TAL-EFFEKTORNUKLEASE ZUM GEZIELTEN KNOCKOUT DES HIV-KOREZEPTORS CCR5

Die Erfindung betrifft eine neue TAL-Effektornuklease (TALEN) zum gezielten Knockout des HIV-Korezeptors CCR5.

Neben seiner eigentlichen Funktion in der Zelle spielt der Chemokinrezeptor CCR5 eine wichtige Rolle bei der HIV-Infektion. Hier tritt er für die so genannten CCR5-tropen Stämme des HI-Virus als Korezeptor in Erscheinung, welcher die initiale HIV-Infektion vermittelt. Ist kein CCR5 auf der Oberfläche einer T-Helferzelle vorhanden, können die HI-Viren nicht mit der Wirtszelle verschmelzen, so dass es nicht zu einer Infektion kommt. So schützt eine homozygote Deletion (CCR5Δ32) im CCR5-Gen, die bei ca. 1% der Westeuropäer und der „weißen" Amerikaner („Kaukasier") vorkommt, nahezu vollständig vor einer HIV-Infektion mit CCR-tropen Stämmen. Folglich ist CCR5 ein sehr interessantes Ziel für die HIV-Therapie.

Bisherige pharmakologische Ansätze, die auf eine Blockade des CCR5 abzielen, erfordern eine lebenslange Behandlung im Rahmen der kombinierten antiretroviralen Therapie ART. Dies ist langfristig mit potentiell schweren Nebenwirkungen, aber auch mit mangelnder Compliance der Patienten und Resistenzentwicklungen verbunden. Eine genetische Zerstörung („Knockout") des CCR5 (im Sinne einer Gentherapie) wäre dagegen im Idealfall als Einmalbehandlung ausreichend, da der genetischeSchutz an alle Tochterzellen weitergegeben wird. Dies wird nicht nur die durch die natürliche Resistenz CCR5Δ32-homozygoter lndividuen belegt, sondern auch durch den Fallbericht der erfolgreichen Therapie einer HIV-Infektion bei dem so genannten „Berlin-Patienten" nach allogener Stammzelltransplantation mit CCR5Δ32-homozygoten Spenderzellen (Hütter G et al. Long-term control of HIV by CCRDelta32/Delta32 stem-cell transplantation. N Engl J Med. 2009, 360: 692-698; Allers K et al. Evidence for the cure of HIV infection by CCR5Δ32/Δ32 stem cell transplantation. Blood 2011; 117: 2791-2799).

Basierend auf diesen Beobachtungen wurden Konzepte zum genetischen Knockout des CCR5 bei HIV-Patienten entwickelt. Die derzeit erfolgversprechendsten Strategien basieren auf so genannten „Designernukleasen" (s. z.B. Manjunath N. et al., Newer Gene Editing Technologies toward HIV Gene Therapy, Viruses 2013, 5, 2748-2766). Diese Designernukleasen bestehen

aus zwei Komponenten: einer Erkennungsdomäne, welche die Spezifität im Genom bestimmt und fast völlig frei designt werden kann, und einer Nukleasedomäne, welche an der gewählten Stelle im Genom einen Doppelstrangbruch induziert. Durch die fehlerhafte Reparatur dieses Doppelstrangbruches kommt es zu Verschiebungen des offenen Leserahmens des Zielgens und somit im Idealfall zu einem Knockout. Die ersten breit anwendbaren Designernukleasen waren die Zinkfingernukleasen (ZFN). Die Sangamo BioSciences, Inc., testet beispielsweise derzeit unter der Bezeichnung SB-728 eine von ihr entwickelte CCR5-spezifische Zinkfingernuklease (http://www.sangamo.com/pipeline/sb-728.html) für die klinische Anwendung (Tebas et al., Gene Editing of CCR5 in Autologous CD4 T Cells of Persons Infected with HIV. N Engl J Med 2014;370:901-10). Die klinische Studie zeigte die Machbarkeit des Ansatzes, jedoch konnte ein längerfristiger klinischer Nutzen auf die Viruslast nur bei einem Probanden beobachtet werden, der sich als heterozygot für die natürliche CCR5Δ32-Mutation erwies.

Bei den TAL-Effektornukleasen (transcription activator-like effector nucleases, TALEN) handelt es sich um die nächste Generation von Designernukleasen (s. z.B. Mussolino, C, Cathomen T. TALE nucleases: tailored genome engineering made easy, Curr Opin Biotechnol. 2012, 23(5): 644-50; WO 2011/072246 A2; EP 2510096 A2; WO 2011/154393 A1; WO 2011/159369 A1; WO 2012/093833 A2; WO 2013/182910 A2). Gegenüber ZFN zeichnen sie sich u.a. durch eine höhere Spezifität aus, so dass sich das Risiko von Off-target-Effekten, also dem Setzen von Mutationen an einer anderen als der gewünschten Stelle im Genom, deutlich verringert (Händel E-M, Cathomen T. Zinc-finger nuclease based genome surgery: it's all about specificity. Curr Gene Ther 2011, 11: 28-37; Mussolino C et al. A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity. Nucleic Acids Res. 2011; 39: 9283-9293).

CCR5-spezifische TALEN sind bereits bekannt (s. z.B. Mussolino C et al. A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity. Nucleic Acids Res. 2011; 39: 9283-9293; WO 2011/146121 A1; WO 2012/093833 A2; US 2013/0217131 A1), eine klinische Nutzung ist jedoch bisher nicht beschrieben.

Es besteht nach wie vor ein Bedarf an Mitteln zur effizienten Behandlung einer HIV-Infektion. Aufgabe der Erfindung ist es daher, ein solches Mittel bereit zu stellen. Insbesondere ist es die

Aufgabe der vorliegenen Erfindung, ein Mittel bereit zu stellen, mit dessen Hilfe ein effizienterer Knockout des HIV-Korezeptors CCR5 als bisher erreicht werden kann.

Gelöst wird die Aufgabe durch die Gegenstände des Anspruchs 1 und der weiteren nebengeordneten Ansprüche. Zweckmäßige Ausgestaltungen der erfindungsgemäßen Lösung sind in den Unteransprüchen angegeben.

In einem ersten Aspekt stellt die Erfindung ein TAL-Effektornuklease-Paar bereit, umfassend ein erstes und ein zweites TAL-Effektornuklease-Monomer, wobei jedes TAL-Effektornuklease-Monomer eine Endonukleasedomäne mit Typ-II-Endonukleaseaktivität und eine TAL-Effektor-DNA-Bindungsdomäne mit einer Mehrzahl von Wiederholungseinheiten, die jeweils ein variables Aminosäurepaar RVD aufweisen, umfasst, und wobei
a) die TAL-Effektor-DNA-Bindungsdomäne des ersten TAL-Effektornuklease-Monomers an die Zielsequenz GCTGGTCATCCTCATCCTG (SEQ ID NO: 1) bindet und/oder die RVD-Sequenz NH HD NG NH NH NG HD NI NG HD HD NG HD NI NG HD HD NG NN umfasst, und
b) die TAL-Effektor-DNA-Bindungsdomäne des zweiten TAL-Effektornuklease-Monomers an die Zielsequenz AGATGTCAGTCATGCTCTT (SEQ ID NO: 2) bindet und/oder die RVD-Sequenz NI NN NI NG NN NG HD NI NH NG HD NI NG NH HD NG HD NG NG umfasst.

Das erfindungsgemäße TAL-Effektornuklease-Paar ist in der Lage, mit bislang unerreicht hoher Effizienz von >50% einen Knockout des CCR5 in primären T-Lymphozyten zu bewirken. Dabei ermöglicht die Erfindung überraschend auch einen konsistenten biallelen Knockout beider CCR5-Allele und somit einen kompletten Schutz der modifizierten Zellen vor dem HIV-Eintritt, entgegen einer im Stand der Technik von führenden Experten geäußerten Ansicht, wonach dies derzeit nicht möglich sei („Consistent nuclease-mediated biallelic knockdown is not yet tenable“, s. Kay, M.A. und Walker, B.D., 2014, Engineering Cellular Resistance to HIV, N Engl J Med 370:968-969). Darüber hinaus hat sich herausgestellt, dass das erfindungsgemäße TALEN-Paar sich ausgezeichnet für einen auf mRNA-Transfektion basierenden (und damit besonders schonenden, sicheren und GMP-kompatiblen) Gentransfer eignet. Damit stellt die Erfindung erstmals ein auf einer Designernuklease basierendes Mittel für die HIV-Behandlung bereit, das eine hohe Knockout-Effizienz und –Selektivität mit

geringen Off-Target-Effekten und sonstigen aus pharmakologischer Sicht vorteilhaften Eigenschaften verbindet.

Unter einer „TAL-Effektornuklease“ oder „TALEN“ (Transcription activator-like effector nuclease) wird hier ein Fusionsprotein verstanden, welches die DNA-Bindungsdomäne eines TAL-Effektors (TALE) und eine DNA-Spaltungsdomäne einer Restriktionsendonuklease enthält. Bei den TAL-Effektoren handelt es sich um DNA-bindende Proteine, die von Pflanzenpathogenen wie *Xanthomonas* spp. gebildet werden. Die DNA-Bindung der TAL-Effektoren wird über eine Domäne mit einer variierenden Anzahl (in der Regel 5 bis 30) von Wiederholungseinheiten („repeats“) aus meist 33 bis 35 Aminosäuren vermittelt. Jede Wiederholungseinheit verfügt dabei über zwei hochvariable Aminosäurereste (repeat-variable diresidue, RVD), in der Regel an den Positionen 12 und 13, die an genau eine Base einer DNA-Zielsequenz bindet. Die Beziehung zwischen RVD und DNA-Zielnukleotid ist im Folgenden wiedergegeben.

RVD (Einbuchstabencode)	RVD (Dreibuchstabencode)	Nukleotid(e)
NH	Asn-His	G
HD	His-Asp	C
NG	Asn-Gly	T
NI	Asn-Ile	A
NN	Asn-Asn	R (G, A)
NK	Asn-Lys	G
NS	Asn-Ser	N (A, C, G, T)

Unter einer „RVD-Sequenz“ wird hier eine zusammenhängende Abfolge von RVDs in einer TAL-Effektor-Bindungsdomäne verstanden, wobei die Sequenz, sofern nichts anderes angegeben ist, hier in N-C-Richtung, d.h. vom N-terminus zum C-Terminus, angegeben ist. Dem Fachmann ist hier selbstverständlich bewusst, dass die RVDs einer „RVD-Sequenz“ nicht unmittelbar in dem Sinne aufeinanderfolgen, dass sie selbst direkt kovalent miteinander verbunden sind, sondern dass die Wiederholungseinheiten („repeats“) direkt miteinander verbunden sind, in denen die RVDs enthalten sind, so dass die RVDs jeweils durch Aminosäuren der Grundstruktur der Wiederholungseinheiten getrennt sind.

Unter einer „Zielsequenz“ oder „Target-Sequenz“ wird hier eine Nukleotidsequenz, in der Regel eine DNA-Sequenz, verstanden, die von der TAL-Effektor-Bindungsdomäne gebunden wird.

Die hier offenbarten aus jeweils 19 RVDs bestehenden RVD-Sequenzen haben die folgenden Zielsequenzen (in 5’-3’-Richtung; Einbuchstabencode für die Aminosäuren):

NH HD NG NH NH NG HD NI NG HD HD NG HD NI NG HD HD NG NN
GCTGGTCATCCTCATCCTG (SEQ ID NO: 1)

NI NN NI NG NN NG HD NI NH NG HD NI NG NH HD NG HD NG NG
AGATGTCAGTCATGCTCTT (SEQ ID NO: 2)

Unter einer „Wiederholungseinheit“ („repeat“) in Bezug auf eine TAL-Effektor-Bindungsdomäne wird hier eine zusammenhängende Abfolge von in der Regel 33-35, meist 34 Aminosäuren verstanden, die bis auf die hochvariablen RVDs an den Positionen 12 und 13 eine weitgehend identische Aminosäuresequenz aufweisen. Es ist möglich, dass auch innerhalb der konservierten Grundstruktur der Wiederholungseinheit, d.h. der im Wesentlichen gleichbleibenden Struktur, in die hochvariablen RVDs eingebettet sind, einzelne Aminosäuren variieren, beispielsweise an den Positionen 4, 10 und/oder 32 in einer Wiederholungseinheit aus 34 Aminosäuren. Eine typische Wiederholungseinheit kann beispielsweise die folgende Aminosäuresequenz haben (tiefgestellte Ziffern geben die Position innerhalb der Wiederholungseinheit an):

$LTPX_4QVVAIX_{10}SX_{12}X_{13}GGKQALETVQRLLPVLCQX_{32}HG$ (SEQ ID NO: 5)

X steht für eine beliebige Aminosäure, wobei an den Positionen 12 und 13 die hypervariablen Aminosäuren der RVDs stehen. An Position 4 (X_4) können beispielsweise die Aminosäuren E, Q, D oder A stehen, an Position 32 (X_{32}) die Aminosäuren A oder D. An Position 10 kann beispielsweise A oder V stehen. Beispiele für Wiederholungseinheiten sind im Folgenden

wiedergegeben (XX steht für die hypervariablen Aminosäuren der RVDs, variable Aminosäuren sind durch Unterstreichung kenntlich gemacht):

LTPEQVVAIASXXGGKQALETVQRLLPVLCQAHG (SEQ ID NO: 6)
LTPQQVVAIASXXGGKQALETVQRLLPVLCQAHG (SEQ ID NO: 7)
LTPDQVVAIASXXGGKQALETVQRLLPVLCQDHG (SEQ ID NO: 8)
LTPAQVVAIASXXGGKQALETVQRLLPVLCQDHG (SEQ ID NO: 9)
LTPEQVVAIVSXXGGKQALETVQRLLPVLCQAHG (SEQ ID NO: 10)

Die TAL-Effektor-Bindungsdomäne kann eine oder mehrere derartige Varianten von Wiederholungseinheiten beinhalten, wobei auch eine Mischung verschiedener Varianten in Frage kommt.

Die äußere, der Nukleasedomäne nächstgelegene Wiederholungseinheit kann weniger, beispielsweise nur die ersten 15, 16, 17, 18, 19 oder 20 Aminosäuren der übrigen Wiederholungseinheiten umfassen. Eine solche Wiederholungseinheit wird auch als „halbe Wiederholungseinheit“ oder „half repeat“ bezeichnet.

Unter einer „DNA-Bindungsdomäne“ wird hier der Bereich eines Proteins verstanden, der die Bindung des Proteins an eine DNA herbeiführt. Im Falle der DNA-Bindungsdomäne eines TAL-Effektors geschieht dies mittels der oben näher beschriebenen Wiederholungseinheiten („repeats“).

Die Formulierung, wonach eine TAL-Effektor-DNA-Bindungsdomäne an eine Zielsequenz bindet, ist so zu verstehen, dass die TAL-Effektor-DNA-Bindungsdomäne auf Grund ihrer RVD-Sequenz spezifisch an die Zielsequenz bindet. Dabei ist es nicht erforderlich, wenn auch bevorzugt, dass jedem Nukleotid der Zielsequenz ein RVD in der Bindungsdomäne zugeordnet ist. Die Relation zwischen RVD-Sequenz der TAL-Effektor-DNA-Bindungsdomäne und Zielsequenz muss lediglich eine solche sein, dass eine spezifische Bindung an die Zielsequenz erfolgt. „Spezifisch“ bedeutet in diesem Zusammenhang, dass die Bindung im Wesentlichen ausschließlich an die Zielsequenz erfolgt.

Unter einem „TAL-Effektornuklease-Monomer“ wird eine TAL-Effektornuklease verstanden, die aus einer einzigen Polypeptidkette besteht. Unter einem „TAL-Effektornuklease-Paar“ oder „TALEN-Paar“ wird eine aus zwei TAL-Effektornuklease-Monomeren zusammengesetzte TALEN verstanden. Die Monomere repräsentieren einen linken oder rechten Arm einer TALEN, die an gegenüberliegende Stränge einer DNA binden und zusammen die Spaltung der DNA an einer Stelle bewirken.

Wenn hier unter Bezug auf ein TALEN-Paar von einer „linken“ oder „rechten“ TALEN oder einem „linken“ und „rechten“ TALEN-„Arm“ gesprochen wird, reflektiert dies die Tatsache, dass in einem TALEN-Paar TALEN-Monomere paarweise eingesetzt werden, d.h. einen Strangbruch innerhalb einer doppelsträngigen DNA herbeiführen, indem ein Monomer eine Zielsequenz auf dem Sinnstrang bindet, während ein anderes TALEN-Monomer des TALEN-Paares eine Zielsequenz auf dem dazu komplementären Antisinn-Strang bindet, und zwar so dass die Nukleasedomänen zueinander gerichtet sind, in einem als „Spacer“ bezeichneten gemeinsamen DNA-Bereich zwischen den Zielsequenzen zu liegen kommen und dort jeweils einen Einzelstrangbruch bewirken. „Linke“ und „rechte“ TALEN-Monomere sind somit die Teile eines solchen TALEN-Paares, wobei als „linke“ TALEN häufig jene TALEN bezeichnet wird, die an den Sinnstrang bindet, während die „rechte“ TALEN den komplementären Strang bindet. Wenn hier von einer „linken“ oder „rechten“ TALEN gesprochen wird, soll damit jedoch keine Festlegung verbunden sein, dass die „linke“ TALEN den Sinnstrang und die „rechte“ TALEN den dazu komplementären Strang bindet.

Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch ein „TALEN-Paar“, d.h. ein Paar aus zwei erfindungsgemäßen Monomeren, die jeweils einen linken oder rechten Arm einer TALEN repräsentieren. Somit betrifft die vorliegende Erfindung auch ein TAL-Effektornuklease-Paar, umfassend ein TAL-Effektornuklease-Monomer, dessen TAL-Effektor-DNA-Bindungsdomäne an die Zielsequenz GCTGGTCATCCTCATCCTG (SEQ ID NO: 1) bindet und/oder die RVD-Sequenz NH HD NG NH NH NG HD NI NG HD HD NG HD NI NG HD HD NG NN umfasst, und ein TAL-Effektornuklease-Monomer, dessen TAL-Effektor-DNA-Bindungsdomäne an die Zielsequenz AGATGTCAGTCATGCTCTT (SEQ ID NO: 2) bindet und/oder die RVD-Sequenz NI NN NI NG NN NG HD NI NH NG HD NI NG NH HD NG HD NG NG umfasst.

Unter einer „Endonukleasedomäne mit Typ-II-Endonukleaseaktivität“ wird ein Polypeptid verstanden, das die DNA-Spaltungsaktivität einer Restriktionsendonuklease aufweist und die DNA innerhalb oder in unmittelbarer Nähe der Erkennungssequenz schneidet, kein ATP benötigt und keine Methyltransferase-Aktivität besitzt. Unter einer „Endonukleasedomäne mit Typ-IIS-Endonukleaseaktivität“ wird eine Domäne einer Typ-II-Endonuklease verstanden, deren Schnittstelle in unmittelbarer Nähe der Erkennungssequenz, jedoch nicht innerhalb derselben liegt.

Unter „CCR5“ wird hier der menschliche CC-Motiv-Chemokin-Rezeptor 5 (auch als CD195, CMKBR5 oder CC-CKR5 bezeichnet) verstanden. Eine Sequenz des humanen CCR5 ist in SEQ ID NO: 11 wiedergegeben (s. NCBI-Zugriffsnummer NC_018914.2).

Unter einem „Vektor“ wird hier ein Transportvehikel zur Übertragung einer meist fremden Nukleinsäure in eine lebende Empfängerzelle durch Transfektion oder Transduktion verstanden Unter einem „Gentransfer-Vektor“ wird hier ein Vektor verstanden, mit dessen Hilfe ein Gen in eine Zelle eingebracht werden kann. (Gentransfer-)Vektoren sind dem Fachmann gut bekannt. Beispiele für Gentransfer-Vektoren sind Plasmide, virale Vektoren oder mRNA.

Unter einer „Nukleinsäure“ wird ein Polymer verstanden, dessen Monomere Nukleotide sind. Ein Nukleotid ist eine Verbindung aus einem Zuckerrest, einer stickstoffhaltigen heterozyklischen organischen Base (Nukleotid- oder Nukleobase) und einer Phosphatgruppe. Der Zuckerrest ist in der Regel eine Pentose, im Falle von DNA Desoxyribose, im Falle von RNA Ribose. Die Verknüpfung der Nukleotide erfolgt über die Phosphatgruppe mittels einer Phosphodiesterbrücke in der Regel zwischen dem 3'-C-Atom der Zuckerkomponente eines Nukleosids (Verbindung aus Nukleobase und Zucker) und dem 5'-C-Atom der Zuckerkomponente des nächsten Nukleosids. Der Begriff „Nukleinsäure“ umfasst beispielsweise DNA, RNA und DNA/RNA-Mischsequenzen. So wie er hier verwendet wird, betrifft der Begriff „Nukleinsäure“ insbesondere eine isolierte Nukleinsäure. Unter einer „isolierten Nukleinsäure“ wird eine aus ihrer natürlichen bzw. ursprünglichen Umgebung herausgelöste oder synthetisch hergestellte Nukleinsäure verstanden.

Der Begriff „umfassend“ wird hier so verwendet, dass er sowohl einen Gegenstand definiert, der ausschließlich die unter den Begriff gefassten Merkmale aufweist, als auch einen Gegenstand, der über die unter den Begriff gefassten Merkmale hinaus auch noch weitere Merkmale aufweist. Die Definition eines Gegenstandes dadurch, dass er bestimmte Merkmale umfasst, schließt daher auch die Definition dieses Gegenstandes durch die abschließende Auflistung dieser Merkmale, d.h. durch das Vorhandensein ausschließlich dieser Merkmale ein.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen TAL-Effektornuklease-Paars liegt bei jedem der TAL-Effektornuklease-Monomere die Endonukleasedomäne in Bezug auf die TAL-Effektor-DNA-Bindungsdomäne C-terminal. Bevorzugt umfasst jede Wiederholungseinheit, mit Ausnahme der der Endonukleasedomäne am nächsten liegenden Wiederholungseinheit, 33 bis 35 Aminosäuren, vorzugsweise 34 Aminosäuren, wobei die RVDs sich in jeder Wiederholungseinheit an den Positionen 12 und 13 befinden. Besonders bevorzugt haben sämtliche Wiederholungseinheiten, außer dem „half repeat“ die Aminosäuresequenz gemäß SEW ID NO: 5, wobei an Position 4 E, Q, D oder A, an Position 10 A oder V und an Position 32 A oder D stehen kann. Die Grundstruktur der Wiederholungseinheiten kann für alle Wiederholungseinheiten gleich oder verschieden sein. Es können ein oder mehrere Wiederholungseinheiten an Positionen innerhalb der Grundstruktur, beispielsweise an den Positionen 4, 10 und/oder 32, hinsichtlich der Aminosäure variieren. Die der Endonukleasedomäne am nächsten liegende Wiederholungseinheit kann eine geringere Anzahl von Aminosäuren, beispielsweise 15, 16, 17, 18, 19 oder 20 Aminosäuren, umfassen, wobei die Aminosäuren in diesem Fall vorzugsweise den ersten 15, 16, 17, 18, 19 oder 20 Aminosäuren der übrigen Wiederholungseinheiten entsprechen. Dabei kann beispielsweise die Aminosäure an Position 4 abweichen, beispielsweise E, Q, D und A sein, und/oder die Aminosäure an Position 10 abweichen, beispielsweise V statt A sein.

Besonders bevorzugt ist die Endonukleasedomäne der TAL-Effektornuklease-Monomere eine Typ-IIS-Endonuklease-Domäne, besonders bevorzugt die DNA-Spaltungsdomäne der FokI-Endonuklease. Eine Aminosäuresequenz für eine geeignete FokI-Spaltungsdomäne ist in SEQ ID NO: 12 angegeben. Es kommen aber auch andere Typ-II-Endonuklease-Spaltungsdomänen in Frage. Typ-II-Endonukleasen sind dem Fachmann bekannt, und geeignete Spaltungsdomänen können mittels Routineuntersuchungen ermittelt werden.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform weist das erste TAL-Effektornuklease-Monomer eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 3 und das zweite TAL-Effektornuklease-Monomer eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 4 auf. In der SEQ ID NO: 3 ist dabei die linke TALEN (im Folgenden auch als CCR5-Uco-L oder linker Arm der CCR5-Uco bezeichnet) und in SEQ ID NO: 4 die rechte TALEN (im Folgenden auch als CCR5-Uco-R oder rechter Arm der CCR5-Uco bezeichnet) eines TALEN-Paares angegeben, die gemeinsam einen Doppelstrangbruch in der DNA-Sequenz des CCR5 innerhalb des zwischen den Zielsequenzen gemäß SEQ ID NO: 1 und SEQ ID NO: 2 liegenden Spacers bewirken. Die Reparatur dieses Doppelstrangbruch durch zelluläre Reparatursysteme (non-homologes end-joining, NEHJ) führt mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einer Leserahmenverschiebung und damit einem Knockout des CCR5.

In einem zweiten Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung auch eine Nukleinsäure, umfassend
a) eine erste Nukleinsäure, die für ein erstes TAL-Effektornuklease-Monomer kodiert, wobei das erste TAL-Effektornuklease-Monomer eine Endonukleasedomäne mit Typ-II-Endonukleaseaktivität und eine TAL-Effektor-DNA-Bindungsdomäne mit einer Mehrzahl von Wiederholungseinheiten umfasst, die jeweils ein variables Aminosäurepaar RVD aufweisen, und wobei die TAL-Effektor-DNA-Bindungsdomäne an die Zielsequenz GCTGGTCATCCTCATCCTG (SEQ ID NO: 1) bindet und/oder die RVD-Sequenz NH HD NG NH NH NG HD NI NG HD HD NG HD NI NG HD HD NG NN umfasst, und
b) eine zweite Nukleinsäure, die für ein zweites TAL-Effektornuklease-Monomer kodiert, wobei das zweite TAL-Effektornuklease-Monomer eine Endonukleasedomäne mit Typ-II-Endonukleaseaktivität und eine TAL-Effektor-DNA-Bindungsdomäne mit einer Mehrzahl von Wiederholungseinheiten umfasst, die jeweils ein variables Aminosäurepaar RVD aufweisen, und wobei die TAL-Effektor-DNA-Bindungsdomäne an die Zielsequenz AGATGTCAGTCATGCTCTT (SEQ ID NO: 2) bindet und/oder die RVD-Sequenz NI NN NI NG NN NG HD NI NH NG HD NI NG NH HD NG HD NG NG umfasst.

Die das erfindungsgemäße TALEN-Paar bildenden TALEN-Monomere sind bei diesem Aspekt der Erfindung zusammen in einer gemeinsamen Nukleinsäure kodiert. Es kann sich bei der Nukleinsäure beispielsweise um ein Plasmid oder einen anderen geeigneten (Gentransfer-

)Vektor handeln. Geeignete Vektoren sowie Verfahren zu deren Herstellung und deren Verwendung sind im Stand der Technik gut gekannt. Gegebenenfalls kann die Nukleinsäure neben dem TALEN-Kode noch weitere Elemente enthalten, beispielsweise einen oder mehrerer Promotoren, sowie Polyadenylierungssignale etc.

Die das erfindungsgemäße TALEN-Paar bildenden TALEN-Monomere können auch getrennt in zwei Nukleinsäuren kodiert sein. In einem dritten Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung daher auch eine Nukleinsäurezusammensetzung, umfassend
a) eine erste Nukleinsäure, die für ein erstes TAL-Effektornuklease-Monomer kodiert, wobei das erste TAL-Effektornuklease-Monomer eine Endonukleasedomäne mit Typ-II-Endonukleaseaktivität und eine TAL-Effektor-DNA-Bindungsdomäne mit einer Mehrzahl von Wiederholungseinheiten umfasst, die jeweils ein variables Aminosäurepaar RVD aufweisen, und wobei die TAL-Effektor-DNA-Bindungsdomäne an die Zielsequenz GCTGGTCATCCTCATCCTG (SEQ ID NO: 1) bindet und/oder die RVD-Sequenz NH HD NG NH NH NG HD NI NG HD HD NG HD NI NG HD HD NG NN umfasst, und
b) eine zweite Nukleinsäure, die für ein zweites TAL-Effektornuklease-Monomer kodiert, wobei das zweite TAL-Effektornuklease-Monomer eine Endonukleasedomäne mit Typ-II-Endonukleaseaktivität und eine TAL-Effektor-DNA-Bindungsdomäne mit einer Mehrzahl von Wiederholungseinheiten umfasst, die jeweils ein variables Aminosäurepaar RVD aufweisen, und wobei die TAL-Effektor-DNA-Bindungsdomäne an die Zielsequenz AGATGTCAGTCATGCTCTT (SEQ ID NO: 2) bindet und/oder die RVD-Sequenz NI NN NI NG NN NG HD NI NH NG HD NI NG NH HD NG HD NG NG umfasst.

Bevorzugt handelt es sich bei der ersten und zweiten Nukleinsäure jeweils um eine mRNA, besonders bevorzugt eine stabilisierte mRNA (s. z.B. Kallen K.-J. et al., A novel, disruptive vaccination technology, Hum Vaccin Immunother. Oct 1, 2013; 9(10): 2263–2276, doi: 10.4161/hv.25181; Kallen K.-J. und Theß A., A development that may evolve into a revolution in medicine: mRNA as the basis for novel, nucleotide-based vaccines and drugs, Ther Adv Vaccines. Jan 2014; 2(1): 10–31, doi: 10.1177/2051013613508729). Gegebenenfalls können die erste und zweite Nukleinsäure neben dem TALEN-Kode noch weitere Elemente enthalten, beispielsweise einen oder mehrerer Promotoren, sowie Polyadenylierungssignale etc. Geeignete

mRNAs für den linken und rechten Arm einer erfindungsgemäßen TALEN sind beispielhaft in den SEQ ID NO: 17 und 18 angegeben.

Im Falle einer mRNA erfolgt deren Transport in die Zielzelle(n), z.B. T-Lymphozyten, besonders bevorzugt mittels des von Berdien et al. (Berdien B et al., TALEN-mediated editing of endogenous T-cell receptors facilitates efficient reprogramming of T lymphocytes by lentiviral gene transfer, Gene Therapy, 2014, doi:10.1038/gt.2014.26) beschriebenen Verfahrens. Besonders bevorzugt werden beide TALEN-Arme (rechter und linker Arm) gleichzeitig in eine Zelle gebracht.

Die Einbringung des erfindungsgemäßen TALEN-Paares über mRNA hat für die klinische Anwendung eine Reihe entscheidender Vorteile. Der Einsatz eines DNA-basierten Gentransfervektors kann vermieden werden, was die Herstellung und praktische Anwendung entschieden vereinfacht. Die mRNA-vermittelte Expression der TALEN erfolgt nur vergleichsweise kurz, da die mRNA in der Zielzelle rasch abgebaut wird. Dadurch wird das Risiko von Off-target-Effekten weiter verringert. Darüber hinaus müssen die Zielzellen nur für sehr kurze Zeit in vitro kultiviert werden. Die entsprechende Technologie ist leicht an GMP-Erfordernisse anzupassen. Es sind, im Gegensatz zu viralen oder Plasmidvektoren, keine Nebenwirkungen durch den Gentransfer selbst (z.B. Insertionsmutagenese) oder durch eine langandauernde TALEN-Expression (Off-target-Effekte, Aktivierung einer TALEN-spezifischen Immunantwort) infolge unerwünschter Vektorinsertion zu erwarten.

In weiteren Aspekten betrifft die vorliegende Erfindung auch einen Vektor, insbesondere Gentransfer-Vektor, umfassend eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, und eine isolierte Wirtszelle, umfassend einen erfindungsgemäßen Vektor, eine erfindungsgemäße Nukleinsäure oder Nukleinsäurezusammensetzung, wobei es sich bei der isolierten Wirtszelle um keine Keimbahnzelle eines menschlichen Lebewesens, insbesondere keine menschliche Keimzelle oder menschliche embryonale Keimzelle handelt, und wobei es sich um keine menschliche embryonale Stammzelle handelt, bei deren Gewinnung ein menschlicher Embryo zerstört worden ist oder wird.

In noch einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung eine pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend eine Nukleinsäure, Nukleinsäurezusammensetzung oder einen Vektor gemäß der vorliegenden Erfindung. Die pharmazeutische Zusammensetzung kann Adjuvantien umfassen, beispielsweise Lösungsmittel, Lösungsvermittler, Lösungsbeschleuniger, Salzbildner, Salze, Puffersubstanzen, Viskositäts- und Konsistenzbeeinflusser, Gelbildner, Emulgatoren, Solubilisatoren, Benetzer, Spreizmittel, Antioxidantien, Konservierungsmittel, Füll- und Trägerstoffe, etc.

In noch einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein Arzneimittel, umfassend eine Nukleinsäure, Nukleinsäurezusammensetzung, einen Vektor oder eine pharmazeutische Zusammensetzung gemäß der vorliegenden Erfindung.

Die Erfindung wird im Folgenden anhand von Ausführungsbeispielen und der angehängten Figuren zu Veranschaulichungszwecken näher erläutert.

Fig. 1 Schematische Darstellung der DNA-Bindungsdomänen eines erfindungsgemäßen CCR5-spezifischen TALEN-Paares („CCR5-Uco“) und ihrer Zielsequenzen im CCR5-Gen. Die jeweils untere Zeile zeigt die Zielsequenzen für a) den linken und b) den rechten TALEN-Arm, die jeweils obere Zeile die relevanten RVDs (repeat variable di-residues) der entsprechenden TALE-Monomere in den Kästchen (Aminosäuren sind im Ein-Buchstaben-Code angegeben); c) Abschnitt (nt 135–221 der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 11) der CCR5-DNA mit komplementärem Strang. Die Zielsequenzen des linken (oben) und rechten (unten, auf komplementärem Strang) Armes der CCR5-Uco-TALEN sind durch Umrahmung hervorgehoben.

Fig. 2 Effizienzvergleich zwischen erfindungsgemäßer CCR5-TALEN („Uco“) und einer Kontroll-CCR5-TALEN („Mco“) aus dem Stand der Technik. Die Testung erfolgte durch Plasmidtransfektion in eine CCR5-positive, 293T-Zell-basierte Reporterzelllinie. Für alle getesteten Konstrukte wurden vergleichbare Transfektionseffizienzen beobachtet (anhand der Kotransfektion von eGFP). Der CCR5-Knockout wurde 6 Tage nach der Transfektion des CCR5+ 293T-Zellklons mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers (anti-CD195-APC-Cy-7

antibody) bestimmt (n=2). Für die „Mock"-Kontrolle wurden die Zellen mit einem irrelevanten Kontrollplasmid (pUC), welches kein TALEN kodiert, transfiziert.

Fig. 3: CCR5-Knockout in primären T-Lymphozyten mit CCR5-Uco nach mRNA-Transfektion. Nach Ex-vivo-Aktivierung exprimieren ca. die Hälfte der primären T-Lymphozyten eines gesunden Probanden CCR5 (= Zellen rechts der gestrichelten Linie, Vgl. „untransfiziert"). a) Nach Transfektion der CCR5-spezifischen TALEN (Uco) nimmt der Anteil CCR5-positiver Zellen mit wachsender Menge transfizierter mRNA (umgekehrt proportional) ab. b) Die Kontrolltransfektion der einzelnen TALEN-Arme führt dagegen nicht zu einer Abnahme des Anteils CCR5-positiver Zellen. Der CCR5-Knockout wurde 6 Tage nach der mRNA-Transfektion mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers (anti-CD195-PerCP-Cy5.5 antibody) bestimmt. c) Eine Analyse der Zielstelle der CCR5-Uco-TALEN zeigt einen genetischen Knockout in 9 von 17 (>50%) analysierten primären T-Lymphozyten

Beispiele

Es wurde eine erfindungsgemäße CCR5-spezifische TALEN (im Folgenden „CCR5-Uco") hergestellt und untersucht. Die erfindungsgemäße TALEN unterscheidet sich in der von ihr erkannten Zielsequenz im CCR5-Gen (s. Fig. 1) von den bisher beschriebenen TALEN.

Gegenüber einer kodonoptimierten CCR5-TALEN („Mco"; s. SEQ ID NO: 13, 14), die auf publizierten Arbeiten des Labors von Prof. Toni Cathomen (Freiburg) basiert (s. Mussolino C et al., A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity, Nucleic Acids Res. 2011, 39: 9283-9293), zeigt die erfindungsgemäße CCR5-Uco-TALEN eine deutlich höhere Rate der Induktion des CCR5-Knockouts nach Plasmidtransfektion in eine Reporterzelllinie (s. Fig. 2). Die Nukleinsäuresequenz der für den Einsatz in humanen Zellen kodonoptimierten TALEN-Bausteine basiert dabei auf den Veröffentlichungen der Gruppe um Feng Zhang (Zhang et al., Efficient construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammalian transcription, Nature Biotechnology, 2011, 29, 149-153; Sanjana NE et al., A TAL Effector Toolbox for Genome Engineering, Nature Protocols, 2012, 7: 171-192).

Die RVD-Sequenzen der CCR5-Mco-TALEN gemäß dem Stand der Technik sind wie folgt:

Linker Arm (L) = NN NG NN NN NN HD NI NI HD NI NG NN HD NG NN NN NG HD;

Rechter Arm (R) = HD NG NG HD NI NN HD HD NG NG NG NG NN HD NI NN NG NG.

Die dazugehörige Erkennungssequenz auf DNA-Ebene:

L auf Sinnstrang = GTGGGCAACATGCTGGTC (SEQ ID NO: 15);

R auf Antisinnstrang = CTTCAGCCTTTTGCAGTT (SEQ ID NO: 16).

Die Länge des Spacers beträgt 15 nt. Auch hier basiert die Herstellung der TALEN-Plasmide auf den Veröffentlichungen von Zhang F, bzw. Sanjana NE et al. (siehe oben).

Mittels mRNA-Transfektion (s. Berdien B et al., TALEN-mediated editing of endogenous T-cell receptors facilitates efficient reprogramming of T lymphocytes by lentiviral gene transfer, Gene Therapy, 2014, doi:10.1038/gt.2014.26) mit der erfindungsgemäßen CCR5-Uco wurde in primären T-Lymphozyten ein CCR5-Knockout bewirkt (s. Fig. 3). Nukleinsäuresequenzen der hierfür verwendeten mRNA sind in den SEQ ID NO: 17 und 18 wiedergegeben. In SEQ ID NO: 17 ist die mRNA des linken TALEN-Arms, in SEQ ID NO: 18 die mRNA des rechten TALEN-Arms wiedergegeben. Die Nukleotide 10-3225 der mRNAs in SEQ ID NO: 17 und 18 kodieren jeweils die TALEN-Arme (Monomere), deren Aminosäuresequenzen in den SEQ ID NO: 3, 4 angegeben sind.

Die transfizierte mRNA wurde über den T7-Promoter nach AvrII-Linearisierung des Vektors hergestellt. Da die AvrII-Schnittstelle 563bp hinter dem Stopcodon liegt, ist die angegebene Sequenz länger als der offene Leserahmen. Nach Linearisierung wurde die jeweilige Uco-TALEN-DNA als Vorlage für die Herstellung der mRNA mittels T7 mScript™ Standard mRNA Production System von Cellscript (Madison, WI 53713 USA) verwendet. Nach Herstellerangaben wurde die mRNA mit einem 5`Cap- und einem Poly-A-Schwanz versehen. Die Transfektion der mRNA erfolgte über die Elektroporation der primären T-Zellen für 10 ms bei 300V. Mit der Mco-CCR5-TALEN gelang es dagegen nicht, einen CCR5-Knockout in primären T-Zellen bzw. Z-Zelllinien zu realisieren (während ein k.o. des T-Zellrezeptors möglich war, s. Berdien et al 2014, s. oben). Erst mit der erfindungsgemäßen CCR5-Uco-

TALEN gelang es, mittels mRNA-Transfer einen signifikanten Anteil von >50% der CCR5-Allele auszuschalten (Abb. 3c). Dies legt nahe, dass nur ausreichend aktive TALEN in der Lage sind, nach einer mRNA-Transfektion ihre Funktion in primären T-Zellen zu erfüllen. Somit ist die erfindungsgemäße CCR5-TALEN für einen Einsatz per mRNA-Transfektion besonders gut geeignet, was sie für eine klinische Anwendung äußerst attraktiv macht.

Sequenzübersicht:

SEQ ID NO:	Typ	Beschreibung
01	DNA	Zielsequenz TALEN CCR5-Uco L
02	DNA	Zielsequenz TALEN CCR5-Uco R
03	PRT	TALEN CCR5-Uco L
04	PRT	TALEN CCR5-Uco R
05	PRT	Wiederholungssequenz (Konsensus)
06	PRT	Wiederholungssequenz
07	PRT	Wiederholungssequenz
08	PRT	Wiederholungssequenz
09	PRT	Wiederholungssequenz
10	PRT	Wiederholungssequenz
11	DNA	hCCR5
12	PRT	FokI-Spaltungsdomäne
13	PRT	TALEN CCR5-Mco L
14	PRT	TALEN CCR5-Mco R
15	DNA	Zielsequenz TALEN CCR5-Mco L
16	DNA	Zielsequenz TALEN CCR5-Mco R
17	mRNA	mRNA CCR5-Uco L
18	mRNA	mRNA CCR5-Uco R

SEQUENZPROTOKOLL – FREIER TEXT

TALEN repeat = TALEN-Wiederholungseinheit

Any amino acid, or E, Q, D or A = Beliebige Aminosäure, oder E, Q, D oder A

Any amino acid, or A or V = Beliebige Aminosäure, oder A oder V

Any amino acid, or A or D = Beliebige Aminosäure, oder A oder D

Repeat variable diresidue (RVD) = „Repeat variable diresidue (RVD; variabler Zweichfachrest der Wiederholungseinheit)

FokI cleavage domain = FokI-Spaltungsdomäne

PATENTANSPRÜCHE

1. TAL-Effektornuklease-Paar, umfassend ein erstes und ein zweites TAL-Effektornuklease-Monomer, wobei jedes TAL-Effektornuklease-Monomer eine Endonukleasedomäne mit Typ-II-Endonukleaseaktivität und eine TAL-Effektor-DNA-Bindungsdomäne mit einer Mehrzahl von Wiederholungseinheiten, die jeweils ein variables Aminosäurepaar RVD aufweisen, umfasst, und wobei
   a) die TAL-Effektor-DNA-Bindungsdomäne des ersten TAL-Effektornuklease-Monomers an die Zielsequenz GCTGGTCATCCTCATCCTG (SEQ ID NO: 1) bindet und/oder die RVD-Sequenz NH HD NG NH NH NG HD NI NG HD HD NG HD NI NG HD HD NG NN umfasst,
   und
   b) die TAL-Effektor-DNA-Bindungsdomäne des zweiten TAL-Effektornuklease-Monomers an die Zielsequenz AGATGTCAGTCATGCTCTT (SEQ ID NO: 2) bindet und/oder die RVD-Sequenz NI NN NI NG NN NG HD NI NH NG HD NI NG NH HD NG HD NG NG umfasst.

2. TAL-Effektornuklease-Paar nach Anspruch 1, wobei bei jedem der TAL-Effektornuklease-Monomere die Endonukleasedomäne in Bezug auf die TAL-Effektor-DNA-Bindungsdomäne C-terminal liegt und jede Wiederholungseinheit mit Ausnahme der der Endonukleasedomäne am nächsten liegenden 33 bis 35 Aminosäuren, vorzugsweise 34 Aminosäuren, umfasst, wobei die RVDs sich in jeder Wiederholungseinheit an den Positionen 12 und 13 befinden.

3. TAL-Effektornuklease-Paar nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Endonukleasedomäne der TAL-Effektornuklease-Monomere eine DNA-Spaltungsdomäne der FokI-Endonuklease ist.

4. TAL-Effektornuklease-Paar nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das erste TAL-Effektornuklease-Monomer eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 3 und das zweite TAL-Effektornuklease-Monomer eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 4 aufweist.

5. Nukleinsäure, umfassend

a) eine erste Nukleinsäure, die für ein erstes TAL-Effektornuklease-Monomer kodiert, wobei das erste TAL-Effektornuklease-Monomer eine Endonukleasedomäne mit Typ-II-Endonukleaseaktivität und eine TAL-Effektor-DNA-Bindungsdomäne mit einer Mehrzahl von Wiederholungseinheiten umfasst, die jeweils ein variables Aminosäurepaar RVD aufweisen, und wobei die TAL-Effektor-DNA-Bindungsdomäne an die Zielsequenz GCTGGTCATCCTCATCCTG (SEQ ID NO: 1) bindet und/oder die RVD-Sequenz NH HD NG NH NH NG HD NI NG HD HD NG HD NI NG HD HD NG NN umfasst, und

b) eine zweite Nukleinsäure, die für ein zweites TAL-Effektornuklease-Monomer kodiert, wobei das zweite TAL-Effektornuklease-Monomer eine Endonukleasedomäne mit Typ-II-Endonukleaseaktivität und eine TAL-Effektor-DNA-Bindungsdomäne mit einer Mehrzahl von Wiederholungseinheiten umfasst, die jeweils ein variables Aminosäurepaar RVD aufweisen, und wobei die TAL-Effektor-DNA-Bindungsdomäne an die Zielsequenz AGATGTCAGTCATGCTCTT (SEQ ID NO: 2) bindet und/oder die RVD-Sequenz NI NN NI NG NN NG HD NI NH NG HD NI NG NH HD NG HD NG NG umfasst.

6. Vektor, umfassend eine Nukleinsäure nach Anspruch 5.

7. Nukleinsäurezusammensetzung, umfassend

a) eine erste Nukleinsäure, die für ein erstes TAL-Effektornuklease-Monomer kodiert, wobei das erste TAL-Effektornuklease-Monomer eine Endonukleasedomäne mit Typ-II-Endonukleaseaktivität und eine TAL-Effektor-DNA-Bindungsdomäne mit einer Mehrzahl von Wiederholungseinheiten umfasst, die jeweils ein variables Aminosäurepaar RVD aufweisen, und wobei die TAL-Effektor-DNA-Bindungsdomäne an die Zielsequenz GCTGGTCATCCTCATCCTG (SEQ ID NO: 1) bindet und/oder die RVD-Sequenz NH HD NG NH NH NG HD NI NG HD HD NG HD NI NG HD HD NG NN umfasst, und

b) eine zweite Nukleinsäure, die für ein zweites TAL-Effektornuklease-Monomer kodiert, wobei das zweite TAL-Effektornuklease-Monomer eine Endonukleasedomäne mit Typ-II-Endonukleaseaktivität und eine TAL-Effektor-DNA-Bindungsdomäne mit einer Mehrzahl von Wiederholungseinheiten umfasst, die jeweils ein variables Aminosäurepaar RVD aufweisen, und wobei die TAL-Effektor-DNA-Bindungsdomäne an die Zielsequenz AGATGTCAGTCATGCTCTT (SEQ ID NO: 2) bindet und/oder die RVD-Sequenz NI NN NI NG NN NG HD NI NH NG HD NI NG NH HD NG HD NG NG umfasst.

8. Nukleinsäurezusammensetzung nach Anspruch 7, wobei die erste Nukleinsäure eine erste mRNA und die zweite Nukleinsäure eine zweite mRNA ist.

9. Nukleinsäurezusammensetzung nach Anspruch 8, wobei die erste Nukleinsäure eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 17 und die zweite Nukleinsäure eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 18 umfasst.

10. Isolierte Wirtszelle, umfassend eine Nukleinsäure nach Anspruch 5, eine Nukleinsäurezusammensetzung nach einem der Ansprüche 7 bis 9 oder einen Vektor nach Anspruch 6, mit der Maßgabe, dass die Wirtszelle keine menschliche Keimzelle oder menschliche embryonale Keimzelle ist, und keine menschliche embryonale Stammzelle ist, bei deren Gewinnung ein menschlicher Embryo zerstört worden ist oder wird.

11. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend eine Nukleinsäure nach Anspruch 5, eine Nukleinsäurezusammensetzung nach einem der Ansprüche 7 bis 9, oder einen Vektor nach Anspruch 6.

12. Arzneimittel, umfassend eine Nukleinsäure nach Anspruch 5, eine Nukleinsäurezusammensetzung nach einem der Ansprüche 7 bis 9, einen Vektor nach Anspruch 6 oder eine pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 11.