a

(2) k vazebné aktivitě vůči proteinu HIV-1 Rev (viz vázání Rev *in vitro*; Tabulka I a Obrázek 1B).

d) Konstitutivní inhibice replikace HIV-1 v lidských T - buňkách retrovirálně zprostředkovaným genovým transferem transdominantních mutant eIF-5A.

Pro účely testování inhibičních fenotypů proteinů eIF-5AM13, eIF-5AM14 a eIF-5AM13 Δ byly příslušné sekvence kódující eIF-5A inzertovány do restrikčního místa Xho I retrovirálního vektoru pBC 140, sbaleny *in vitro* za použití buněčné linie Am 12 a přeneseny do lidských T - buněk CEM pro konstitutivní expresi, jak je popsána v Proc. Natl. Acad. Sci. 89, 9870-9874 (1992). Expresie nativního genu eIF-5A, genu kódujícího eIF-5AM9 a samotného retrovirálního vektoru bylo využito pro referenční porovnání v těchto experimentech.

Rovněž byly provedeny experimenty s HIV-1, a to za použití TCID o hodnotě 2000/ml kmene HIV-1 SF2. Desátý den po infekci SF2 byly odebrány vzorky z kultivačního média pro test replikace HIV-1 pomocí stanovení proteinu p24 Gag za použití testu ELISA. Jak je ukázáno na Obrázku 2, replikace HIV-1 byla podstatně snížena v každé ze tří nezávisle klonovaných buněčných linií CEM (označené jako A, B, C) produkujících eIF-5AM13, eIF-5AM14 nebo eIF-5AM13 Δ (Obrázky 2C, 2D a 2E; vlevo), a to v porovnání s buňkami CEM, produkujícími mutantní protein eIF-5AM9 (CEM-eIF-5AM9; Obr. 2B). Maximální virová replikace byla zjištěna v buňkách CEM produkujících parentální vektor pBC140 (vektor CEM; Obr. 2A) nebo nativní protein eIF-5A (CEM-eIF-5Awt; Obr. 2A). Pozorované inhibující vlastnosti nebyly způsobeny obecnou inhibicí buněčné proliferace, což dokládají srovnatelné počty buněk v experimentech (Obr. 2; vpravo).

Závěrem, tyto experimenty prokazují, že (1) konstitutivní exprese proteinů eIF-5AM13, eIF-5AM14 nebo eIF-5AM13 Δ nemá v lidských T - buňkách CEM toxické účinky a (2) že eIF-5AM13, eIF-5AM14 a eIF-5AM13 Δ jsou inhibitory replikace HIV-1.

HIV je predominantním etiologickým původcem AIDS (syndromu získané imunodeficience); HTLV-I způsobuje mimo jiné ATL (leukémii T - buněk dospělých); HTLV-II souvisí etiologicky s některými případy variantní leukémie vlasových T - buněk. Bylo zjištěno, že transaktivátory HIV Rev a HTLV-I Rex jsou důležité pro virovou replikaci v médiu. Dále bylo prokázáno, že HTLV-I Rex je schopen funkčně nahradit protein Rev v HIV. Navíc, Rev a Rex jsou proto možnými cíly pro terapeutickou intervenci u postižených pacientů. Mutantní formy eIF-5A podle vynálezu účinkují jako efektivní kompetitivní inhibitory nativní formy Rev nebo/a funkce nativního Rex v důsledku schopnosti Rex funkčně nahradit Rev v HIV. Vzhledem k tomu tyto mutantní formy eIF-5A mohou být také efektivními inhibitory replikace HIV nebo/a HTLV-I nebo/a HTLV-II. Mohou být tedy použity k ochraně lymfoidních nebo/a myeloidních buněk pacientů vystavených infekci a proto mohou být použity pro léčbu onemocnění způsobených HTLV-I a HTLV-II nebo HIV, a to včetně AIDS a ARS nebo ARC (syndromu nebo komplexu souvisejícího s AIDS). Také mohou být použity pro léčbu onemocnění způsobených AIDS protože jsou schopny inhibovat činnost proteinů HTLV-I Rex a HIV Rev. Tato vlastnost může být obzvláště prospěšná u pacientů infikovaných více než jediným virovým patogenem a dále u těch, u kterých není zjištěno, kterým z těchto dvou původců jsou infikováni.

Tento vynález je tedy určen pro profylaxi a terapii virových a obzvláště retrovirových onemocnění, jako jsou ATL, AIDS, ARS (nebo ARC), infekce způsobené viry jako jsou SIV (opičí virus deficitu imunity) jako je SIV_{mac}, FIV (kočičí virus deficitu imunity), EIAV (koňský virus infekční anémie), virus visna, virus deficitu imunity hovězího dobytka a zejména lidská retrovirová onemocnění, zvláště lidská

retrovirová onemocnění způsobená patogeny regulovanými geny *rex* nebo *rev* nebo jejich ekvivalenty, jako je ATL, AIDS a ARS (nebo ARC). Zvláštní pozornost si zaslouhuje multivalentní využití represorového efektu, neboť toto využití je výhodné při léčbě násobných, obzvláště podvojných virových infekcí, jak lze často pozorovat například u osob užívajících intravenózně drogy a infikovaných současně HIV a HTLV-I nebo při léčbě infekcí způsobených jedním patogenem za zvýšeného rizika další infekce, jako je infekce HIV či v případě profylaxe za takových situací, kdy je zapotřebí ochrany proti infekci způsobené spektrem různých virových kmenů.

Terapeutické možnosti tohoto vynálezu jsou zcela zřejmé, neboť potlačení například funkce *Rex* u HTLV-I a funkce *Rev* u HIV blokuje virovou replikaci, a tak zabráněním tvorby infekčních virových částic snižuje virovou zátěž a předpokládá se tedy, že prodlužuje latentní období infekce. Buňky osob infikovaných virem HIV, mající ve svém genomu zaintegrováný gen kódující mutantní represor *eIF-5A*, zůstanou funkční a tyto osoby budou neomezeně dlouho uchráněny před projevem symptomů onemocnění bez potřeby další dlouhodobé terapie.

Z tohoto pohledu jsou geny podle vynálezu samy o sobě léčivými určenými pro jednorázové nebo vícerázové dávkování buďto přímo *in vivo* nebo nepřímo *in vitro*, výhodně jako součást vektorů, například retrovirálního nebo plasmidového, a to ve formě vhodné pro dosažení přenosu ve funkční formě do cílových savčích buněk. Například inserce genů kódujících tyto inhibitory virové replikace může být provedena *in vitro* do buněk pacientů přímou implantací do genomu lymfoidních nebo/a myeloidních buněk odebraných z těchto pacientů a tyto buňky mohou být pacientovi dodány po provedení inserce. Vzhledem k tomu, že HTLV-I a HTLV-II, stejně tak jako i HIV se replikují v různých typech T - buněk, potom onemocnění která způsobují, budou vhodně léčena. T - buňky jsou proto

požadovanými cílovými buňkami pro genetickou modifikaci využívající geny podle vynálezu. Dále, monocytární a makrofágové buňky, které jsou cílovými buňkami pro infekci HIV, jsou také vhodnými cílovými buňkami pro tuto modifikaci. Výhodně se provádí modifikace hematopoetických kmenových buněk, čímž se zajistí dlouhodobá ochrana buněčného potomstva násobného hematopoetického rodu.

Jedno využití uvedeného souvisí s konceptem genové terapie uveřejněným T. Friedmanem v Science, 244, (1989), 1275 nebo P.M. Lehmem v Bone Marrow Transplant 1 (1987) 243. Hematopoetické kmenové buňky jsou izolovány například z pacientů postižených AIDS/ATL, kultivovány *in vitro* a mutantní geny podle vynálezu, kódující inhibitor funkce, která má být potlačena, jmenovitě funkce Rev/Rex, jsou implantovány do těchto buněk za použití retrovirových vektorů. Tyto buňky, nyní již resistantní vůči virům, jsou vráceny do imunitního systému původního pacienta, kde se očekává jejich proliferace vzhledem k jejich získané selektivní výhodě v porovnání s ostatními kmenovými buňkami. V požadovaném čase se bude populace hematopoetických buněk skládat výhradně z buněk produkujících represní faktor a bude resistantní vůči virům.

Postupy k dosažení uvedeného jsou již v oboru známé, viz, např. USP 4'868'116. Vektory, například retrovirové nebo plasmidové vektory pro přenos mutovaných genů podle vynálezu do cílových savčích buněk, jako jsou buňky kostní dřeně, jsou uveřejněny nebo k nim existují odkazy, například v Science 244 (1989) 1275. Například různé transdominantní geny kódující Rev nebo/a Rex již byly inzertovány do retrovirových vektorových systémů. Po přenosu genu prostřednictvím retrovirů do lidských buněčných linií infikovaných např. HIV je inhibiční efekt mutantů zřejmý na inhibici produkce virů. Zmíněný terapeutický koncept je příkladem intracelulární

imunizace vysvětlené v práci D. Baltimore v Nature, 335, (1988), 395. Souhrnem řečeno, tento koncept zahrnuje inzerci genu, který kóduje represor některé životně důležité funkce zvoleného viru, do příslušných cílových buněk, které tento virus infikuje (např. určité T - buňky a monocytární a makrofágové buňky v případě viru vyvolávajícího AIDS). Použití tohoto konceptu při terapii represorem kteréhokoli viru je vázáno na podmínku, že použité vektory pro geny kódující tyto mutantní proteiny a použité metody pro inzerci těchto vektorů do náležitých buněk, identifikované jako modely, budou představovat efektivní a bezpečný intrabuněčný systém přenosu pro využití u lidí i u zvířat. Před experimentálním ověřením tohoto konceptu tedy stojí pouze etické překážky, které v současné době zabraňují genové terapii. První takové experimenty na osobách již však byly zahájeny, a to se zaměřením na bezpečnost a vlastní terapii (viz. G.T. Nabel, Human Gene Therapy, 5, (1994), 79-82). Očekává se, že ve velmi krátké době po ověření neškodnosti tohoto postupu, budou tyto průkopnické experimenty následovány podobnými experimenty s terapeutickými cíly, a to především za stavů ohrožujících život, jako je onemocnění AIDS a že tento vynález se ukáže jako velmi vhodný pro využití během těchto experimentů (viz. např. T. Friedman, Science 244 (1989), 1279, druhý sloupec: „Infekční onemocnění“).

Dalším způsobem využití tohoto vynálezu je inzerce nikoli genu, nýbrž přímo represního proteinu podle vynálezu do cílových buněk. Orální nebo parenterální podání se provádí běžným způsobem umožňujícím intracelulární penetraci, a to např. prostřednictvím lipozómů. V případech takového využití bude přesná dávka samozřejmě záviset na použité sloučenině, způsobu podání a požadované léčbě; určení nejvhodnější dávky v dané situaci je v možnostech kvalifikovaného odborníka.

Je třeba vzít na zřetel, že v předchozím textu uvedený vynález může podléhat různým kombinacím nebo změnám jeho formy či jednotlivých detailů, aniž by došlo k odklonu od rozsahu tohoto vynálezu. Také je nutno vzít na zřetel, že do rozsahu tohoto vynálezu spadají také další mutanty mimo zde uvedených, a to včetně mutantů patřící mezi mutanty již zkonstruované a zde uvedené, které však zatím nebyly charakterizovány, ale mohou být shledány po detailnějším zkoumání jako inhibující nebo/a multivalentní, a dále další mutanty, které odpovídají výše uvedeným principům, ale nejsou zde specificky uvedeny.

Popis obrázků:

Obrázek 1: *In vitro* experiment posunu RNA v gelu.
 FP = volná sonda; eIF-5A (-) = bez eIF-5A.

Obrázek 2: Experimenty s HIV-1. Hodnoty p24Gag jsou ukázány vlevo. Počty buněk u příslušných experimentů jsou ukázány napravo:

- A: CEM-vektor / eIF-5A wt
- B: CEM-eIF-5AM9
- C: CEM-eIF-5AM13
- D: CEM-eIF-5AM14
- E: CEM-eIF-5AM13Δ

Obrázek 3: (Sekvence č. 17): Sekvence cDNA a aminokyselinativního lidského eIF-5A (J. Biol. Chem. 264 (1989) 1581) (Sekvence č. 17); aminokyselina lysin znázorněná na pozici č. 50 je posttranslačně zmodifikována na hypusin. Aminokyseliny nativního eIF-5A, které byly zmutovány podle přehledu v Tabulce 1 jsou uvedeny v kurzívě. Specifické použité oligonukleotidy (Tabulka 2, Sekvence č. 1 až č. 16) odpovídají následujícím pozicím nukleotidů v Obrázku 3 (Sekvence č. 17):

M1:	3-29	(27 nukleotidů)
M2:	12-38	(27 nukleotidů)
M3:	34-61	(28 nukleotidů)
M4:	54-81	(28 nukleotidů)
M5:	120-146	(27 nukleotidů)
M6:	123-154	(32 nukleotidů)

M7: 178-208 (31 nukleotidů)
M8: 196-222 (27 nukleotidů)
M9: 211-238 (28 nukleotidů)
M10: 277-316 (40 nukleotidů)
M11: 301-328 (28 nukleotidů)
M12: 364-291 (28 nukleotidů)
M13: 391-420 (30 nukleotidů)
M14: 399-430 (32 nukleotidů)
M15: 411-439 (29 nukleotidů)
M16: 433-458 (26 nukleotidů)
M13Δ:391-421 (30 nukleotidů, pozice č. 409
je bez translace, a je následována kodónem
STOP na pozicích 422-424), výsledkem jsou
změny aminokyselin uvedené v Tabulce 1
v sekvenci nativního proteinu.

Seznam sekvencí

Informace o sekvenci č. 1 (M1):

- (i) Charakteristika sekvence:
 - (A) Délka: 27 párů bází
 - (B) Typ:
 - (C) Řetězec: dvojitý
 - (D) Topologie: lineární
- (ii) Druh molekuly: cDNA
- (iii) Hypothetický: Ne
- (iii) Antisense: Ne
- (vi) Původní zdroj:
 - (A) Organismus: Syntetický
- (x) Informace o zveřejnění:
 - (H) Číslo dokumentu:-
 - (I) Datum podání:-
 - (J) Datum zveřejnění:-
- (xi) Popis sekvence: Sekvence č. 1:

GGC AGA TGA AGA TCT CTT CGA GAC AGG

Informace o sekvenci č. 2 (M2):

- (i) Charakteristika sekvence:
 - (A) Délka: 27 párů bází
 - (B) Typ:
 - (C) ~~Řetězec: dvojitý~~
 - (D) Topologie: lineární
- (ii) Druh molekuly: cDNA
- (iii) Hypothetický: Ne
- (iii) Antisense: Ne
- (vi) Původní zdroj:
 - (A) Organismus: Syntetický

(x) Informace o zveřejnění:

(H) Číslo dokumentu:-

(I) Datum podání:-

(J) Datum zveřejnění:-

(xi) Popis sekvence: Sekvence č. 2:

CTT GGA CTT CGA AGA TCT AGA TGC AGG

Informace o sekvenci č. 3 (M3):

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 28 párů bází

(B) Typ:

(C) Řetězec: dvojitý

(D) Topologie: lineární

(ii) Druh molekuly: cDNA

(iii) Hypothetický: Ne

(iii) Antisense: Ne

(vi) Původní zdroj:

(A) Organismus: Syntetický

(x) Informace o zveřejnění:

(H) Číslo dokumentu:-

(I) Datum podání:-

(J) Datum zveřejnění:-

(xi) Popis sekvence: Sekvence č. 3 :

GCA GGG GCC GCA GAT CTC TTC CCA ATG C

Informace o sekvenci č. 4 (M4):

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 28

(B) Typ:

(C) Řetězec: dvojitý

(D) Topologie: lineární

- (ii) Druh molekuly: cDNA
- (iii) Hypothetický: Ne
- (iii) Antisense: Ne
- (vi) Původní zdroj:
 - (A) Organismus: Syntetický
- (x) Informace o zveřejnění:
 - (H) Číslo dokumentu:-
 - (I) Datum podání:-
 - (J) Datum zveřejnění:-
- (xi) Popis sekvence: Sekvence č. 4:

CCC AAT GCA GGG AGA TCT ATT ACG TAA G

Informace o sekvenci č. 5 (M5):

- (i) Charakteristika sekvence:
 - (A) Délka: 27 párů bází
 - (B) Typ:
 - (C) Řetězec: dvojitý
 - (D) Topologie: lineární
- (ii) Druh molekuly: cDNA
- (iii) Hypothetický: Ne
- (iii) Antisense: Ne
- (vi) Původní zdroj:
 - (A) Organismus: Syntetický
- (x) Informace o zveřejnění:
 - (H) Číslo dokumentu:-
 - ~~(I) Datum podání:-~~
 - (J) Datum zveřejnění:-
- (xi) Popis sekvence: Sekvence č. 5:

CGT CGA GAT AGA TCT TTC GAA GAC TGG

Informace o sekvenci č. 6 (M6):

- (i) Charakteristika sekvence:
 - (A) Délka: 32 párů bází
 - (B) Typ:
 - (C) Řetězec: dvojitý
 - (D) Topologie: lineární
- (ii) Druh molekuly: cDNA
- (iii) Hypothetický: Ne
- (iii) Antisense: Ne
- (vi) Původní zdroj:
 - (A) Organismus: Syntetický
- (x) Informace o zveřejnění:
 - (H) Číslo dokumentu:-
 - (I) Datum podání:-
 - (J) Datum zveřejnění:-
- (xi) Popis sekvence: Sekvence č. 6:

CGA GAT GTC TAC TTT AGA TCT TGG CAA GCA CG

Informace o sekvenci č. 7 (M7):

- (i) Charakteristika sekvence:
 - (A) Délka: 31 párů bází
 - (B) Typ:
 - (C) Řetězec: dvojitý
 - (D) Topologie: lineární
- (ii) Druh molekuly: cDNA
- (iii) Hypothetický: Ne
- (iii) Antisense: Ne
- (vi) Původní zdroj:
 - (A) Organismus: Syntetický
- (x) Informace o zveřejnění:
 - (H) Číslo dokumentu:-

- (I) Datum podání:-
- (J) Datum zveřejnění:-
- (xi) Popis sekvence: Sekvence č. 7:

GGT ATT GAC ATA GAT CTT GGG AAG AAA TAT G

Informace o sekvenci č. 8 (M8):

- (i) Charakteristika sekvence:
 - (A) Délka: 27 párů bází
 - (B) Typ:
 - (C) Řetězec: dvojitý
 - (D) Topologie: lineární
- (ii) Druh molekuly: cDNA
- (iii) Hypothetický: Ne
- (iii) Antisense: Ne
- (vi) Původní zdroj:
 - (A) Organismus: Syntetický
- (x) Publikáční informace:
 - (H) Číslo dokumentu:-
 - (I) Datum podání:-
 - (J) Datum zveřejnění:-
- (xi) Popis sekvence: Sekvence č. 8:

GGG AAG AAA GAT CTA GAT ATC TGC CCG

Informace o sekvenci č. 9 (M9):

- (i) Charakteristika sekvence:
 - (A) Délka: 28 párů bází
 - (B) Typ:
 - (C) Řetězec: dvojitý
 - (D) Topologie: lineární
- (ii) Druh molekuly: cDNA
- (iii) Hypothetický: Ne

(iii) Antisense: Ne

(vi) Původní zdroj:

(A) Organismus: Syntetický

(x) Informace o zveřejnění:

(H) Číslo dokumentu:-

(I) Datum podání:-

(J) Datum zveřejnění:-

(xi) Popis sekvence: Sekvence č. 9:

GAT ATC TGC CCA GAT CTT CAT AAT ATG G

Informace o sekvenci č. 10 (M10):

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 40 párů bází

(B) Typ:

(C) Řetězec: dvojitý

(D) Topologie: lineární

(ii) Druh molekuly: cDNA

(iii) Hypothetický: Ne

(iii) Antisense: Ne

(vi) Původní zdroj:

(A) Organismus: Syntetický

(x) Informace o zveřejnění:

(H) Číslo dokumentu:-

(I) Datum podání:-

(J) Datum zveřejnění:-

(xi) Popis sekvence: Sekvence č. 10:

GGC ATC CAG GAT GGG TTA GAT CTA CTG CTC CAG GAC AGC G

Informace o sekvenci č. 11 (M11):

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 28 párů bází

- (B) Typ:
- (C) Řetězec: dvojitý
- (D) Topologie: lineární
- (ii) Druh molekuly: cDNA
- (iii) Hypothetický: Ne
- (iii) Antisense: Ne
- (vi) Původní zdroj:
 - (A) Organismus: Syntetický
- (x) Informace o zveřejnění:
 - (H) Číslo dokumentu:-
 - (I) Datum podání:-
 - (J) Datum zveřejnění:-
- (xi) Popis sekvence: Sekvence č. 11:

CTG CTC CAG GAA GAT CTG GAG GTA CGA G

Informace o sekvenci č. 12 (M12):

- (i) Charakteristika sekvence:
 - (A) Délka: 28 párů bází
 - (B) Typ:
 - (C) Řetězec: dvojitý
 - (D) Topologie: lineární
- (ii) Druh molekuly: cDNA
- (iii) Hypothetický: Ne
- (iii) Antisense: Ne
- (vi) Původní zdroj:
 - ~~(A) Organismus: Syntetický~~
- (x) Informace o zveřejnění:
 - (H) Číslo dokumentu:-
 - (I) Datum podání:-
 - (J) Datum zveřejnění:-
- (xi) Popis sekvence: Sekvence č. 12:

GAG ATT GAG CAA GAT CTC GAC TGT GGA G

Informace o sekvenci č. 13 (M13):

- (i) Charakteristika sekvence:
 - (A) Délka: 30 párů bází
 - (B) Typ:
 - (C) Řetězec: dvojitý
 - (D) Topologie: lineární
- (ii) Druh molekuly: cDNA
- (iii) Hypothetický: Ne
- (iii) Antisense: Ne
- (vi) Původní zdroj:
 - (A) Organismus: Syntetický
- (x) Informace o zveřejnění:
 - (H) Číslo dokumentu:-
 - (I) Datum podání:-
 - (J) Datum zveřejnění:-
- (xi) Popis sekvence: Sekvence č. 13:

GAA GAG ATC CTA GAT CTG GTG CTG TCT GCC

Informace o sekvenci č. 14 (M14):

- (i) Charakteristika sekvence:
 - (A) Délka: 32 párů bází
 - (B) Typ:
 - (C) Řetězec: dvojitý
 - (D) Topologie: lineární
- (ii) Druh molekuly: cDNA
- (iii) Hypothetický: Ne
- (iii) Antisense: Ne
- (vi) Původní zdroj:
 - (A) Organismus: Syntetický

- (x) Informace o zveřejnění:
 - (H) Číslo dokumentu:-
 - (I) Datum podání:-
 - (J) Datum zveřejnění:-
- (xi) Popis sekvence: Sekvence č. 14:

CCT GAT CAC GGT AGA TCT TGC CAT GAC AGA GG

Informace o sekvenci č. 15 (M15):

- (i) Charakteristika sekvence:
 - (A) Délka: 29 párů bází
 - (B) Typ:
 - (C) Řetězec: dvojitý
 - (D) Topologie: lineární
- (ii) Druh molekuly: cDNA
- (iii) Hypothetický: Ne
- (iii) Antisense: Ne
- (vi) Původní zdroj:
 - (A) Organismus: Syntetický
- (x) Publikační informace:
 - (H) Číslo dokumentu:-
 - (I) Datum podání:-
 - (J) Datum zveřejnění:-
- (xi) Popis sekvence: Sekvence č. 15:

GCT GTC TGC CAT AGA TCT GGA GGC AGC TG

Informace o sekvenci č. 16 (M16):

- (i) Charakteristika sekvence:
 - (A) Délka: 26 párů bází
 - (B) Typ:
 - (C) Řetězec: dvojitý
 - (D) Topologie: lineární

- (ii) Druh molekuly: cDNA
- (iii) Hypothetický: Ne
- (iii) Antisense: Ne
- (vi) Původní zdroj:
 - (A) Organismus: Syntetický
- (x) Informace o zveřejnění:
 - (H) Číslo dokumentu:-
 - (I) Datum vyplnění:-
 - (J) Datum publikování:-
- (xi) Popis sekvence: Sekvence č. 16:

GCA GCT GTT GCA GAT CTG GCC ATG GC

Informace o sekvenci č. 17 (wt):

- (i) Charakteristika sekvence:
 - (A) Délka: 465 párů bází (a 154 aminokyselinových zbytků)
 - (B) Typ: cDNA
 - (C) Řetězec: dvojitý
 - (D) Topologie: lineární
- (ii) Druh molekuly: cDNA
- (iii) Hypothetický: Ne
- (iii) Antisense: Ne
- (vi) Původní zdroj:
 - (A) Organismus: Homo sapiens
- (x) Informace o zveřejnění:
 - (H) Číslo dokumentu: J. Biol. Chem. 264 (1989) 1578-
1583
 - (I) Datum podání:-
 - (J) Datum zveřejnění: 1989
- (xi) Popis sekvence: Sekvence č. 17:

10 30
 ATG GCA GAT GAC TTG GAC TTC GAG ACA GGA GAT GCA GGG GCC TCA
 Met Ala Asp Asp Leu Asp Phe Glu Thr Gly Asp Ala Gly Ala Ser
 1 10
 50 70 90
 GCC ACC TTC CCA ATG CAG TGC TCA GCA TTA CGT AAG AAT GGC TTT
 Ala Thr Phe Pro Met Gln Cys Ser Ala Leu Arg Lys Asn Gly Phe
 20
 110 130
 GTG GTG CTC AAA GGC CGG CCA TGT AAG ATC GTC GAG ATG TCT ACT
 Val Val Leu Lys Gly Arg Pro Cys Lys Ile Val Glu Met Ser Thr
 40
 150 170
 TCG AAG ACT GGC AAG CAC GGC CAC GCC AAG GTC CAT CTG GTT GGT
 Ser Lys Thr Gly Lys His Gly His Ala Lys Val His Leu Val Gly
 60
 190 210
 ATT GAC ATC TTT ACT GGG AAG AAA TAT GAA GAT ATC TGC CCG TCA
 Ile Asp Ile Phe Thr Gly Lys Lys Tyr Glu Asp Ile Cys Pro Ser
 230 250 270
~~ACT CAT AAT ATG GAT GTC CCC AAC ATC AAA AGG AAT GAC TTC CAG~~
 Thr His Asn Met Asp Val Pro Asn Ile Lys Arg Asn Asp Phe Gln
 80 90
 290
 CTG ATT GGC ATC CAG GAT GGG TAC CTA TCA CTG CTC CAG GAC AGC
 Leu Ile Gly Ile Gln Asp Gly Tyr Leu Ser Leu Leu Gln Asp Ser
 100

330 350
 GGG GAG GTA CGA GAG GAC CTT CGT CTC CCT GAG GGA GAC CTT GGC
Gly Glu Val Arg Glu Asp Leu Arg Leu Pro Glu Gly Asp Leu Gly

110
 370 390 4
 AAG GAG ATT GAG AAG TAC GAC TGT GGA GAA GAG ATC CTG ATC ACG
Lys Glu Ile Glu Lys Tyr Asp Cys Gly Glu Glu Ile Leu Ile Thr

130
 10 430 450
 GTG CTG TCT GCC ATG ACA GAG GAG GCA GCT GTT GCA ATC AAG GCC
Val Leu Ser Ala Met Thr Glu Glu Ala Ala Val Ala Ile Lys Ala
 140 150

ATG GCA AAA TAA
 Met Ala Lys End

25.11.97

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Mutantní protein eIF-5A, který inhibuje funkci Rev, a tím vykazuje inhibiční fenotyp vzhledem k funkci Rev nebo gen nebo sekvence DNA nebo sekvence cDNA kódující tento protein.

2. Protein podle nároku 1, který nedisponuje podstatnou endogenní funkcí eIF-5A nebo gen nebo sekvence DNA nebo sekvence cDNA kódující tento protein.

3. Protein podle nároku 1 nebo 2, kterým je protein eIF-5AM13, eIF-5AM14 nebo eIF-5AM13Δ nebo gen nebo sekvence DNA nebo sekvence cDNA kódující tento protein.

4. Prokaryotní nebo eukaryotní hostitelská buňka, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je transformována nebo transfektována genem nebo sekvencí DNA nebo sekvencí cDNA podle nároku 1 nebo 2, a to takovým způsobem, který hostitelské buňce umožňuje expresi tohoto genu nebo sekvence DNA nebo sekvence cDNA.

5. Biologicky funkční plasmid nebo virový vektor DNA, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje gen nebo sekvenci DNA nebo sekvenci cDNA podle nároku 1 nebo 2.

6. ~~Prokaryotní nebo eukaryotní hostitelská buňka,~~ v y z n a č u j í c í s e t í m, že je stabilně transformována nebo transfektována biologicky funkčním plasmidem nebo virovým vektorem DNA obsahujícím gen nebo sekvenci DNA nebo sekvenci cDNA podle nároku 1 nebo 2.

7. Způsob přípravy genu nebo sekvence DNA nebo sekvence cDNA podle nároku 1 nebo 2, v y z n a č u j í c í s e

t í m, že zahrnuje izolaci odpovídajícího nativního genu z příslušného expresního systému, inzerci tohoto genu do příslušného klonovacího systému, provedení požadované genetické mutace a získání výsledného mutantu z klonů obsahujících požadovanou mutaci.

8. Způsob produkce proteinu podle nároku 1 nebo 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje kultivaci prokaryotních nebo eukaryotních buněk transformovaných nebo transfektovaných genem nebo sekvencí DNA nebo sekvencí cDNA podle nároku 1 nebo 2 za vhodných živných podmínek, a to tak, že hostitelské buňce je umožněna exprese proteinu a popřípadě také izolace požadovaného polypeptidického produktu exprese.

9. Farmaceutický prostředek v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje protein podle nároku 1 nebo 2 spolu s alespoň jedním farmaceuticky přijatelným nosičem, s pomocnou látkou nebo s ředidlem nebo ve formě buněk odebraných z pacientova těla a zpracovaných *in vitro* před jejich navrácením do těla.

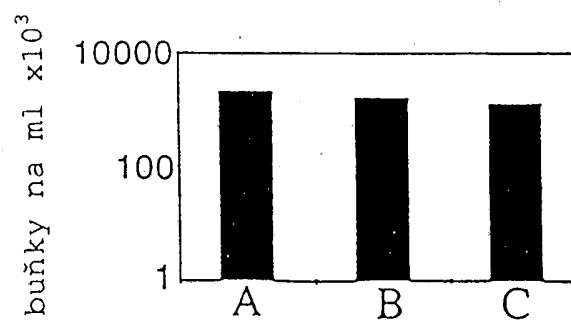
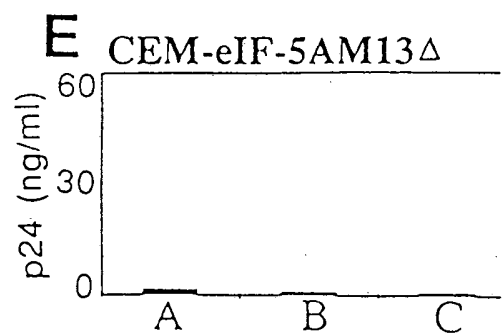
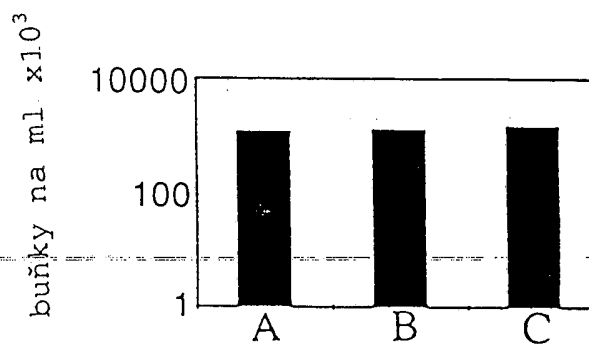
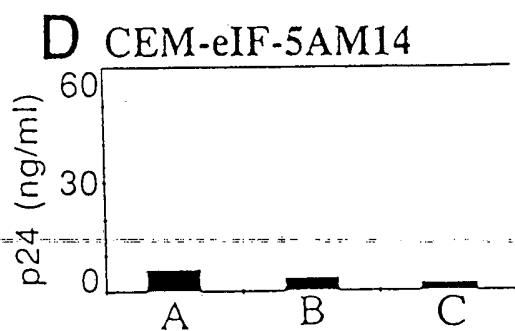
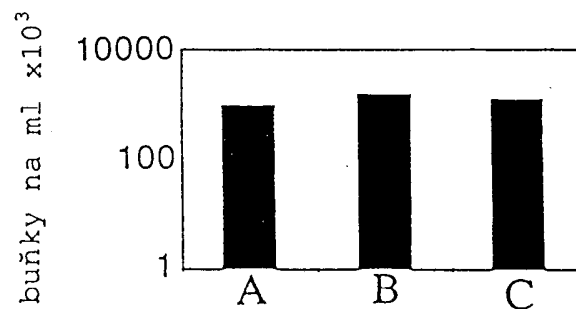
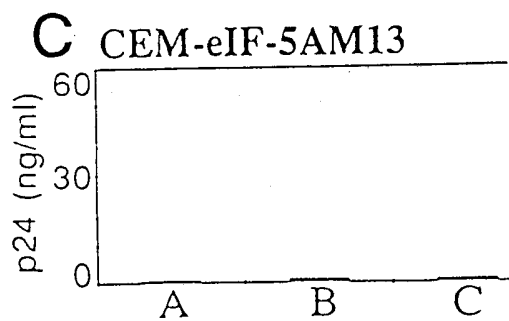
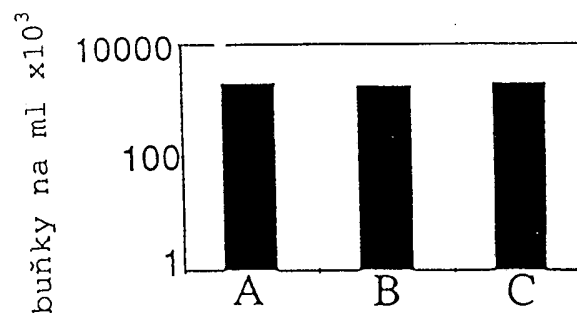
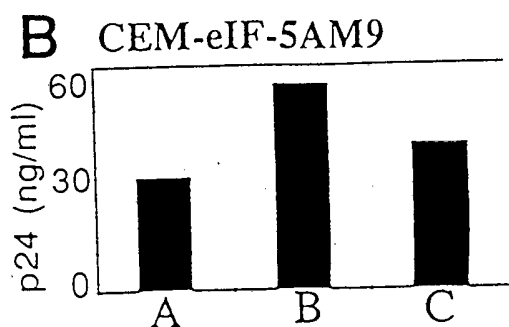
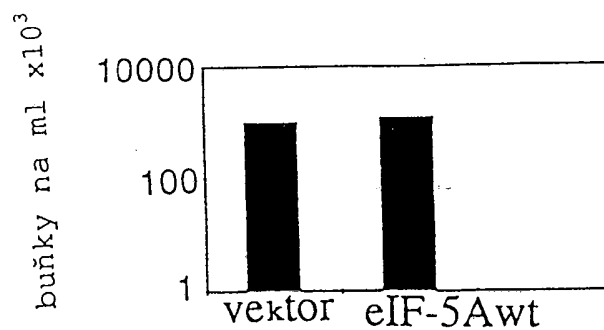
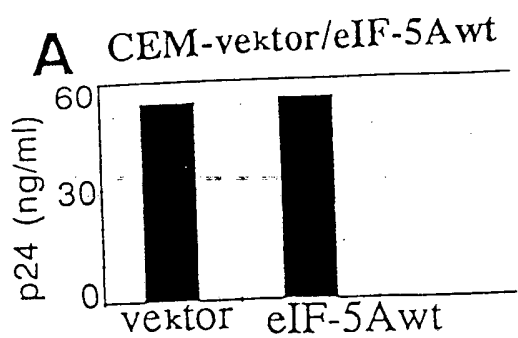
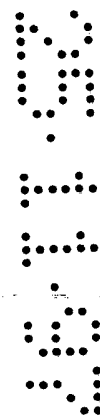
10. Použití proteinu podle nároku 1 nebo 2 nebo genu nebo sekvence DNA nebo sekvence cDNA kódující tento protein při léčbě onemocnění způsobených retroviry, jejichž funkce Rev závisí na eIF-5A.

~~11. Použití proteinu podle nároku 1 nebo 2 nebo genu nebo sekvence DNA nebo sekvence cDNA kódující tento protein při léčbě onemocnění způsobených HIV, HTLV-I nebo/a HTLV-II.~~

12. Protein podle nároku 1 nebo 2 nebo gen nebo sekvence DNA nebo sekvence cDNA kódující tento protein pro použití jako léčivo.

13. Použití proteinu podle nároku 1 nebo 2 k přípravě léčiva
pro léčbu onemocnění způsobených retroviry, jejichž funkce
Rev závisí na eIF-5A.

Obr. 2



Obr. 3

10 30 50
 ATG GCA GAT GAC TTG GAC TTC GAG ACA GGA GAT GCA GGG GCC TCA GCC ACC
 Met Ala Asp Asp Leu Asp Phe Glu Thr Gly Asp Ala Gly Ala Ser Ala Thr
 1 10

70 90
 TTC CCA ATG CAG TGC TCA GCA TTA CGT AAG AAT GGC TTT GTG GTG CTC AAA
 Phe Pro Met Gln Cys Ser Ala Leu Arg Lys Asn Gly Phe Val Val Leu Lys
 20

110 130 150
 GGC CGG CCA TGT AAG ATC GTC GAG ATG TCT ACT TCG AAG ACT GGC AAG CAC
 Gly Arg Pro Cys Lys Ile Val Glu Met Ser Thr Ser Lys Thr Gly Lys His
 40 50

170 190
 GGC CAC GCC AAG GTC CAT CTG GTT GGT ATT GAC ATC TTT ACT GGC AAG AAA
 Gly His Ala Lys Val His Leu Val Gly Ile Asp Ile Phe Thr Gly Lys Lys
 60

210 230 250
 TAT GAA GAT ATC TGC CCG TCA ACT CAT AAT ATG GAT GTC CCC AAC ATC AAA
 Tyr Glu Asp Ile Cys Pro Ser Thr His Asn Met Asp Val Pro Asn Ile Lys
 70 80

270 290
 AGG AAT GAC TTC CAG CTG ATT GGC ATC CAG GAT GGG TAC CTA TCA CTG CTC
 Arg Asn Asp Phe Gln Leu Ile Gly Ile Gln Asp Gly Tyr Leu Ser Leu Leu
 90 100

310 330 350
 CAG GAC AGC GGG GAG GTA CGA GAG GAC CTT CGT CTC CCT GAG GGA GAC CTT
 Gln Asp Ser Gly Glu Val Arg Glu Asp Leu Arg Leu Pro Glu Gly Asp Leu
 110

370 390 4
 GGC AAG GAG ATT GAG CAG AAG TAC GAC TGT GGA GAA GAG ATC CTG ATC ACG
 Gly Lys Glu Ile Glu Gln Lys Tyr Asp Cys Gly Glu Glu Ile Leu Ile Thr
 120 130

10 430 450
 GTG CTG TCT GCC ATG ACA GAG GAG GCA GCT GTT GCA ATC AAG GCC ATG GCA
 Val Leu Ser Ala Met Thr Glu Glu Ala Ala Val Ala Ile Lys Ala Met Ala
 140 150

AAA TAA
 Lys End