



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och
husdjursvetenskap

Institutionen för biomedicin och veterinär
folkhälsovetenskap

Generella principer för virala vektorsystem och deras tillämpning inom veterinärmedicin

Josefin Brock von Rein

*Uppsala
2018*

*Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen
Delnummer i serien: 2018:88*

Generella principer för virala vektorsystem och deras tillämpning inom veterinärmedicin

General principles of viral vector systems and their application in veterinary medicine

Josefin Brock von Rein

Handledare: Mikael Berg, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Examinator: Maria Löfgren, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Omfattning: 15 hp

Nivå och fördjupning: Grundnivå, G2E

Kurstitel: Självständigt arbete i veterinärmedicin

Kurskod: EX0700

Program/utbildning: Veterinärprogrammet

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2018

Serienamn: Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen

Delnummer i serien: 2018:88

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: Viral vektor, genterapi, cancer, vaccin, veterinärmedicin

Key words: Viral vector, gene therapy, cancer, vaccine, veterinary medicine

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	1
Summary	2
Inledning	3
Material och metoder	3
Litteraturoversikt.....	4
Genterapi	4
<i>Definition</i>	4
<i>Användningsområden</i>	4
<i>Problematik</i>	4
<i>Vektorsystem</i>	4
<i>Icke viral transport</i>	5
<i>Viral transport</i>	5
Klasser av virala vektorer.....	8
<i>Adenovirusvektorer</i>	8
<i>Retrovirusvektorer</i>	9
<i>Lentivirusvektorer</i>	10
<i>Adeno-associerade vektorer</i>	11
<i>Övriga virala vektorer</i>	12
<i>Poxvirusvektorer</i>	12
<i>Herpes-simplexvirusvektorer</i>	12
<i>RNA-virusvektorer</i>	12
Användningsområden	12
<i>Cancerterapi</i>	12
<i>Genterapeutiska behandlingsmetoder</i>	13
<i>Onkolytiska virus</i>	13
<i>Cancervaccin</i>	13
<i>Resultat från kliniska studier</i>	14
<i>Vaccinteknologi</i>	14
<i>Konventionella vacciner kontra vektorbaserade vacciner</i>	14
<i>Virala vektorer</i>	15
Diskussion	16
Litteraturförteckning	18

SAMMANFATTNING

Under lång tid betraktades virus enbart som ett hot mot djur och människor med stor risk att åsamka skada. Framgångar i molekylär virologi kom att bredda den uppfattningen och visa att den virala infektionsvägen var användbar för terapeutiska syften. Idén gick ut på att avlägsna virala replikations- och sjukdomsalstrande gener från virusets genom och infoga terapeutiska gener i deras plats varpå viruset fungerade som en vektor i patienten. Denna litteraturstudie har för avsikt att redogöra för allmänna principer bakom denna mekanism och tillämpningen av virala vektorer inom veterinärmedicin. Frågeställningen löd: ”På vilket sätt kan virus programmeras om till vektorer för genetiskt material och vilka funktioner fyller de i genterapi, cancerterapi och immunoterapi för profylaktisk och terapeutisk behandling av djur?”. Litteratur erhöles från internationella referensdatabaser och inkluderade vetenskapliga artiklar från både human- och veterinärmedicin.

De virusvektorer som för närvarande angavs ha störst betydelse för veterinärmedicin var adenovirusvektorer, retrovirusvektorer, lentivirusvektorer och adeno-associerade virala vektorer, men att respektive virus hade för- och nackdelar och att samtliga krävde någon form av modifiering för att lämpa sig som vektorer. Framställningsprocessen bestod i stora drag av att co-infektera en särskilt framtagen cellinje med vektor-DNA innehållande *cis*-sekvenser och terapeutiska gener, och hjälpar-DNA i form av ett virus eller en plasmid innehållande kompletterande *trans*-sekvenser. Tillsammans åstadkom de produktion av rekombinanta vektorer och både små- och storskaliga metoder hade tagits fram. Transduktionsmekanismen gick ut på den rekombinanta vektorns infektion av målcellen och uttryck av dess genetiska information.

Utav genterapeutiska behandlingar var cancerterapi ett område där intresset för virala vektorer var utmärkande och lovande resultat hade demonstrerats från kliniska studier. Däremot hävdades att ytterligare forskning behövdes innan sådana behandlingar kunde tillämpas på klinik och i fält. Där tillämpningen av virala vektorer kommit längst var inom vaccinteknologi, där behandlingar redan fanns tillgängliga på marknaden.

Behovet av ytterligare forskning motiverades dels med anledning av patientsäkerhet. Risken för insertionell mutagenes för integrerande vektorer betraktades som en av de största farorna samtidigt som dessa vektorer var bättre lämpade än icke integrerande vektorer i andra viktiga avseenden. Mer forskning krävdes också för framställning av effektiva metoder för storskalig produktion av vektorer vilket är en förutsättning för att de ska kunna tillämpas i behandlingar. För några virala vektorer ansågs det redan finnas tillgängligt men långt ifrån för alla. Slutsatsen flera författare drog är att virala vektorer kommer att få stor betydelse för sjukdomar där effektiva konventionella behandlingsmetoder saknas eller att de kan komma att användas som komplementbehandling mot dessa.

SUMMARY

Until recently, the general perception of viruses was limited to their strong potential of causing harm to animals and humans. However, advances in molecular biology helped to expand this view by demonstrating that the viral infectious pathway could be utilized for therapeutic purposes. The idea was based on the general principle of replacing viral genes coding for replication and pathogenicity, with DNA coding for therapeutic genes and to subsequently use these recombinant vectors to infect patients. The aim of this literature study is to examine this mechanism and the application of viral vectors in veterinary medicine, specifically their role in gene therapy, cancer therapy and immunotherapy for prophylactic and therapeutic treatments. Literature was obtained from international reference databases and included articles from both the human medicine and veterinary field.

Viral vectors of adenoviruses, retroviruses, lentiviruses and adeno-associated viruses were described as having the greatest importance for veterinary medicine at this time, however all of them had pros and cons and each required modification to serve as vectors. The manufacturing process involved, in short, the co-infection of a specific cell line with vector-DNA, containing *cis*-acting sequences and therapeutic genes, as well as helper-DNA (virus or plasmid), containing complementary *trans*-acting sequences. Both large-scale and small-scale production methods had been developed to this end. The transduction mechanism was mediated through infection of the target cell with the recombinant vector and expression of the viral encoding genes in the host.

In the vast range of gene therapy treatments, those targeted against various cancer forms showed a specific interest in viral vector strategies. Promising results had been demonstrated by clinical studies, yet it was argued more research was required before these therapies could be clinically applied. In contrast, viral vector-based vaccines had already been made available for commercial use.

The need for further research was mainly argued as a concern for patient safety. Insertional mutagenesis caused by integrating vectors was considered one of the greatest threats, however in other important aspects, they were better suited than non-integrating vectors. Another reason was lack of efficient methods for large-scale vector production for some of the different vector types. Sufficient manufacturing methods was a precondition for application in clinical settings and therefore most significant. In conclusion, several authors argued that viral vectors will be of great importance for diseases lacking efficient conventional methods for treatment, or that they can be presented as a complementary treatment to these.

INLEDNING

Under lång tid betraktades virus endast som ett hot mot djur och människor med stor risk att åsamka skada. Framgångar i molekylär virologi skulle komma att ändra den uppfattningen och tack vare ett stort antal studier och ett växande intresse har deras potential som vektorer för flera behandlingsformer idag börjat undersökas (Smith *et al.*, 1983; Kieny *et al.*, 1984; Paoletti, 1996; Xiang *et al.*, 1996; Rayner *et al.*, 2002; Kyriakis, 2015). Den naturliga förmågan att inta celler, modifiera värdens försvarsmekanismer och ta över cellens replikationsmaskineri har bidragit till utvecklingen och visat sig vara mycket lämplig för en rad terapier, både terapeutiska och profylaktiska (Lukashev & Zamyatnin, 2016). Genterapi, cancerterapi och vaccinteknologi är tre av dessa vilka visar lovande resultat inför framtiden inom såväl humanmedicin som veterinärmedicin.

Syftet med den här litteraturstudien är att ge en sammanställning av de grundläggande principerna bakom virala vektorer och deras användning inom veterinärmedicin och frågeställningen lyder: ”På vilket sätt kan virus programmeras om till vektorer för genetiskt material och vilka funktioner fyller de i genterapi, cancerterapi och immunoterapi för profylaktisk och terapeutisk behandling av djur?” En introduktion ges till respektive ämne och exempel på resultat från kliniska studier tillhandahålls. Vidare presenteras ett urval av virus med störst relevans för frågeställningen.

MATERIAL OCH METODER

Inledningsvis genomfördes litteratursökning i de internationella referensdatabaserna PubMed, Primo, Google Scholar, Web of Science och Scopus med sökorden ”viral vector” and ”gene therapy” or vaccine or cancer. För att förfina sökningen och begränsa antal resultat användes sökfiltren other animals + veterinary science i PubMed och veterinary science + virology i Web of Science. Ett stort antal humanmedicinska artiklar erhöles och ett mindre antal veterinärmedicinska, rapporter från båda fält inkluderades. I första hand valdes vetenskapligt granskade originalartiklar ut som referenser men även review-artiklar togs tillvara på i undersökningen.

LITTERATURÖVERSIKT

Genterapi

Definition

Det ursprungliga konceptet för genterapi grundas på utbyte av en defekt gen med en fungerande kopia i syfte att åtgärda den ärftliga genetiska skadan, även kallat ”gene replacement therapy”. Effekten åstadkoms genom leverans av nukleinsyra till målceller där de inserterade generna kan koda för RNA eller proteiner med cellulära eller regulatoriska funktioner (Giacca, 2010). Fram till idag har begreppet genterapi vuxit till att innefatta en rad strategier för både terapeutiska och profylaktiska behandlingar där även metoder baserade på ”genome editing” ingår. (Robbins & Ghivizzani, 1998; Dunbar *et al.*, 2018).

Genome editing har potential att lägga till, ta bort eller korrigera gener och baseras på användning av tillverkade eller bakteriella nukleaser. I kort går mekanismen ut på att inducera ett nukleas-inducerat dubbelsträngbrott (DBS) i DNAt hos däggdjursceller vilket i sin tur stimulerar effektiv rekombination. Metoden kan utföras på celler både *ex vivo* och *in vivo*, men i relation till traditionell genterapi är utvecklingen fortfarande i tidig fas (Dunbar *et al.*, 2018; Rouet *et al.*, 1994).

Användningsområden

Många kliniska försök pågår runt om i världen och ett stort antal är riktade mot cancerterapi. Faktumet att långt framskridna cancerpatienter i många fall har en överlägsen nytta/risk-kvot kan vara en förklaring till det (Lukashev & Zamyatin, 2016). Det har också funnits intresse för användning av genterapi för leverans av antikroppar vid tillstånd av infektiös sjukdom vilket kan vara fördelaktigt för äldre, immunsvaga individer eller vid pandemi med snabb spridning (Collins & Thrasher, 2015). Förutom dessa finns en rad sjukdomar för vilka genterapi har undersökts som behandlingsmetod och det används även som komplement till konventionella terapier och mediciner (Robbins *et al.*, 1998). Ett framgångsrikt exempel från veterinärmedicinen där genterapi använts är vid experimentell behandling av diabetes hos hundar. Med hjälp av en adeno-associerad viral vektor bärande på gener kodande för insulin och glukokinas uppnåddes ökat glukosupptag och kontroll av glykemi under åtta år och samtliga försöksdjur betraktades som botade från sin åkomma (Haurigot *et al.*, 2018).

Problematik

En försvårande faktor för utveckling av genterapi är hög kostnad. Bland annat orsakas detta av att priset för utveckling, marknadsföring och tillstånd bara fördelas mellan ett fåtal potentiella patienter (Lukashev & Zamyatin, 2016). Ett sätt att reducera kostnader är att utveckla genterapier som kan administreras oralt då sådana beredningar är billigare att producera eftersom tillverkningen inte måste ske under sterila förhållanden (Salama *et al.*, 2006). Oral medicinering har dessutom flera andra fördelar eftersom det inte är en invasiv behandling (Xie & Xu, 2017). Partnerskap mellan bioteknologiska- och farmaceutiska företag med expertis i storskalig tillverkning skulle också behövas för att behandlingsmetoden ska kunna bryta igenom (Dunbar *et al.*, 2018).

Vektorsystem

Det största hindret för framgångsrik genterapi är transport av verksamt ämne till målceller. I en biologisk miljö är en oskyddad nukleinsyra nämligen inte tillräckligt stabil för att kunna nå in

till cytoplasman där RNA utövar sin funktion, eller in till kärnan där DNA transkriberas och cellgenomet kan modifieras (Lukashev & Zamyatnin, 2016). Av den orsaken är vektorfunktionen central och det ställs flera krav på en bra vektor för genterapi. Säkerhet och effektiv leverans till tillräckligt många celler för att åtgärda den genetiska defekten är två viktiga kriterier samt en definierad komposition och reproducerbarhet i tillverkningen (Collins & Thrasher, 2015). Duration av genuttryck är också en betydelsefull egenskap eftersom behandlingar både kan kräva långvarigt genuttryck eller endast ett övergående (Kay *et al.*, 2001). För samtliga vektorsystem finns styrkor och svagheter och alla kräver någon form av modifiering för att lämpa sig för genterapi (Robbins & Ghivizzani, 1998).

Icke viral transport

Flera icke-virala transportsystem har utvecklats för genterapi och de har både för- och nackdelar. DNA-molekyler packade i plasmider, RNA-molekyler och autologa eller allogeneriska celler som undergått genetisk modifiering *ex vivo* innan transplantation till patienten, är några av dem. DNA-baserade vektorer har till fördel att de är relativt enkla att framställa och standardisera, dock är de instabila i den omgivande miljön. Riktad transport till målorgan och ihållande effekt är ytterligare två problematiska områden (Lukashev & Zamyatnin, 2016).

Viral transport

Virus betraktas vara ett av de mest lovande transportsystemen för klinisk användning (Lukashev & Zamyatnin, 2016). Grundidén är att utnyttja den virala infektionsvägen men undvika uttryck av virala replikations- och sjukdomsalstrande gener (Thomas *et al.*, 2003). Förutom adenovirusvektorer och γ -retrovirala vektorer, vilka till stor del utvecklades under 90-talet, har adeno-associerade och lentivirala vektorer börjat användas mer och mer för genöverföring *in vivo* och *ex vivo* i kliniska kretsar. Dessa fyra representerar för närvarande de viktigaste virala vektorerna inom genterapi (Merten & Gaillet, 2016).

Många egenskaper gör virus till goda kandidater som vektorer för genterapi. Deras naturliga livscykel går ut på att inta och manipulera celler till specifikt genuttryck och de har förmåga att selektivt infektera vissa målceller eller vävnader. Att skapa en vävnadsspecifik vektor har däremot ännu inte varit genomförbart, men det pågår arbete för att uppnå detta. En av metoderna utnyttjar vävnadsspecifika promoters för att driva fram uttryck av den transducerade genen och det utförs även modifiering av element på ytan av vektorpartiklar för att de bättre ska kännas igen av målceller. Ytterligare pågående forskning inkluderar bland annat försök att skapa vektorer för integration till förutbestämda platser i genomet och på så sätt undvika slumpmässig integration till potentiellt skadliga platser (Kay *et al.*, 2001).

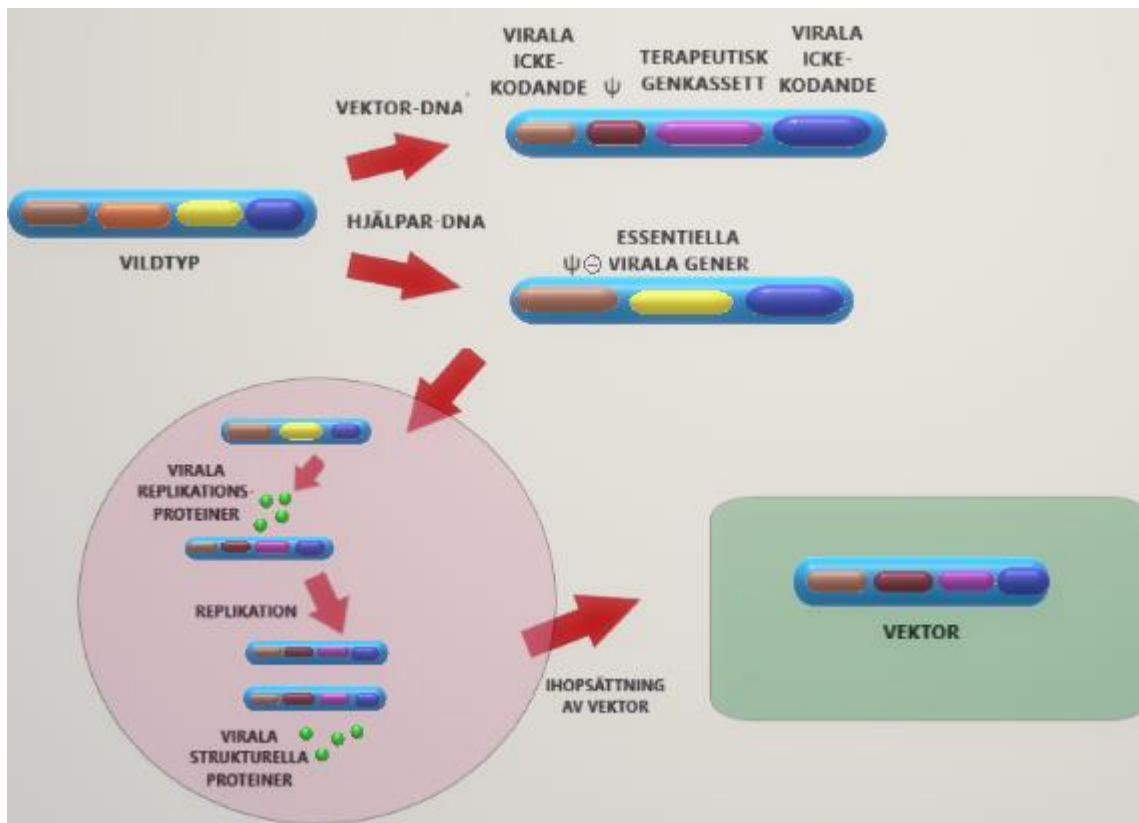
Det utförs också försök att konstruera vektorer som kan känna av och svara på specifika stimuli och på så sätt göra dem mer styrbara. Endogena stimuli såsom pH, redoxpotential och proteaser förekommer i olika nivåer vid sjukdom, i olika organ och organellplatser. För virus som redan naturligt känner av dessa försöker man modifiera dem till att svara på nya sätt. För att manipulera vektorer med exogena stimuli används bland annat temperatur, magnetfält och optiskt ljus. Målet är att trigga en egenskap vid en särskild stimulusnivå utan att påverka någon annan funktion hos vektorn (Brun *et al.*, 2017).

Trots virala vektorers goda egenskaper finns risker associerade med deras användning för genterapi. Akut toxicitet från infusion av främmande material, cellulärt immunsvaret mot de

transducerade cellerna, humoralt immunsvaret mot den terapeutiska genprodukten och insertionell mutagenes från integrerande vektorer är några av dessa. Det har också väckt ett etiskt dilemma kring risken för oavsiktlig transmission av vektorsekvenser till bakterieceller. Uppkomsten av antikroppar riktade mot vektorpartikeln förekommer ofta men blir sällan ett problem, utom i de fall när vektorn kräver upprepad administrering. En sådan situation kan inträffa om duration av genuttryck är kortvarigt (Kay *et al.*, 2001).

Konvertering av virus till vektor

För att förstå konverteringsprocessen av virus till vektor är det gynnsamt att inledningsvis få en överblick över det virala genomet. Virala kodande gener kan nämligen delas upp i de som agerar *in cis* och de med funktioner *in trans* (Wu & Atai, 2000). *In cis* betyder att olika loci befinner sig på samma kromosom av ett homologt kromosompar, medan *in trans* innebär att de befinner sig på var sin kromosom. Sekvenser som krävs *in cis*, vanligen terminal repeat sekvenserna, måste viruset själv bära på för att bland annat kunna packa genomet i viruskapsiden och integrera vektorns DNA i cellkromatinet (Wu & Atai, 2000; Thomas *et al.*, 2003). Sekvenser som kommer till användning *in trans* kan kompletteras av DNA-sekvenser som inserteras till värdgenomet eller förses av en bärare som då infekterar cellen tillsammans med viruset. Bäraren kan utgöras av en plasmid eller ett hjälparvirus som saknar en packande domän (ψ) så att dess RNA eller det själv inte kan packas till viruspartiklar (Kay *et al.*, 2001). Funktioner som tillgodoses av de *trans*-agerande sekvenserna är bland annat kodning av proteiner för replikation, kapsid och lipidhölje. Hos virus med små virala genom är generellt alla dessa sekvenser avlägsnade för att skapa utrymme för insertion av terapeutiska gener samt för att göra vektorn inkapabel att replikera (Wu & Atai, 2000). Separationen av *cis* och *trans*-sekvenserna förhindrar rekombination till replikationskompetenta virala partiklar (Kay *et al.*, 2001). Den utvalda genkassetten klonas sedan in till utrymmet i DNA där de deleterade generna suttit. Slutligen co-infekteras en lämplig cellinje med vektorgenomet och bäraren vilket resulterar i produktion av rekombinanta vektorer, se figur 1 (Thomas *et al.*, 2003).

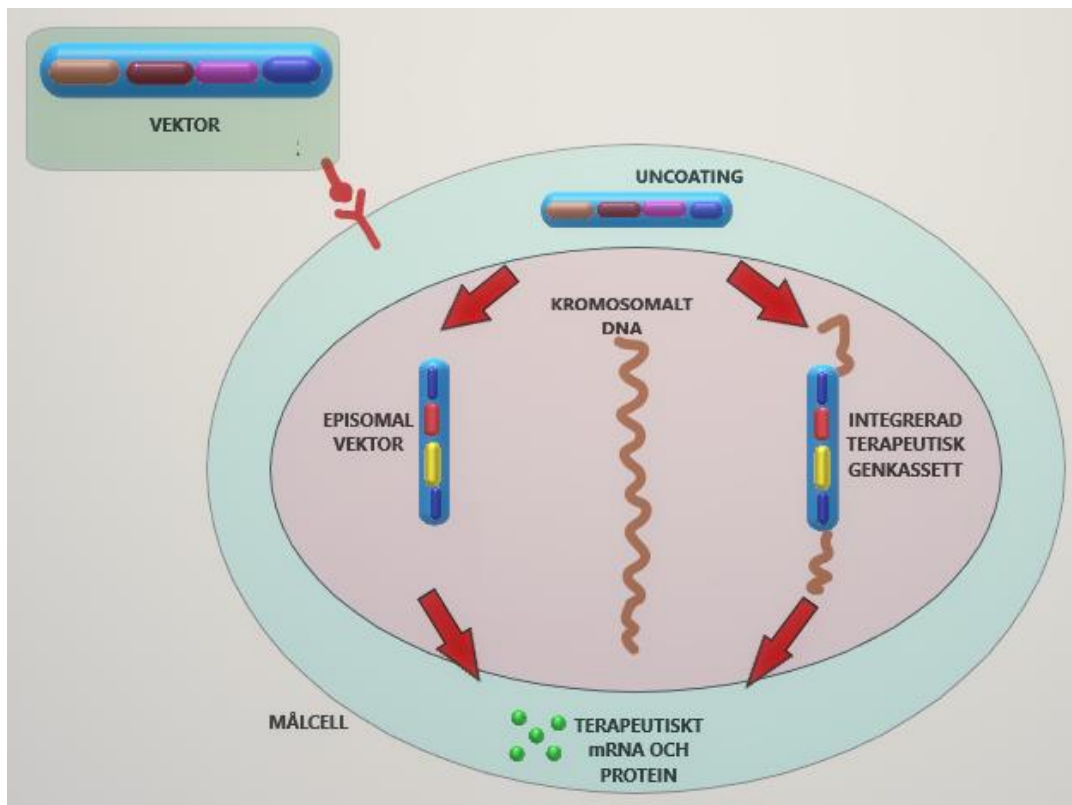


Figur 1. Bild över konverteringsprocessen av virus till vektor. Baserad på Kay *et al.*, 2001.

Uttrycket för den relativa koncentrationen av framställda vektorer, den så kallade titern, definieras av koncentrationen virala partiklar och/eller antal virioner kapabla till transduktion. Generellt utgör dessa partiklar endast en liten del av totalantalet och kan variera mellan olika framställningsmetoder i olika laboratorier. Standardiserade tekniker saknas i nuläget vilket gör fastställning av specifik aktivitet hos olika vektortyper problematiskt (Kay *et al.*, 2001).

Mekanismen för transduktion

Begreppet transduktion beskriver mekanismen då målcellen infekteras av den rekombinanta vektorn och dess genetiska information uttrycks. Processen inleds med att vektorpartiklarna binder till cellen, vilket generellt sker via receptormediering, och sedan tar sig in i cellen och vidare in till cellkärnan. I cellkärnan sker en komplex process där vektorns genom omvandlas till dubbelsträngat DNA som beroende på vektor integreras antingen i värdgenomet eller persisterar i en episom. Slutligen uttrycks den terapeutiska genen, se figur 2 (Kay *et al.*, 2001).



Figur 2. Bild över transduktionsmekanismen. Baserad på Kay *et al.*, 2001.

Klasser av virala vektorer

Adenovirusvektorer

Adenovirus tillhör familjen *Adenoviridae* och är stora, nakna virus med ett dubbelsträngat DNA-genom (26–40 kilobaspar (kb)) och en ikosahedrisk kapsid (Warnock *et al.*, 2011). Klassificering delar in adenovirus i sex arter (A-F) och det finns över femtio olika serotyper som infekterar människor. De två mest studerade av dessa är serotyperna 2 och 5 associerade med art C vilka också är de mest använda adenovirusvektorerna för genterapi (Giacca, 2010). Genom att använda serotyper som naturligt smittar en annan art än patientens, kan problem relaterade till preexisterande immunitet kringås (Kay *et al.*, 2001).

Innan adenovirus utnyttjas för transport av nukleinsyra undergår de olika nivåer av attenuering. Attenueringen uppnås genom deletion av genomfragment som kodar för tidiga proteiner, det vill säga de proteiner som bildas under virusets syntesfas och ställer om cellen för virusproduktion (Lukashev & Zamyatnin, 2016). Hos den första generationens adenovirusvektorer är endast en gen med regionerna E1A, E1B, och i vissa fall även E3, avlägsnad och det finns utrymme för upp till 8 kb transgent DNA (Ginsberg *et al.*, 1989; Merten & Gaillet, 2015). E1A är avgörande för initiering av virusreplikation och kodar för onkoproteiner (Steegenza *et al.*, 1996; Giacca, 2010). E3-genen kodar för proteiner med immunomodulerande egenskaper vilket gör eliminering av den särskilt viktig vid vektorframställning för vaccinsyften då dessa kan ha negativ inverkan på vaccinpotsen (Ginsberg *et al.*, 1989; Merten & Gaillet, 2015). För generering av vektorer utan E1 måste de E1-kodande proteinerna tillgodoses *in trans* av den vektorproducerande cellinjen. Cellinjen ska också främja tillväxten av vektorer och minimera risken för uppkomst av replikationskompetenta adenovirus (replication competent adenovirus, RCA) vilket kan ske vid

innehåll av sekvenser med potential till homolog rekombination med vektorn (Lochmuller *et al.*, 1994; Merten & Gaillet, 2015).

Utveckling av den andra generationens vektorer inleddes efter att samband mellan cytotoxicitet och immunogenicitet med den första generationens vektorer upptäckts. Från dessa avlägsnas förutom E1 även E2 och/eller E4, och uppvisar enligt rapporter en minskad immunogenicitetsprofil. RCA minimeras också eftersom hopsättning av dem kräver ett mycket stort antal rekombinationer i produktionscellinjen. Det tillgängliga utrymmet för insertion av transgener i dessa vektorerna utgörs av 14 kb (Giacca, 2010).

Den tredje och senaste generationens adenovirusvektorer fräntas samtlig genetisk information och har på engelska fått benämningen ”gutless vectors”. Upp till 36 kb exogent DNA kan ersätta de frigjorda regionernas plats, men deletionen gör också att vektorerna kräver hjälp utifrån för att tillgodose all *in trans* replikation och strukturfunktion (Merten & Gaillet, 2015).

I småskalig produktion av första och andra generationen vektorer odlas cellinjer infekterade med en rekombinant Ad5 vektor i petriskålar eller liknande materiel. När cellerna når full cytopatisk effekt skördas vektorerna, cellerna lyseras och vektorpartiklarna koncentreras och renas. Efter det sista processteget sparas vektorpartiklarna i en fysiologisk buffrande vätska. Tredjegerationsproducerande celler infekteras förutom av den rekombinanta Ad5 vektorn även av en hjälparvektor. För klinisk användning av virala vektorer krävs däremot storskaliga produktionsmetoder vilka äger rum i flera steg under specifika förhållanden. Systemen utnyttjar olika typer av reaktorer och särskilda medium används för att främja celltillväxt (Merten & Gaillet, 2015).

Eftersom adenovirusets genom inte integrerar med värdcellens associeras vektorn med hög säkerhet för patienter (Lukashev & Zamyatnin, 2016). En annan fördel är att de kan produceras i höga titrar (Volpers & Kochanek, 2004). Vid intravenös administrering koncentreras generellt vektorerna i levern, men vid direkt injektion har de förmåga till transduktion av de flesta vävnader i både delande och icke delande celler. Vektorerna har använts i prekliniska djurstudier för att bland annat transducera lever, skelettmuskulatur, hjärta, lunga och pankreas (Kay *et al.*, 2001). Däremot är virusets livscykel inte anpassad för längre duration av transgent uttryck (högst dagar) och viruspartiklarna har extremt immunogena kapsider vilket kan vara till nackdel. Trots det har adenovirusvektorer demonstrerat nytta i ett antal sammanhang, däribland vid behandling av maligna tumörer och vaccnutveckling, två av vektorns huvudsakliga användningsområden (Lukashev & Zamyatnin, 2016).

Retrovirusvektorer

Retrovirus tillhör familjen *Retroviridae* och genom utgörs av två positiva enkelsträngade RNA-molekyler (7–12 kb) (Warnock *et al.*, 2011). Partikelorganisationens komplexitet delar in retrovirus i två grupper: enkla retrovirus där bland annat γ -retrovirus finns inkluderat, och komplexa retrovirus där lentivirus faller in (Coffin *et al.*, 1997; Merten & Gaillet, 2015). Vid avknopningsprocessen erhåller viruspartikeln ett membranhålje (Merten & Gaillet, 2015) och till det fäster glykoproteiner som genom interaktion med receptorer på värdceller bestämmer virusets tropism (Kay *et al.*, 2001). För att utöka, eller på något annat sätt modifiera denna spännvidd, finns en metod kallad pseudotyping. Mekanismen går ut på att virala *env* gener som kodar för komponenter till membranhåljet byts ut mot respektive gener från ett orelaterat virus och på så sätt förändra vektorns tropism (Kay *et al.*, 2001). Pseudotyping begränsas dock av

antalet unika virala adhesionsproteiner som det finns receptorer uttryckta för på målceller (Waehler *et al.*, 2007).

Användning av särskilda adaptorproteiner har därför undersökts som ett alternativ och är bra på så sätt att de inte kräver en detaljerad kunskap om den virala strukturen. Organisationen hos adaptorproteinet tillåter en ände att binda till det virala adhesionsproteinet medan den andra änden kan binda till receptorn på målcellen. Eftersom olika adaptorproteiner kan paras till samma vektor är metoden mycket flexibel. Behovet av en separat adaptor kan också kringgås genom en annan strategi där specifika ligander inkorporeras genetiskt i vektorerna, antingen till kapsiden eller höljet. Den metoden är dock tekniskt svårare att genomföra (Waehler *et al.*, 2007).

Eftersom retrovirus är RNA-virus innehåller replikeringsprocessen ett steg där RNA kopieras in till DNA och integreras till värdcellens genom (Lukashev & Zamyatnin, 2016). Trots att integrationen inte garanterar stabilt uttryck av transgenen försäkras lagring av den genetiska informationen även i till exempel en självregenererande vävnad eller i den klonala utväxten av en stamcell (Kay *et al.*, 2001). För att preintegrationskomplexet ska kunna få åtkomst till värdcellens kromatin krävs dock störning av kärnmembranet och produktiv transduktion är helt beroende av att målcellen påbörjar mitos strax efter vektorn tagit sig in (Miller *et al.*, 1990). Vektorn kan leverera upp till 10 kb exogent DNA (Lukashev & Zamyatnin, 2016).

Platsen för genomintegrering är inte slumpmässig och vissa retrovirus har tendens att integrera nära till starten för en transkriptionenhet i ett aktivt transkriberat loci vilket med hög sannolikhet kan leda till att kontroll över onkogenuttryck upphör att fungera normalt (Wu *et al.*, 2003). En biverkning av denna karaktär kallas för insertionell mutagenes eller genotoxicitet och ur säkerhetsperspektiv är det därför mer lämpligt att välja en vektor som saknar denna egenskap, till exempel lentivirus (Lukashev & Zamyatnin, 2016).

Med hjälp av nyligen framtagna cellinjer för produktion av retrovirusvektorer kan höga titrar av transducerande partiklar utvinnas. De kan också lagras och delas upp för att generera stora andelar vektorer fria från replikationskompetenta retrovirus (replication competent retrovirus, RCR) på ett praktiskt sätt (Kay *et al.*, 2001). Utveckling har också lett till strategier för att skapa retrovirusvektorer som kan styra sin egen aktivering. Introducering av direkt upprepande sekvenser, vilket leder till högfrekventa deletioner under den omvända transkriptionen, ligger bakom mekanismen (Hu & Pathak, 2000).

Eftersom retrovirus kräver delande celler för transduktion är applikationen av retrovirus begränsad. Däremot är de fortfarande bra lämpade för särskilda mål *ex vivo*, till exempel vid transduktion av lymfocyter (Dunbar *et al.*, 2018). De har också använts i studier av vävnads- och benreparation för att leverera faktorer för tillväxt och differentiering till mogna stamceller och benceller (Warnock *et al.*, 2011).

Lentivirusvektorer

Lentivirus tillhör gruppen retrovirus, de har gemensam kapselstruktur och transkriberas likt övriga retrovirus intill aktivt transkriberade loci, men föredrar 3' änden för integration till genomet (Lukashev & Zamyatnin, 2016). Till skillnad från andra retrovirus kräver lentivirus inte delande celler för integration utan förlitar sig på aktiv transport av preintegrationskomplexet (Bukrinsky & Haffar, 1991; Kay *et al.*, 2001). Kapaciteten för insertion av exogent DNA är principiellt likvärdig (Lundstrom, 2003).

En lentivirusvektor pseudotypad med vesicular stomatitis virus (VSV-G) kunde levereras direkt *in vivo* och effektivt transducera neuroner och gliaceller i CNS hos gnagare (Naldini *et al.*, 1996) och icke-humana primater (Kordower *et al.*, 1999). Ett annat användningsområde är transduktion av hematopoetiska stamceller vilket möjligen är en unik förmåga hos retrovirusvektorer (Kay *et al.*, 2001). De används också för vaccinflamställning tack vare deras förmåga till effektiv transduktion av dendritiska celler och stimulering av skyddande T-cellssvar (Zarei *et al.*, 2004). Två stycken begränsade faktorer för vektorerna å andra sidan, är att det saknas effektiva metoder för storskalig produktion och risken associerad med dess genomintegration (Lundstrom, 2003).

Adeno-associerade vektorer

Adeno-associerade virus tillhör familjen *Parvoviridae* och är små, nakna virus med enkelsträngat DNA-genom (4–5 kb) och en ikosahedrisk kapsid (Wu *et al.*, 2010). Endast två gener bidrar till den genetiska informationen som kodar för två polypeptider: *rep* som krävs för viral genomreplikation och *cap* som kodar för strukturella proteiner. På vardera sida omges generna av virala inverterade terminala repetitiva sekvenser (inverted terminal repeats, ITRs) (Kay *et al.*, 2001). Nya serotyper upptäcks fortlöpande och tolv stammar har hittills isolerats från primater och människor (Merten & Gaillet, 2016). Viruset är ett icke-autonomt parvovirus vilket innebär att de inte kan replikera utan ett hjälparvirus. Vid naturlig infektion integrerar virusets genom mycket sällan med värdcellens, utan kvarstår som episomer (Lukashev & Zamyatnin, 2016).

För att framställa adeno-associerade vektorer används två separata uppsättningar av plasmider varav den första innehåller ITRs på vardera sida om en terapeutisk genkasset, och den andra uppsättningen bär på generna *rep* och *cap*. Tillsammans med ett hjälpar-adenovirus eller en tredje plasmid med de essentiella komplimenterande generna, adderas de till en lämplig cellinje (Matushita *et al.*, 1998). Idag är storskalig produktion av vektorerna komplicerad och arbetsam, och hoppet sätts till nya metoder att förenkla processen (Kotin, 2011).

En positiv egenskap hos adeno-associerade vektorer är att kapsiden är mindre immunogen än kapsider tillhörande exempelvis adenovirus vilket minskar sannolikhet för inflammatoriska reaktioner mot vektorn. Att vektorn även helt saknar förmåga till integrering med värdcellens genom är också gynnsamt då risken för genotoxiska biverkningar elimineras (Lukashev & Zamyatnin, 2016). I delande celler blir däremot resultatet att vektorns genom gradvis minskar och därmed även det transgena uttrycket. Av denna anledning är vektorn bäst lämpad för transduktion i långsamt delande celler, till exempel myocyter, men det går att uppnå transduktion i flera olika vävnader inklusive CNS, lever, lunga och muskel genom *in vivo* administration (Giacca, 2010). I djurförsök har vektorerna använts för behandling av brännskador (Galeano *et al.*, 2003) och andra hudsår (Deodato *et al.*, 2002), men generell forskningsfokus har legat på behandling av monogena sjukdomar och cancer (Coura & Nardi, 2007).

Det finns strategier för att uppnå en längre duration av transgent uttryck. Ett av dessa består av kontrollerad frisättning av små halter av vektorer från särskilt anpassade bärare (Rey-Rico & Cucchiari, 2016). Beroende på metod kan transgenen uttryckas från allt mellan månader till år (Lukashev & Zamyatnin, 2016). En begränsning hos vektorn som däremot inte går att kringgå

är den relativt lilla packningskapaciteten för transgener vilken högst rymmer 4.7 kb (Merten & Gaillet, 2016).

Övriga virala vektorer

Poxvirusvektorer

Poxvirus tillhör familjen *Poxviridae* och är ett stort och komplext virus med ett dubbelsträngat DNA-genom (180–220 kb) (Lukashev & Zamyatnin, 2016). Replikation äger rum inuti cytoplasman hos infekterade celler och viruset integrerar därför inte med genomet vilket är positivt ur säkerhetsaspekter. Upp till hela 25 kb av exogent DNA kan inserteras till poxvirusvektorer vilket är en bidragande anledning till att poxvirus var bland de första virus som kandiderade för viral vektoranvändning. Det stora utrymmet möjliggör extra DNA-insertion och uttryck av flera transgener samtidigt vilket utnyttjas för framställning av multivalenta vacciner (Braun *et al.*, 2008). Vidare har de förmåga till transduktion av de flesta celltyper men ger kort transgent uttryck (dagar) (Lukashev & Zamyatnin, 2016).

Herpes-simplexvirusvektorer

Herpes-simplexvirus är ett stort dubbelsträngat DNA-virus (152 kb) och en lovande vektor *in vivo* framförallt för transduktion av neuroner baserat på förmågan att etablera latens hos värden efter en primär infektion. En positiv egenskap är också den stora kapaciteten för insertion av exogent DNA (30 kb) och förmågan att infektera icke-delande celler av flera typer (Robbins *et al.*, 1998; Wu & Atai, 2000). Efter infektion förblir vektorns genom episomalt vilket dessutom eliminerar risken för genotoxicitet (Wu & Atai, 2000). Neurologiska sjukdomar associerade med kroniska patologier som kräver ihållande duration av terapeutiskt genuttryck är ett område där vektorerna utnyttjas (Lundstrom, 2003). För herpesvirus som drabbar sällskapsdjur och produktionsdjur och orsakar stora ekonomiska förluster används herpes-simplexvirus även för vaccinframställning (Braun *et al.*, 2008).

RNA-virusvektorer

Bortsett från retrovirus och lentivirus har RNA-virus inte någon stor användning inom genterapi. Förutom att deras genom inte är anpassade för omfattande modifikationer och storskalig produktion så förlorar de lätt heterologa insertioner och medicin-standardisering försvåras av uppkomsten av ett stort antal mutationer under replikation. Området anticancerterapi är däremot ett fält som bland annat utnyttjar egenskaper hos RNA-virus, bland annat deras förmåga att lättare replikera i cancerceller än i normal, frisk vävnad (Lukashev & Zamyatnin, 2016).

Användningsområden

Cancerterapi

Cancer är den största sjukdomsrelaterade dödsorsaken hos sällskapsdjur såsom hundar och katter (Gentshev *et al.*, 2014). Flera genterapeutiska metoder har undersökts för behandling av cancer, och för cancertyper där lämpliga eller godkända terapier saknas har genterapi en unik förmåga att bidra med strategier (Glikin & Finocchiaro, 2014). Både behandlingar med fokus på att modulera immunförsvaret och direkta tumörspecifika angreppsmetoder har tagits fram. Det finns också cellbaserade terapier där tumörceller eller cellextrakt utnyttjas som immunogener. I vilket fall beror resultatet av någon typ av cancerimmunoterapi på generering av immunsvaret vilket indirekt eller direkt orsakar tumörcelldöd (Harrop *et al.*, 2006).

Genterapeutiska behandlingsmetoder

En strategi som föreslagits är att korrigera tumörcellernas genotyp genom återställning av tumörsuppressorgenfunktion (Friedmann, 1992). Problemet är då att genleverans måste ske till varje enskild tumörcell och att omodifierade celler med stor sannolikhet kommer att växa ifrån de modifierade. I de fall cancer är spridd ställs dessutom kravet att genleverans ska kunna utföras systemiskt. Av det skälet är behandlingsmetoder som systemiskt skapar en antagonistisk miljö genom förstärkning av anti-tumör-immunitet rimligare (Collins & Thrasher, 2015).

Suicidterapi är en annan behandlingsmetod vilken involverar vektorleverans av tumörspecifika toxiner eller metabolisering av prodrugs till toxiner, genom en process kallad "bystander effect". Syftet är att uppnå en terapeutisk effekt utan att behöva nå samtliga celler i en tumör och går ut på att genprodukten eller den konverterade prodrugen flyttas mellan celler (Kay *et al.*, 2001).

Strategier för att stimulera immunförsvaret inkluderar modifiering av patientens egna T-celler till att enklare kunna känna igen tumörer. Bakgrunden till det är att tydliga samband har påvisats mellan antal T-celler som infiltrerar tumören och utfallet för patienten (Collins & Thrasher, 2015).

Onkolytiska virus

Ytterligare sätt att använda virus i behandling mot cancer innefattar terapier med onkolytiska virus, vilka kännetecknas av selektiv replikation och lysning av tumörceller (Thomas *et al.*, 2003). Idén bakom metoden föddes då det upptäcktes att det skedde regression av tumörer i samband med naturliga infektioner hos cancerpatienter (Cattaneo & Russell, 2017). Vissa virus har en naturlig fenotyp som gör att replikation bara kan äga rum i cancerceller med muterat regulatoriskt maskineri eller förändrat receptoruttryck. För onkolytisk terapi manipuleras däremot de flesta virus genom att avlägsna gener som är nödvändiga för replikation i normala celler (Liu & Kirn, 2008). Metoden resulterar i virus som bara kan replikera i tumörceller med bibehållen funktion. Adenovirus och herpes simplexvirus representerar de mest använda virusen för detta syfte och data från flera djurmodeller och kliniska försök indikerar att de kommer kunna vara effektiva verktyg för tumörer i framtiden (Thomas *et al.*, 2003).

Cancervaccin

Cancerimmunoterapi har också använt levande rekombinanta virala vektorer för utveckling av cancervaccin. Principen går ut på viral transport av bland annat cytokiner och co-stimulatoriska molekyler med immunomodulerande egenskaper och tumör-associerade antigener (TAAs) för att inducera ett potent immunsvaret där både cellmedierat- och antikroppsmedierat immunsvaret ingår (Harrop *et al.*, 2006). Däremot härstammar TAAs från proteiner som uttrycks i normala celler och det är förutspått att immunsvaret till sådana peptider kan komma att tryckas ned på grund av självtolerans alternativt ge upphov till autoimmunitet om ett effektivt immunsvaret uppnås (Rodriguez-Lecompte *et al.*, 2004). Ett flertal virus har använts i tidiga kliniska försök på människor, bland annat rekombinanta herpes- och adenovirus. Generellt har resultaten visat att metoden är säker för patienter, men däremot är indikationerna på klinisk effektivitet inkonsekventa. En faktor som också väger mot metoden är att introduktion av immunsvaret kan ske först veckor efter injektion medan andra terapier, till exempel behandling med monoklonala antikroppar, kan ha inverkan på tumörtillväxt snabbt efter administrering (Harrop *et al.*, 2006). Enligt review-artikeln "*Cell-based cancer gene therapy: breaking tolerance or inducing*

autoimmunity” har det däremot efter humana och djurstudier demonstrerats att dendritiska celler transducerade med replikationsdefekta adenovirusvektorer som uttrycker TAAs effektivt kan inducera immunitet mot tumörer. Cytotoxiskt T-cellsvar utan oönskad autoimmunitet observerades också (Rodriguez-Lecompte *et al.*, 2004). Samstämmighet råder dock i frågan om att mer forskning och större kliniska studier krävs för att gå vidare med konceptet (Rodriguez-Lecompte *et al.*, 2004; Harrop *et al.*, 2006).

Resultat från kliniska studier

I review-artikeln ”*Clinical trials of immunogene therapy for spontaneous tumors in companion animals*” sammanställs rapporter från ett flertal forskningscenter som bedrivit veterinärmedicinska kliniska studier med syfte att utvärdera effekten av genterapeutiska anticancerbehandlingar hos sällskapsdjur med spontant uppkomna tumörer. Grupperna av försöksdjur bestod till störst del av privatägda hundar, men även hästar och katter användes. Melanom hos hund, mjukdelssarkom, osteosarkom, lymfom, felint fibrosakrom och equint melanom behandlades genom både viral- och icke viral transport av genprodukter såsom cytokiner, suicidgener, xenogena tumörassocierade antigen, specifika ligander och proapoptotiska faktorer. Resultatet blev att ett fåtal eller inga biverkningar uppkom från behandlingarna och patienterna uppvisade generellt längre överlevnad, uppskjuten eller tillbakamotad återkomst av metastatisk spridning samt ökad livskvalitet. Överlägsna resultat fick de patienter som behandlades vid ett tidigt stadium och även fick standardbehandlingar såsom operation, kemoterapi och/eller strålningsterapi. På grund av säkerhetsbeaktning, kostnad för vektorproduktion och lovande resultat från plasmidbaserade vektorer dras slutsatsen att icke virala behandlingar är mer sannolika att bli godkända och tillgängliga för veterinära onkologpatienter än virala vektorer och att dessa metoder är mest användbara som komplement till konventionella behandlingsformer (Glikin & Finocchiaro, 2014).

Vaccinteknologi

Vaccin är ett av det mest potenta och kostnadseffektiva redskap för profylaktisk behandling inom veterinärmedicin. Det ultimata syftet är att framkalla en livslång immunitet mot en avsedd patogen utan att ge upphov till kliniska eller patologiska symtom. Låg kostnad är också en viktig målsättning, framförallt i U-länder och för omfattande vaccination av fjäderfä (Ferreira *et al.*, 2005). Faktum att 90 % av patogener tar sig in och infekterar via slemhinnor gör också egenskapen att kunna reducera mikroorganismernas förmåga att etablera sig där viktig (Potter *et al.*, 2008). Vacciner som uppfyller alla dessa önskemål är däremot sällsynta och det finns fortfarande allvarliga sjukdomar där tillgång till något vaccin inte finns (Ferreira *et al.*, 2005). Faktorer såsom klimatförändringar och en växande global handel av djur och djurprodukter motiverar ytterligare till framtagning av bättre skydd från allvarliga smittor (Kyriakis, 2015).

Konventionella vacciner kontra vektorbaserade vacciner

Inaktiverade och subenhetsvacciner innehåller mikroorganismer inkapabla till replikation och ingen proteinproduktion tar vid i cytosolen. Konsekvensen blir att virala antigen inte presenteras av MHC 1 klass molekyler och att generering av cytotoxiska CD8 T-celler uteblir. Den förmågan har å andra sidan levande attenuerade vacciner men associeras däremot med risken för mutationer och återgående till virulens (Ferreira *et al.*, 2005). Processen för framställning är dessutom tidskrävande vilket kan försena bekämpning vid utbrott och vaccinerna är även svårare att lagra och transportera, där stabiliteten påverkas särskilt i höga

temperaturer i tropiska klimat (Chen & Kristensen, 2009; Kyriakis, 2015). Begränsningarna hos traditionella vacciner är flera, och sedan upptäckten att virus besitter egenskaper väl anpassade för syftet har virala vektorer blivit en attraktiv kandidat för nya vaccinationsteknologier (Ferreira *et al.*, 2005). Särskilt motiverande är utmaningen att skapa rekombinanta vacciner mot de patogener som har dålig tillväxt eller inte kan tillväxa *in vitro* vilket gör framställning av ett traditionellt vaccin omöjlig (Kyriakis, 2015).

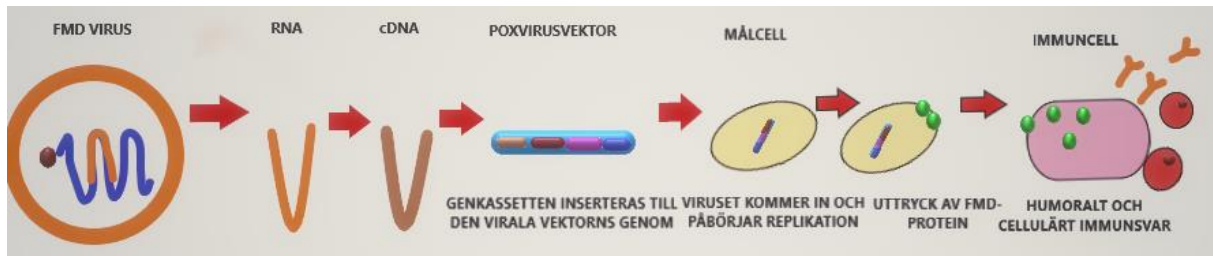
Virala vektorer

En uppsjö av huvudsakligen DNA-virus har testats som vaccinkandidater efter attenuering och insertion av gener kodande för virala eller bakteriella antigen (Kyriakis, 2015). Hög potens gällande transport och uttryck av främmande proteiner i flera celltyper och arter är en anledning till att just adenovirusvektorer popularitet för vaccinutveckling inom veterinärmedicin har växt avsevärt. Bidragande är också att de ofta inducerar både humoralt och cellulärt immunsvaret mot främmande antigen (Ferreira *et al.*, 2005). Bland annat har snabb expansion och migration av CD8 T-celler genom det lymfatiska systemet och en hög bibehållande nivå av immuncellerna observerats (Yang *et al.*, 2003). Andra fördelar inkluderar möjlighet till oral administrering (Babiuk & Tikoo, 2000), hög säkerhetsfaktor samt effektiva och väl etablerade produktionstekniker (Danthinne & Imperiale, 2000). Både replikationsdefekta och replikationskompetenta adenovirusvektorer har tagits fram och trots säkerhetsrisk stödjer flertal studier användning av RCA i vaccinering av djur. Anledningen är att de replikationsdefekta formerna rapporterats ha begränsad förmåga att inducera immunitet i slemhinnan och ge komplett skydd gentemot respiratorisk infektion (Papp *et al.*, 1997; Ferreira *et al.*, 2005). En annan nackdel är att icke-replikerande vektorer kräver åtminstone två administreringar för framkallande av en långvarig immunitet medan replikationskompetenta endast behöver ges en gång (Kyriakis, 2015).

Inom veterinärmedicin är humana serotyper av adenovirus ett av de huvudsakliga vektorsystemen för vaccinantigenleverans i bruk och flera lovande rekombinanta vacciner har tagits fram (Ferreira *et al.*, 2005). Orsaken till att humana serotyper generellt används är för att undvika pre-existerande immunitet mot den virala vektorn eller antigen-liknande virus (Kyriakis, 2015). Framgång har bland annat uppnåtts med utveckling av ett vektorbaserat rabiesvaccin vilket observerades generera höga titrar av virala neutraliserande antikroppar hos hundar som inte hade fått tillfredsställande nivåer efter vaccination med ett konventionellt vaccin (Tims *et al.*, 2000). Immunsvaret mot det rekombinanta vaccinet var dessutom opåverkat av maternell immunitet och demonstrerade således inget hinder mot neonatal immunisering vilket i många andra fall kan vara ett problem (Wang *et al.*, 1997). Ett annat exempel från kliniska studier är användning av ett rekombinant vaccin mot mul- och klövsjuka (FMDV) baserad på ett replikationsdefekt adenovirus. Strategin bakom vaccinet utnyttjar att FMDV är känsligt mot alfa/beta-interferon och vaccinering av grisar resulterade i effektivt skydd vid inokulering av ett virulent FMDV tjugofyra timmar senare (Chinsangaram *et al.*, 2003). Hög biosäkerhet och egenskapen att kunna differentiera dessa vaccinerade djur från smittade djur (differentiation of infected from vaccinated animals, DIVA) har potential att göra vaccinet eftertraktat i FMDV-fria länder (Draper & Heeney, 2010).

Förutom adenovirus är också poxvirus betraktat som ett av det mest lovande viruset för vaccinutveckling (Ferreira *et al.*, 2005). Både replikationsdefekta och replikationskompetenta vektorer har tagits fram i avvägningen mellan hög biosäkerhet och längre ihållande immunitet

efter en administration (Draper & Heeney, 2010). Flera poxvirus har gett upphov till vacciner mot patogener, både humana och sådana som drabbar djur, och genererat ett starkt immunsvar, men ett något lägre CD8+ T-cellsvar. FMDV, blåungevirus, rift valley fever virus och small ruminant morbillivirus (tidigare Peste des Petits Ruminants Virus (ICTV, 2016)) är några av de sjukdomar som vaccin testats mot i studier och uppnått goda resultat enligt de flesta publicerade rapporter (Kyriakis, 2015).



Figur 3. Principen för mekanismen bakom rekombinanta vaccin. Genen som kodar för ett kapsidprotein tillhörande FMD-virus syntetiseras från RNA till komplementärt DNA och inserteras till poxvirusvektorns genom. När den virala vektorn kommer in i värdcellen inleds viral replikation och FMD-antigen kommer till uttryck. Immunförsvaret svarar med både humoralt och cellmedierat immunsvar. Baserad på Kyriakis, 2015.

Minst 12 virala vektorvacciner är licensierade för veterinärmedicinsk användning, men trots det och positiva resultat från studier används rekombinanta vacciner fortfarande i liten utsträckning i fält och på klinik. Det beror bland annat på strikt reglerade säkerhetskrav, höga kostnader och problem med pre-existerande aktiv eller passiv immunitet (Draper & Heeney, 2009; Kyriakis, 2015). De förväntas heller inte ersätta nuvarande vacciner så länge traditionella vacciner är effektiva under kliniska förhållanden. Däremot antyder prognosen att den nya generationen vacciner kommer att spela en betydande roll vid behandling och kontroll av sjukdomar orsakade av patogener där traditionella vacciner inte går att utveckla (Kyriakis, 2015).

DISKUSSION

Denna litteraturstudie har för avsikt att redogöra för allmänna principer bakom virala vektorer och deras användning inom veterinärmedicin. Frågeställningen löd: ”På vilket sätt kan virus programmeras om till vektorer för genetiskt material och vilka funktioner fyller de i genterapi, cancerterapi och immunoterapi för profylaktisk och terapeutisk behandling av djur?”. Att svara på frågan visade sig vara en ambitiös målsättning då ämnets vida omfattning och snabba utveckling krävde granskning av ett stort antal artiklar.

Ett av de mest uppenbara undersökningsresultaten var den stora potentialen virala vektorer uppvisade som verktyg för olika behandlingsformer. Grundtanken var att ta till vara på den virala infektionsvägen för transport av terapeutiska gener, men att undvika uttryck av virala replikations- och sjukdomsalstrande gener (Thomas *et al.*, 2003) vilket flera metoder framgångsrikt hade åstadkommit. Adenovirusvektorer, retrovirusvektorer, lentivirusvektorer och adeno-associerade virala vektorer angavs ha störst betydelse för veterinärmedicin för närvarande (Merten & Gaillet, 2016), men att respektive virus hade för- och nackdelar och att samtliga krävde någon form av modifiering för att lämpa sig som vektorer (Robbins & Ghivizzani, 1998).

Utav genterapeutiska behandlingar var cancerterapi ett område där intresset för virala vektorer var utmärkande (Lukashev & Zamyatnin, 2016) och lovande resultat hade demonstrerats från

kliniska studier (Glikin & Finocchiaro, 2014). Däremot hävdades att ytterligare forskning behövdes innan sådana behandlingar kunde tillämpas på klinik och i fält. Längst i tillämpningen av virala vektorer hade vaccinteknologi kommit, där behandlingar redan fanns tillgängliga på marknaden (Draper & Heeney, 2009; Kyriakis, 2015). Att vaccin är den mest kostnadseffektiva och potenta profylaktiska behandlingen inom veterinärmedicin kan vara en förklaring till utvecklingen (Ferreira *et al.*, 2005).

Behovet av ytterligare forskning motiverades dels med anledning av patientsäkerhet. Risken för insertionell mutagenes för integrerande vektorer betraktades som en av de största farorna samtidigt som dessa vektorer var bättre lämpade än icke integrerande vektorer i andra viktiga avseenden (Kay *et al.*, 2001). Mer forskning krävdes också för framställning av effektiva metoder för storskalig produktion av vektorer vilket är en förutsättning för att de ska kunna tillämpas i behandlingar på klinik och i fält (Lundstrom, 2003; Kotin, 2011; Dunbar *et al.*, 2018). För några virala vektorer ansågs det redan finnas tillgängligt men långt ifrån för alla.

Slutsatsen flera författare drog är att virala vektorer kommer att få stor betydelse för sjukdomar där effektiva konventionella behandlingsmetoder saknas (Glikin & Finocchiaro, 2014; Kyriakis, 2015) eller att de kan komma att användas som komplementbehandling mot dessa (Glikin & Finocchiaro, 2014). Cancer som är den största sjukdomsrelaterade dödsorsaken hos sällskapsdjur (Gentshev *et al.*, 2014) och epizootier som saknar effektiva vaccin är några av utmaningarna de står inför (Ferreira *et al.*, 2005; Kyriakis, 2015).

LITTERATURFÖRTECKNING

- Arendt, M., Nasir, L. & Morgan, I.M. (2009). Oncolytic gene therapy for canine cancers: teaching old dog viruses new tricks. *Veterinary and Comparative Oncology*, 7(3): 153–161.
- Babiuk, L.A. & Tikoo, S.K. (2000). Adenoviruses as vectors for delivering vaccines to mucosal surfaces. *Journal of Biotechnology*, 83(1): 105–113.
- Brun, M., Gomez, E. & Suh, J. (2017). Stimulus-responsive viral vectors for controlled delivery of therapeutics. *Journal of Controlled Release*, 267: 80–89.
- Brun, A., Albina, E., Barret, T., Chapman, D., Czub, M., Dixon, L., Günther, K., Klonjkowski, B., Le Potier, M., Libeau, G., Ortego, J., Richardson, J. & Takamtsu, H. (2008). Antigen delivery systems for veterinary vaccine development: Viral-vector based delivery systems. *Vaccine*, 26(51): 6508–6528.
- Cattaneo, R. & Russell, S.J. (2017). How to develop viruses into anticancer weapons. *PLoS Pathogens*, 13(3): e1006190.
- Collins, M. & Thrasher, A. (2015). Gene therapy: progress and predictions. *Proceedings. Biological sciences*, 282(1821): 20143003.
- Coura, R.D.S. & Nardi, N.B. (2007). The state of the art of adeno-associated virus-based vectors in gene therapy. *Virology Journal*, 4(1): 99.
- Chinsangaram, J., Moraes, M., Koster, M. & Grubman, M. (2003). Novel Viral Disease Control Strategy: Adenovirus Expressing Alpha Interferon Rapidly Protects Swine from Foot-and-Mouth Disease. *The Journal of Virology*, 77(2): 1621–1625.
- Draper, S.J & Heeney, J.L. (2009). Viruses as vaccine vectors for infectious diseases and cancer. *Nature Reviews Microbiology*, 8(1): 62–73.
- Danthinne, X. & Imperiale, M.J. (2000). Production of first generation adenovirus vectors: a review. *Gene Therapy*, 7(20): 1707–14.
- Dunbar, C.E., High, K.A., Joung, J.K., Kohn, D.B., Ozawa, K. & Sadelain, M. (2018). Gene therapy comes of age. *Science*, 359(6372): eaan4673.
- Deodato, B., Arsic, N., Zentilin, L., Galeano, M., Santoro, D., Torre, V., Altavilla, D., Valdembri, D., Bussolino, F., Squadrito, F. & Giacca, M. (2002). Recombinant AAV vector encoding human VEGF165 enhances wound healing. *Gene Therapy*, 9(12): 777–85.
- Friedmann, T. (1992). Gene therapy of cancer through restoration of tumor-suppressor functions? *Cancer*, 70(6): 1810–7.
- Ferreira, T.B., Alves, P.M., Aunins, J.G. & Carrondo, M.J.T. (2005). Use of adenoviral vectors as veterinary vaccines. *Gene Therapy*, 12(S1): 73–83.
- Giacca, M. (2010). Introduction to viral vectors. I: Giacca, M. *Gene Therapy*. Milano: Springer-Verlag Italia, 1-7.
- Glikin, G.C. & Finocchiaro, L.M.E. (2014). Clinical Trials of Immunogene Therapy for Spontaneous Tumors in Companion Animals. *PLoS The Scientific World Journal*, 2014:13.
- Gentshev, I., Patil, S.S., Petrov, I., Cappello, J., Adelfinger, M. & Szalay, A.A. (2014). Oncolytic Virotherapy of Canine and Feline Cancer. *Viruses-Basel*, 6(5): 2122–2137.
- Galeano, M., Deodato, B., Altavilla, D., Squadrito, G., Seminara, P., Marini, H., Stagno d'Alcontres, F., Colonna, M., Calò, M., Lo Casio, P., Torre, V., Giacca, M., Venuti, F.S. & Squadrito, F. (2003). Effect of recombinant adeno-associated virus vector-mediated vascular endothelial growth factor gene transfer on wound healing after burn injury. *Critical Care Medicine*, 31(4): 1017-1025.

- Harrop, R., Justin, J. & Miles, C. (2006). Recombinant viral vectors: Cancer vaccines. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(8): 931–947.
- Hu, W.S. & Pathak, V.K. (2000). Design of retroviral vectors and helper cells for gene therapy. *Pharmacological reviews*, 52(4): 493–511.
- Haurigot, V., Jaén, M.L., Rodó, J., Vilà, L., Garcia, M., Elias, I., Maggioni, L., Leon, X., Muñoz, S., Grifoll, I., Callejas, D., Ayuso, E., Ferre, T., Jimenez, V. & Bosch, F. (2016). Long-term correction of diabetes in dogs after single intramuscular administration of adeno-associated viral vectors encoding for insulin and glucokinase. *New Biotechnology*, 33: S11.
- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) (2017). *ICTV Taxonomy history: Small ruminant morbillivirus*. Tillgänglig: https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode_id=20161045 [2018-02-27]
- Jingqi, X. & Ruian, X. (2017). Trends in orally viral vector gene delivery and therapy. I: Andronescu, E. & Grumezescu, AM, *Nanostructures for oral medicine*. Amsterdam: Elsevier science, 123-146.
- Kyriakis, C.S. (2015). Tomorrow's vector vaccines for small ruminants. *Veterinary Microbiology*, 181(1-2): 47–52.
- Kotin, R.M. (2011). Large-scale recombinant adeno-associated virus production. *Human Molecular Genetics*, 20(R1): R2–R6.
- Kay, M.A., Glorioso, J.C. & Naldini, L. (2001). Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nature Medicine*, 7(1): 33–40.
- Kordower, J.H., Bloch, J., Ma, S.Y., Chu, Y., Palfi, S., Rotiberg, B.Z., Emborg, M., Hatraye, P., Déglon, N. & Aebischer, P. (1999). Lentiviral Gene Transfer to the Nonhuman Primate Brain. *Experimental Neurology*, 160(1): 1–16.
- Lundstrom, K. (2003). Latest development in viral vectors for gene therapy. *Trends in Biotechnology*, 21(3): 117–122.
- Lukashev, A. & Zamyatnin, N. (2016). Viral vectors for gene therapy: Current state and clinical perspectives. *Biochemistry (Moscow)*, 81(7): 700–708.
- Liu, T-C. & Kim, D. (2008). Gene therapy progress and prospects cancer: oncolytic viruses. *Gene Therapy*, 15(12): 877–84.
- Merten, O. & Gaillet, B. (2016). Viral vectors for gene therapy and gene modification approaches. *Biochemical Engineering Journal*, 108: 98–115.
- Miller, D.G., Adam, M.A. & Miller, A.D. (1990). Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. *Molecular and Cellular Biology*, 10(8): 4239–4242.
- Matsushita, T., Elliger, S., Elliger, C., Podsakoff, G., Villarreal, L., Kurtzman, G.J., Iwaki, Y. & Colosi, P. (1998). Adeno-associated virus vectors can be efficiently produced without helper virus. *Gene Therapy*, 5(7): 938–945.
- Naldini, L.H., Blömer, U., Gage, F.H., Trono, D. & Verma, I.M. (1996). Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(21): 11382–11388.
- Potter, A., Gerds, V. & Littel-van den Hurk, S. (2008). Veterinary vaccines: alternatives to antibiotics? *. *Animal Health Research Reviews*, 9(2): 187–199.

- Rey-Rico, A. & Cucchiaroni, M. (2016). Controlled release strategies for rAAV-mediated gene delivery. *Acta Biomaterialia*, 29: 1–10.
- Robbins, P., Tahara, H. & Ghivizzani, S. (1998). Viral vectors for gene therapy. *Trends in Biotechnology*, 16(1): 35–40.
- Rodriguez-Lecompte, J.C., Kruth, S., Gyorffy, S., Wan, Y. & Gualdie, J. (2004). Cell-based cancer gene therapy: breaking tolerance or inducing autoimmunity? *Animal Health Research Reviews*, 5(2): 227–234.
- Salama, N., Eddington, N. & Fasano, A. (2006). Tight junction modulation and its relationship to drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(1): 15–28.
- Steegenga, W.T., Van Laar, T., Riteco, N., Mandarino, A., Shvarts, A., Van Der Eb, A.J. & Jochemsen, A.G. (1996). Adenovirus E1A proteins inhibit activation of transcription by p53. *Molecular and Cellular Biology*, 16(5): 2101-2109.
- Thomas, C.E., Ehrhardt, A. & Kay, M.A. (2003). Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nature Reviews Genetics*, 4(5): 346–358.
- Tims, T., Briggs, D.J., Davis, R.D., Moore, S.M., Xiang, Z., Ertl, H.C.J. & Fu, Z.F. (2000). Adult dogs receiving a rabies booster dose with a recombinant adenovirus expressing rabies virus glycoprotein develop high titers of neutralizing antibodies. *Vaccine*, 18(25): 2804–2807.
- Volpers, C. & Kochanek, S. (2004). Adenoviral vectors for gene transfer and therapy. *The Journal of Gene Medicine*, 6: 164–171.
- Wu, N. & Ataai, M. (2000). Production of viral vectors for gene therapy applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 11(2): 205–208.
- Warnock, N., Daigre, J. & Al-Rubeai, M. (2011). Introduction to viral vectors. I: Merten, O. & Al-Rubeai, M. *Viral vectors for gene therapy*. New York: Humana Press c/o Springer Science+Business: 1-25.
- Wu, Z., Yang, H. & Colosi, P. (2009). Effect of Genome Size on AAV Vector Packaging. *Molecular Therapy*, 18(1): 80–6.
- Wahler, R., Russell, S. & Curiel, D. (2007). Engineering targeted viral vectors for gene therapy. *Nature Reviews Genetics*, 8(8): 573–87.
- Wu, X., Li, Y., Crise, B. & Brugges, S.M. (2003). Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science (New York, N.Y.)*, 300(5626): 1749–51.
- Wang, Y., Xiang, Z., Pasquini, S. & Ertl, H.C. (1997). The use of an E1-deleted, replication-defective adenovirus recombinant expressing the rabies virus glycoprotein for early vaccination of mice against rabies virus. *The Journal of Virology*, 71(5): 3677–83.
- Yang, T.C., Dayball, K., Wan, Y.H. & Bramson, J. (2003). Detailed Analysis of the CD8 T-Cell Response following Adenovirus Vaccination. *The Journal of Virology*, 77(24): 13407–13411.
- Zarei, S., Abraham, S., Arrighi, J., Haller, O., Calzascia, T., Walker, P.R., Kündig, T.M., Hauser, C. & Piguet, V. (2004). Lentiviral Transduction of Dendritic Cells Confers Protective Antiviral Immunity In Vivo. *The Journal of Virology*, 78(14): 7843–7845.