

Virusvektorit ja niiden käyttö geeniterapiassa

Suvi Olli

LuK-tutkielma

Biologian tutkinto-ohjelma

Oulun yliopisto

Lokakuu 2021

## Sisällysluettelo

Tiivistelmä	2
1. Johdanto	3
2. Geeniterapia	4
3. Erilaisia virusvektoreita	5
3.1 Lentivirusvektorit	5
3.2 Adenovirusvektorit	7
3.3 Adeno-assosioidut virusvektorit	9
4. Virusvektorien hyödyt	10
5. Virusvektorien käytön haasteet ja niiden ratkaisu	11
5.1 Virusvektoreiden kohdistaminen haluttuihin soluihin	11
5.2 Virusvektoreiden tuotto	14
5.3 Immuunivaste virusvektoreihin	16
5.4 Biologisten esteiden ylitys	17
5.5 Siirtogeenin ekspressoituminen	18
6. Johtopäätökset	19
7. Lähteet	20

## Tiivistelmä

Virusvektorit ovat muokattuja viruksia, joilla voidaan kuljettaa geneettistä informaatiota kohdesoluihin. Suurin osa virusvektoreista pohjautuu lentivirusiin, adenovirusiin tai adeno-assosioituihin viruksiin. Virusvektoreita käytetään hyödyksi muun muassa geeniterapiassa. Geeniterapia on lääketieteellinen hoitomuoto, jonka avulla voidaan esimerkiksi hoitaa geneettisiä sairauksia, ehkäistä sairauksia sekä hoitaa syöpiä. Sekä geeniterapiassa että virusvektoreissa hyödynnetään vahvasti geeniteknisiiä menetelmiä.

Virukset ovat hyvä pohja vektoreille, koska niille on evoluution aikana kehittynyt tehokkaat mekanismit päästä erilaisiin soluihin sekä kuljettamansa geneettisen informaation siirtoon. Virusvektorien käytön geeniterapiassa mahdollistaa se, että erilaisia viruksia voidaan muokata turvallisiksi ja tehokkaiksi vektoreiksi. Virusvektorien käyttöön geeniterapiassa liittyy myös haasteita, kuten virusvektorien kohdennus haluttuihin soluihin, immuunivasteen välttäminen, biologisten esteiden ylitys, siirtogeenin ekspression säätely sekä virusvektorien tuotanto tarpeeksi tehokkaasti.

Tämän tutkielman tavoitteena on perehtyä erilaisiin virusvektoreihin sekä siihen, miten niitä voidaan hyödyntää geeniterapiassa ja mitä haasteita niiden käyttöön liittyy. Virusvektoreiden kolme päätyyppiä eli lentivirusvektorit, adenovirusvektorit ja adeno-assosioidut virusvektorit eroavat paljon toisistaan ja sen takia ne soveltuvat erilaisiin geeniterapian tarkoituksiin. Virusten käyttö vektoreina edellyttää paljon muokkauksia, jotka liittyvät muun muassa edellä mainittuihin niiden käytön haasteisiin. Näitä muokkauksia ovat muun muassa virusgeenien poisto, jolloin on saatu aikaan turvallisia vektoreita, jotka eivät aiheuta vektorin kantamuotona käytetylle virukselle tyypillisiä haittoja ja sairauksia. Muita muokkausmenetelmiä ovat esimerkiksi pseudotyyppaus, jossa virusvektorien kapsidia tai lipidivaippaa muokataan sekä adaptorien ja ligandien lisäys vektoriin.

Tutkielmassa saadut vastaukset virusvektoreista ja niiden hyödynnyksestä geeniterapiassa ovat odotetun kaltaisia. Koska virukset ovat laaja ja moninainen joukko, on odotettavaa, että eri viruksista muokatut vektorit eroavat toisistaan. Myös virusten ja ihmisen evolutiivinen suhde antaa olettaa, että virusten käyttö vektoreina vaatii paljon muokkauksia.

Virusvektorien tutkimus sekä muokkauksen ja tekniikan kehittyminen ovat auttaneet virusvektoreiden käytön haasteiden ratkaisussa ja auttavat myös tulevaisuudessa virusvektorien saamiseksi yleisemmin käytetyksi geeniterapian menetelmäksi.

## 1. Johdanto

Geeniterapia on lääketieteellinen hoitomuoto, jossa hyödynnetään geenitekniikan menetelmiä. Siinä pyritään muokkaamaan solujen geneettistä materiaalia (Jooss & Chirmule, 2000).

Kiinnostus geeniterapiaa ja sen kehitystä kohtaan on kasvanut geenitekniologian kehityksen myötä. Nykyään on mahdollista muokata ja parannella muun muassa viruksia, DNA-jaksoja sekä perimää geenitekniologisilla menetelmillä.

Kun viruksia muokataan geenitekniikan menetelmin, niistä saadaan turvallisia siirtogeenin tai muun geneettisen informaation kuljettajia sen sijaan, että ne infektoisivat ja vahingoittaisivat soluja. Näitä muokattuja viruksia kutsutaan virusvektoreiksi. Vektorit ovat geeniterapian hyödyntämiä geneettisen informaation kuljetusvälineitä. Virusvektoreita on erilaisia, kuten lentivirusvektoreita, adenovirusvektoreita sekä adeno-assosioituja virusvektoreita (Bouard ym., 2009; Waehler ym., 2007). Kaikilla näillä virusvektoreiden päätyypeistä on ominaisuuksia, jotka tekevät niistä eri tarkoituksiin sopivia.

Jotta virusvektoreita voidaan hyödyntää ja kehittää mahdollisimman hyvin toimiviksi, tulee tietää miten eri virustyytit sekä niistä muokatut rekombinanttivirusvektorit toimivat soluissa. On myös tärkeää tietää, kuinka ne pääsevät soluihin ja kuinka ne liikkuvat tumaan soluun päästyään. Osa virusvektoreista siirtää perinnöllisen materiaalinsa isäntäsolun perimään. On tärkeää ymmärtää, kuinka tämä tapahtuu, jotta insertion tekeviä virusvektoreita voidaan hyödyntää tehokkaasti ja turvallisesti.

Virusvektoreita voidaan hyödyntää monella tavalla geeniterapiassa. Niiden käytössä on kuitenkin sekä hyvät puolensa että haasteensa. Näitä haasteita ovat muun muassa virusvektorien muokkaus ja kohdistaminen haluttuihin kohdesoluihin, virusvektorien tuotto sekä immuunivasteen välttäminen virusvektorien käytössä. Näiden lisäksi virusvektorien käytölle on olemassa tiettyjä biologisia esteitä, jotka tulee ylittää. Myös siirtogeenin ekspressoituminen ja ekspression säilyttäminen voivat tuottaa haasteita virusvektorien käytössä (Bouard ym., 2009; Chen & Gonçalves, 2016; Ghosh ym., 2006; Young ym., 2006).

Tämän tutkielman tarkoitus on syventyä virusvektoreihin ja selvittää minkälaisia erilaisia virusvektoreita on olemassa ja miten niitä voidaan hyödyntää geeniterapiassa. Myös virusvektorien parantamiseen muokkauksella sekä niiden käytön haasteisiin perehdytään tässä tutkielmassa.

## 2. Geeniterapia

Geeniterapia on lääketieteellinen hoitomuoto, joka perustuu elävien solujen geneettisen materiaalin muokkaukseen (Jooss & Chirmule, 2000). Geeniterapian tarkoituksena on kuljettaa kohdesoluihin geneettistä informaatiota, joka korvaa viallisen toiminnon, aikaansaa uuden toiminnon tai ehkäisee sairauksia ja tauteja. Kun korvataan viallisia toimintoja, on usein kyse monogeenisen eli yhden geenin aiheuttaman sairauden hoidosta. Kun halutaan aikaansaada uusi toiminto, on yleensä kyse syöpien hoidosta tai monogeenisten sairauksien hoidosta. Sairauksia ja tauteja ehkäistäessä geeniterapian keinoin, on kyseessä geeniterapeuttisten rokotteiden käyttö (Bouard ym., 2009; Young ym., 2006).

Geeniterapian käyttö on yleisintä, kun kyseessä on harvinainen monogeeninen sairaus, jolloin villityypin geenin palauttaminen on ainoa järkevä hoitomuoto. Tällöin toimivaa geeniä koodaava DNA-jakso siirretään kohdesoluun, jossa se voi olla endogeenisessä muodossa tai liitettynä kohdesolun genomiin. Jos siirtogeeni liitetään kohdesolun genomiin, sillä voidaan korvata toimimaton geeni tai se voi olla toimimattoman geenin lisäksi genomissa. Siirretty geeni alkaa koodata puuttuvaa geenituotetta potilaaseen. Geeniterapiassa terapeuttiset geenit saadaan soluihin joko *ex vivo* - tai *in vivo* -menetelmillä. *Ex vivo* -geeniterapiassa kohdesoluja poistetaan potilaasta, jonka jälkeen terapeuttinen geeni siirretään soluihin. Tämän jälkeen solut palautetaan potilaaseen. *In vivo* -geeniterapiassa valittu geeni täytyy kuljettaa kohdesoluihin koko organismin sisällä (Bouard ym., 2009; Young ym., 2006).

Geeniterapiassa, erityisesti *in vivo* -geeniterapiassa, on tärkeä välttää vaikutukset muihin kuin kohdesoluihin, jotta saadaan mahdollisimman suuret terapeuttiset hyödyt ja mahdollisimman vähäiset haitat. *In vivo* -menetelmiä käytettäessä ovat geeniterapian paikalliset sovellutukset hyödyllisiä esimerkiksi, jos kohteena on jokin kokonainen elin tai kasvain. Tällöin voidaan terapeuttiset geenit siirtää valitulla tavalla suoraan kohdentaen elimeen tai kasvaimeen (Waehler ym., 2007).

Jotta terapeuttisia siirtogenejä sekä muita geneettisen informaation muotoja voidaan siirtää kohdesoluihin, tarvitaan vektoreita. Nämä vektorit toimivat geneettisen materiaalin kuljettajina. Yksi vektorivaihtoehto on ei-viruspohjaiset vektorit. Nämä vektorit sisältävät paljasta DNA:ta, joka saadaan soluihin injektoimalla tai liposomien ja nanopartikkelien kuljettamana. Näillä menetelmillä ei olla saatu aikaan tehokasta terapeuttisen geenin siirtoa (Verma & Weitzman, 2005). Toinen vektorivaihtoehto ovat virusvektorit. Virusvektorin valinta eri viruksiin pohjautuvista vektoreista riippuu kohdesolusta, halutun siirtogeenin

koosta sekä toivotusta geeniekspression pituudesta (Young ym., 2006). Virusvektorien käytössä on sekä haasteita että etuja.

### 3. Erilaisia virusvektoreita

Virusvektoreita on kolmea päätyyppiä, joita on tutkittu ja käytetty eniten. Nämä päätyypit ovat lentivirusvektorit, adenovirusvektorit sekä adeno-assosioidut virusvektorit.

#### 3.1 Lentivirusvektorit

Waehler kollegoineen (2007) sekä Milone ja O'Doherty (2018) kuvailevat lentiviruksia artikkeleissaan retroviruksiin kuuluviksi viruksiksi, joilla on noin 9000 emäsparin mittainen RNA genomi. Lentivirusten genomi käännetään infektoiduissa soluissa DNA:ksi virusgeenien koodaaman transkriptaasi-entsyymien toimesta. Lentivirusten genomi on kapsidin ja retroviruksille tyypillisen lipidivaipan suojaama. Lentiviruksilla on retroviruksille tyypillinen elinkierto, joka alkaa siitä, että virus pääsee soluun joko suoraan lipidivaipan ja solukalvon fuusiolla tai reseptorivälitteisen endosytoosin kautta. Reseptorivälitteisessä endosytoosissa viruksen vaipan glykoproteiinit sitoutuvat niille sopiviin reseptoreihin solun pinnalla. Solun sisälle pääsyä seuraa viruksen nukleokapsidin vapautuminen sytoplasmaan. Kun viruksen nukleokapsidi eli genomia suojaava proteiinkuori on päässyt sytoplasmaan, useat nukleokapsidin virusproteiinit irtoavat vapauttaen RNA-genomin. Tämän jälkeen RNA käännetään kaksijuosteiseksi DNA:ksi käänteiskopioinnilla. Jotta tämä DNA pystyisi kulkeutumaan tumaan ja integroitumaan isäntäsolun genomiin, se muodostaa kompleksin viruksen proteiinien kanssa. Lentivirukset liittävätkin genominsa yleensä isäntäsolun genomiin transkriptionaalisten yksiköiden alueelle. Lentivirukset käyttävät isäntäsolun solukoneistoja transkription ja translaation suorittamiseksi. Kun viruksen osat on saatu valmiiksi, virukset kootaan ja ne vapautuvat solusta (Milone & O'doherty, 2018; Waehler ym., 2007).

Kun lentiviruksista tehdään vektoreita, ne johdetaan yleensä HI-viruksista (human immunodeficiency virus), jolloin ne voivat kuljettaa ja ekspressoida siirtogeneejä useissa erilaisissa jakautuvissa sekä jakautumattomissa soluissa. Lentivirusvektoreiden pohjana käytetään yleensä HI-viruksia sen takia, että ne ovat kehittyneet evoluution aikana transduktoimaan tehokkaasti ihmisten soluja ja niitä voidaan muokata helposti.

Lentivirusvektorit pystyvät tehokkaasti transduktoimaan aivojen, maksan, lihaksien ja verkkokalvon soluja ilman myrkyllisyyttä tai immuunivasteita. Ne voivat myös transduktoida hematopoieettisia kantasoluja vaikuttamatta niiden jakautumiskykyyn (Kafri ym., 2000;

Milone & O'doherty, 2018). Lentivirusvektorit voivat kuljettaa suuria cDNA pätkiä kohdesoluihin ja aiheuttaa niiden ekspression, mikä on geeniterapian kannalta hyödyllistä (Kafri ym., 2000).

Koska lentivirusvektorit voivat sisällyttää genominsa isäntäsolun genomiin, ne voivat aikaansaada pitkäaikaisen terapeuttisen siirtogeenin ekspression. Toisaalta viruksen kantaman genomien sisällyttämisessä isäntäsolun genomiin on mahdollisuus insertionaaliselle mutageneesille (eng. insertional mutagenesis). Tämä tarkoittaa sitä, että insertiossa eli vaiheessa, jossa geeni lisätään genomiin, tapahtuu mutaatio. Insertionaalinen mutageneesi voi johtaa haittavaikutuksiin, kuten syöpäsolujen kehitykseen, jos mutaatio tapahtuu kriittiselle alueelle (Nayak & Herzog, 2010). Virusgenomin insertio voi myös tapahtua ei-toivotulle alueelle genomissa, jolloin sitä ei aleta ekspressoida tai se aiheuttaa haittavaikutuksia. Lentivirusvektorin genomi voi myös joutua epigeneettisen hiljennyksen kohteeksi tai niihin voi kohdistua ei-homologisen rekombinaation kaltaisia ei-toivottuja rekombinaatioita. Tämä voi johtaa ei-toivottuihin tuloksiin sekä aiheuttaa haittavaikutuksia. Ei-toivotuissa rekombinaatioissa siirtogeenit jäävät kohdealueensa ulkopuolelle tai muodostavat ei-toivottuja DNA-rakenteita, joissa on sekä kohde- että ei-kohdesekvenssejä. Edellä kuvattuja haittavaikutuksia voidaan estää poistamalla lentivirusvektorin insertiomekanismi, jolloin vektorigenomi jää episomaaliseen muotoon eli isäntäsolun genomista erilleen. Nämä episomaalisissa muodossa olevat vektorigenomit eivät yleensä replikoidu, mutta ne voivat toimia soluissa nukleinihappotemplaateina. Nukleinihappotemplaattit osallistuvat geenien kohdentamiseen sekä voivat tilapäisesti ekspressoida siirtogenejä (Bouard ym., 2009; Chen & Gonçalves, 2016).

Lentivirusvektoreita on kehitetty jo useampia sukupolvia. Ensimmäisen sukupolven vektorit sisälsivät suuren osan HI-viruksen genomista, mutta niiden vaipparakenteisiin sisällytettiin muiden viruksien vaippaproteiineja. Näitä olivat esimerkiksi proteiini, jonka johdosta vektori pystyi sitoutumaan LDL (low-density lipoprotein) reseptoriin, joita on kaikkialla kehossa. Tämä mahdollisti vektorin pääsyn suurempaan joukkoon soluja. Toisen sukupolven lentivirusvektoreista poistettiin lisävirulenssitekijöitä, joita oli ensimmäisen sukupolven vektoreissa. Näin saatiin aikaan turvallisempia vektoreita. Kolmannen sukupolven vektoreissa turvallisuutta parannettiin entisestään jakamalla virusgenomi useampaan plasmidiin, jolloin väärin rekombinantivirusten tuotto olisi epätodennäköisempää ja kaikki virusvektorit olisivat toivotulla tavalla toimivia. Näistä vektoreista saatiin turvallisempia myös poistamalla niistä tietty osa virusgenomin 3'LTR:stä eli pitkästä päätetoistojaksosta (eng. long terminal

repeat), jolloin saatiin itsestään inaktivoituvia vektoreita. LTR:stä poistettu osa sisältää muun muassa transkriptiotekijöiden sitoutumiskohtia. Kun virusgenomi käänneiskopioidaan, siirtyy deleetio myös 5'LTR:ään. Tällöin vektori inaktivoituu itsestään, koska provirukset eivät kykene transkriptoimaan itseään LTR:ien deleetioiden takia ja siten proviruksista ei tule valmiita toimivia viruksia. Kolmannen sukupolven vektorien geeniekspressiota pystyttiin lisäämään liittämällä rakenteeltaan aktiivinen promoottori siirtogeenin sisältävän jakson LTR:n ylävirtaan, jolloin siirtogeenin transkriptio lisääntyy (Milone & O'doherty, 2018).

Lentivirusvektorit ovat hyviä ehdokkaita ihmisten geeniterapiaan, koska niistä on pystytty kehittämään paljon turvallisempia ja ne voivat transduktoida tehokkaasti jakautuvia, ei-jakautuvia sekä hitaasti jakautuvia soluja. Tämä mahdollistaa niiden hyödynnyksen muun muassa syöpien ja primääristen immuunipuutosten hoidossa sekä T-solujen muokkauksessa. Niitä voidaan käyttää sekä *in vivo* - että *ex vivo* -menetelmissä (Kafri ym., 2000; Milone & O'doherty, 2018).

### 3.2 Adenovirusvektorit

Adenovirukset ovat DNA viruksia, joiden genomi on serotyypistä riippuen noin 26000–45000 emäsparia pitkä (Young ym., 2006). Adenovirusten genomi on lineaarinen kaksoisjuosteinen DNA-genomi, johon kuuluu adenoviruksille tyypilliset 103 emäsparin pituiset ITR:t eli käännteiset terminaaliset toistojaksot (eng. inverted terminal repeat) kummassakin päässä genomia. Adenoviruksilla ei ole lipidivaippaa retrovirusten tapaan. Niiden kapsidi on 60–90 nm halkaisijaltaan ja muodoltaan ikosaedrisen symmetrinen, koostuen 252 kapsomeerista. Näistä kapsomeereista 240 on heksonia ja 12 pentonia. Kapsidin jokaisen pentonin keskeltä tulee ulospäin ohut trimeerinen glykoproteiinisäie, joka päättyy sipulimaiseen nuppiin (Ghosh ym., 2006).

Ghosh kollegoineen (2006) kuvaa adenovirusten elinkiertoa seuraavasti. Adenovirusten kapsidien sipulimaiset nupit ovat suuressa roolissa virusten sekä solujen reaktioissa ja tunnistuksessa. Reaktiot solujen kanssa saavat alkunsa sipulimaisten nuppien sitoutuessa isäntäsolun Cocksackie-molekyyleihin sekä adenovirusreseptoreihin. Tästä seuraa adenoviruksen soluun sisäänoton aloitus. Tämän reaktiosarjan ko-reseptorina toimivat  $\alpha_v$  integriini, joka auttaa endosytoosissa klatriinipäällysteisiin vesikkeleihin sekä heparaanisulfaattiglykosaminoglykaani-reseptori, joka auttaa adenovirusten tunnistamisessa sekä sitoutumisessa. Solun sisälle päästyään viruksen ydin vapautuu sekä viruksesta että virusta kuljettaneesta vesikkelistä ja kulkeutuu tumaan, missä DNA:n replikaatio ja



transkriptio tapahtuvat. Lopulta solu tuottaa virioneja, jotka vapautuvat solun hajoamisen yhteydessä. Solun mikrotubulit kuljettavat virusgenomin tuman solukalvolle, jossa se sitoutuu tuman solukalvoon ja siirtyy tuman sisälle tumahuokosten kompleksien kautta (Jooss & Chirmule, 2003).

Adenovirusvektoreiden genomi on isäntäsolussa episomaalinen eli se ei integroidu osaksi isäntäsolun genomia (Bouard ym., 2009). Kun adenoviruksista tehdään vektoreita, käytetään yleensä ihmisten adenoviruksen serotyyppejä 2 tai 5 pohjana. Niiden genomista poistetaan virusgeenejä, jolloin saadaan aikaan replikaatioon kykenemättömiä turvallisia vektoreita. Vektoreissa haluttu siirtogeeni liitetään adenoviruksille ominaisten ITR:ien väliselle alueelle (Ghosh ym., 2006). Adenovirusvektoreihin voidaan liittää pitkiä jopa 37000 emäsparin pituisia siirtogeeniä (Young ym., 2006). Adenovirusvektoreista on ehditty kehittää useita sukupolvia. Ensimmäisen sukupolven vektorit oli helppo valmistaa ja ne tuottivat paljon haluttua geenituotetta, mutta geeniekspressio oli lyhytaikaista. Toisen sukupolven vektorit saavat aikaan pidempiaikaisen ekspresion, jota voidaan säädellä. Uuden sukupolven adenovirusvektoreista on saatu tehokkaampia reunustamalla siirtogeeni kummastakin päästä monistetuille ITR:illä. Nämä vektorit eivät myöskään ole sytotoksisia, sillä ne eivät ekspresoi yhtään virusproteiinia (Ghosh ym., 2006).

Adenovirukset ovat hyviä vektoreita, koska niiden pakkauskapasiteetti on suuri, siirtogeenin sisältävät rekombinanttivektorit ovat stabiileja ja ne voivat transduktoida suuren joukon sekä jakautuvia että ei-jakautuvia soluja. Myös niiden geeniekspressiotaso on korkea, ne eivät ole onkogeenisia ja niiden geenikohdentaminen on tarkkaa, koska se perustuu homologiaan (Chen & Gonçalves, 2016; Ghosh ym., 2006; Nayak & Herzog, 2010). Adenovirusten käytössä vektoreina on myös haasteensa, kuten se että siirtogeenin ekspresio ei ole pitkäaikaista ja solujen immuunivaste on korkea suurille vektoriannoksille (Ghosh ym., 2006). Nayakin ja Herzogin artikkelin (2010) mukaan immuunivaste kohdistuu virusvektorien kapsidiin, kaksoisjuosteiseen DNA:han, virusproteiineihin sekä siirtogeeniin itseensä. Heidän mukaansa jopa 90 % vektori-DNA:sta on tuhottu elimistön toimesta 24 tunnin sisällä suonensisäisesti annetuista vektoreista.

Adenovirusvektoreilla on useita käyttökohteita. Niitä käytetään esimerkiksi maksan geeniterapiaan sekä perinnöllisissä että hankituissa maksasairauksissa, kuten maksakirroosin, hepatiitti B:n ja C:n sekä malarian hoidossa. Adenovirusvektoreita käytetään myös itsemurhageeniterapia eli aihiolääkehoidossa syövässä. Tämä hoitomuoto johtaa syöpäsolujen

solukuolemaan. Niitä käytetään myös pienten häiritsevien RNA-jaksojen (eng. small interfering RNA, siRNA) kuljettamisessa soluihin, joka johtaa homologiasta riippuvaan lähetti-RNA:n hajotukseen, jolloin tiettyä proteiinia ei enää tuoteta. Adenovirusvektoreita hyödynnetään myös vektoreina kantasoluille sekä rekombinantti rokotteissa, koska ne ovat tehokkaita käynnistämään immuunisuojausta useita patogeenejä vastaan (Ghosh ym., 2006).

### 3.3 Adeno-assosioidut virusvektorit

Adeno-assosioidut virukset eli AA-virukset ovat pieniä viruksia, joilla on noin 4700 emäsparia pitkä yksijuosteinen DNA genomi. Genomin kummassakin päässä on ITR:t, joissa on AA-viruksille ominaisesti itsestään komplementaariset CG-rikkaat alueet, jotka johtavat stabiiliin T-hiuspinnirakenteeseen (Ding ym., 2005). AA-viruksissa ei adenovirusten tapaan ole integraatiokoneistoa, joten niiden genomi yleensä pysyy isäntäsolun tumassa episomaalisessa muodossa. Osa genomista voi kuitenkin tulla liitetyksi isäntäsolun genomiin useimmin satunnaisten kromosomaalisten kaksoisjuostekatkosten ei-homologisen rekombinaation kautta (Chen & Gonçalves, 2016). Vektorigenomista noin 90 % jää isäntäsoluissa episomaaliseen muotoon ja noin 10 % integroituu isäntäsolun genomiin (Bouard ym., 2009).

Ding kollegoineen (2005) kuvaa AA-virusten elinkiertoa seuraavalla tavalla. AA-virusten infektio alkaa solukalvon kiinnittymisreseptoreihin sekä ko-reseptoreihin sitoutumisesta, joka johtaa endosytoosiin soluun. Virukset kulkevat soluun vesikkeleissä, joista ne pakenevat ja kulkeutuvat tumaan. Tumassa niiden yksijuosteisesta DNA:sta tehdään kaksijuosteista DNA:ta, jonka mukaan solu valmistaa lisää viruksia. Eri serotyypin virukset poistuvat vesikkeleistä eri vaiheissa kulkeutumisessa tumaan, kuitenkin ennen tumaan sisälle pääsyä. Vesikkeleistä poistumiseen vaikuttaa vesikkelin ympäristön happamuus sekä fosfolipaasiaktiivisuus. Useat kapsidiproteiinit ovat osallisena hepariinisitoutumisessa, joka johtaa endosytoosiin (Waehler ym., 2007; Young ym., 2006). Tässä hepariinisitoutumisessa ensin virus sitoutuu hepariinisulfaattiproteglykaaniin (HSPG) ja sitten usein sen ko-reseptoriin, joka on joko  $\alpha_v\beta_5$ -integroini tai fibroblastin kasvutekijä 1-reseptori.

Kun AA-viruksista kehitetään vektoreita, niistä poistetaan melkein kaikki virusgenomin osat jättäen jäljelle vain ITR:t, jolloin siirtogeeni voi olla jopa 4900 emäsparia pitkä (Young ym., 2006). T-hiuspinnirakenne, jonka muodostuksesta ITR:ien CG-rikkaat jaksot vastaavat, on ainoa välttämätön viruskomponentti siirtogeenin sisältävissä rekombinanttivektoreiden genomissa (Ding ym., 2005). Vektorigenomi jää yleensä episomaaliseksi ja muodostaa

sirkulaarisia rakenteita liittämällä lineaarisen genominsa päät yhteen. Vektorigenomit voivat isäntäsoluissa vaihdella lineaarisen ja sirkulaarisen muodon välillä. Koska AA-virusvektorit pystyvät muodostamaan sirkulaarisia rakenteita, voidaan siirtogeenit jakaa kahteen vektoriin, jotka isäntäsolussa yhdistyvät yhtenäiseksi DNA renkaaksi päiden rekombinaatiolla (Young ym., 2006).

AA-virusvektoreiden siirtogeenin ekspressio on keskipitkä- tai pitkävaikutteinen (Bouard ym., 2009). AA-viruksia on useita serotyyppejä, joista kahdeksaa käytetään rekombinanttivektoreina. Näillä serotyypeillä on sama genomien perusrakenne, mutta erilaiset kyvyt infektoida eri soluja ja kudostyyppejä. Tämä perustuu solukalvoreseptorien viruskapsidiproteiinien tunnistukseen (Ding ym., 2005). Yksi AA-virusvektorien eduista on kyky transduktoida laajaa joukkoa erilaisia sekä jakautuvia että ei-jakautuvia soluja. Muita AA-virusvektoreiden etuja ovat alhainen synnynnäinen immuniteetti sekä alhainen antigeenejä esittelevien solujen (eng. antigen-presenting cell APC) transduktio sekä tropismin muokkauksen helppous (Chen & Gonçalves, 2016; Nayak & Herzog, 2010). Niiden etuja ovat myös se, että ne mahdollistavat ei-toksisten post-mitoottisten solujen transduktion sekä pitkäaikaisen geeniekspression neuroneissa (Betley & Sternson, 2011).

AA-virusvektoreita käytetään hermopiirien kartoituksessa, seurannassa sekä manipuloinnissa (Betley & Sternson, 2011). Niitä käytetään myös keskushermoston sairauksien hoidossa, koska niiden kyky transduktoida hermosoluja on hyvä (Nayak & Herzog, 2010).

#### 4. Virusvektorien hyödyt

Virusvektoreiden käytössä on muihin vektoreihin nähden vähemmän esteitä, koska viruksille on evoluution aikana kehittynyt tehokkaat geeninsiirtomekanismit sekä kyky infektoida ja transduktoida suurta joukkoa erilaisia soluja, kudoksia ja isäntälajeja. Virusvektoreita on niiden laajojen ominaisuuksien lisäksi mahdollista muokata geeniteknisin menetelmin, jotta niistä saadaan mahdollisimman turvallisia ja jotta niitä saadaan kohdennettua tiettyihin soluihin (Waehler ym., 2007). Viruksista on mahdollista poistaa geenejä ja lisätä haluttuja siirtogenejä, jotka virustyyppistä riippuen siirtyvät isäntäsoluun episodiseen muotoon tai isäntäsolun genomiin integroituna ja tuottavat haluttua geenituotetta. Kun poistetaan tietyt geenit virusgenomista, saadaan aikaan replikaatioon kykenemättömiä virusvektoreita, jotka eivät tapa isäntäsoluun ja levitäydy muihin kuin kohteena oleviin soluihin. Näin ollen niistä

saadaan turvallisempia, ilman että on menetetty niiden tehokkaat mekanismit solun sisälle pääsyyn ja geenin siirtoon (Chen & Gonçalves, 2016).

Virusvektorit ovat geenisiirron lisäksi hyviä aiheuttamaan immuunivasteen, minkä vuoksi niitä voidaan käyttää hyödyksi terapeuttisissa rokotteissa (Ghosh ym., 2006). Tämän lisäksi virusvektoreita voidaan hyödyntää laajasti syöpien geeniterapeuttisessa hoidossa. Syöpiä hoidettaessa virusvektoreiden avulla, hyödynnetään niiden kykyä replikoitua ja hajottaa isäntäsolu. Kun virusvektorit muokataan infektoimaan vain syöpäsoluja, on mahdollista niiden avulla hajottaa suuriakin kasvaimia. Syöpien hoito on mahdollista virusvektorien avulla myös toisella tavalla. Tässä menetelmässä viruksista tehdään replikaatiokyvyttömiä, niihin siirretään niin sanottu itsemurhaproteiini-geeni ja ne muokataan infektoimaan vain syöpäsoluja. Kun tällaisia virusvektoreita annetaan potilaalle, ne infektoivat syöpäsoluja ja itsemurhaproteiinin ekspressio alkaa. Tämän seurauksena syöpäsolut kuolevat joko suoraan proteiinin vaikutuksesta tai sen aloittamasta immuunivasteesta. On olemassa myös kolmas menetelmä virusvektorien hyödyntämiseen syöpien hoidossa. Viruksia voidaan muokata infektoimaan syöpäsoluja sekä siirtämään niihin siirtogeneeni, josta ekspressoituu soluissa aihiolääkkeenä toimiva entsyymi. Tämä entsyymi muokkautuu elimistössä sytotoksiseksi lääkkeeksi, joka tappaa syöpäsolun sekä voi aiheuttaa myös isäntäsolun viereisten syöpäsolujen solukuoleman. Geeniterapian ja virusvektoreiden kliinisistä tutkimuksista suuri osa kohdistuu syöpien hoitoon, sillä virusvektoreilla on mahdollista minimoida terveille soluille koituvat haittavaikutukset ja kohdentaa hoito vain syöpäsoluihin (Young ym., 2006).

## 5. Virusvektorien käytön haasteet ja niiden ratkaisu

Virusvektorien käyttöön liittyy hyötyjen lisäksi myös haasteita. Näitä haasteita ovat virusvektorien kohdistaminen haluttuihin soluihin, virusvektorien tuotto suuressa mittakaavassa, immuunivaste, biologisten esteiden ylitys sekä siirtogeenin ekspression säätely. Näihin haasteisiin on kehitetty useita ratkaisuja.

### 5.1 Virusvektorien kohdistaminen haluttuihin soluihin

Geeniterapian *ex vivo* -menetelmiä käytettäessä ei ole ongelmaa virusvektorien kohdistamisessa, koska hoidettavat solut ovat erillään muista soluista. *In vivo* -menetelmiä käytettäessä on kuitenkin tärkeää saada vektorit transduktoimaan vain haluttuja soluja sekä kulkeutumaan näiden solujen luo, sillä kohdesolut ovat elimistössä muiden solujen joukossa (Bouard ym., 2009). Viruksilla on laaja kirjo erilaisia soluja, mitä ne voivat infektoida, mutta

virusvektoreita valmistettaessa voidaan niitä muokata siten, että ne infektoivat luonnollisen isäntäsolujoukkonsa ulkopuolisia soluja. Ne voidaan myös muokata infektoimaan hyvin rajattua solujoukkoa (Waehler ym., 2007). Virusvektoreita voidaan muokata pseudotyyppauksella, promoottoreilla, risteävillä geneettisillä katkaisijoilla, adaptoreilla, kohdistavilla ligandeilla sekä sinkkisorminukleaaseilla. On myös mahdollista yhdistää useampia näistä keinoista samaan vektoriin (Bouard ym., 2009; Chen & Gonçalves, 2016; Waehler ym., 2007).

Pseudotyyppaus on yksi keino kohdistaa virusvektorit haluttuihin kohdesoluihin. Tässä menetelmässä viruksia muokataan vaihtamalla lähisukuisten virusten kapsidiproteiineja sekä lipidivaipan glykoproteiineja keskenään tai vaihtamalla koko kapsidi lähisukuisten virusten kesken. Näin ollen saadaan virusvektorille uusi tropismi, mutta sen kyky siirtää isäntäsoluun geneettistä informaatiota ei kärsi. Pseudotyyppaus voidaan teknisesti hoitaa kahdella tavalla. Se voidaan suorittaa joko kahdella plasmidilla, joista toinen koodaa tropismia muuttavaa tekijää ja toinen muita vektorikomponentteja tai uuden tropismin antavan tekijän geeni voidaan geneettisesti liittää virusgenomiin. Adenovirusvektoreilla käytetään enemmän suoraa liittämistä virusgenomiin ja AA-virusvektoreilla sekä lentivirusvektoreilla suositaan enemmän kahden plasmidin menetelmää. Lentiviruksilla muokataan lipidivaipan proteiineja, kun taas adenoviruksilla sekä AA-viruksilla muokataan kapsidia (Waehler ym., 2007).

Pseudotyyppauksella voidaan myös välttää immuunivaste virusvektorille, koska vasta-aineet ja kehon immuunipuolustuksesta vastaavat solut eivät välttämättä tunnista muokattua kapsidia tai lipidivaippaa. Myös jos koko kapsidi on vaihdettu sellaisen viruksen kapsidiin, joka ei tyyppillisesti esiinny elimistössä, voi virusvektori ohittaa kehon immuunipuolustuksen (Chen & Gonçalves, 2016).

Toinen kohdistamiskeino on tiettyjen promoottorien käyttö. Kun valitaan sopiviksi promoottoreiksi vain ne, joita on kohdesoluissa, ei muissa soluissa ekspressoida virusvektorien kuljettamia terapeuttisia geenejä. Tämä menetelmä voi vähentää tai jopa eliminoida mahdolliset itse siirtogeenin toksiset sivuvaikutukset. Mutta se ei vähennä sivuvaikutuksia, jotka johtuvat vektoripartikkelien väärästä lokalisoinnista. Se ei myöskään yksinään riitä varmistamaan geeniekspressiota kohdesolussa, mikä vaatii myös riittävän määrän terapeuttista nukleinihappoa oikeissa soluissa (Chen & Gonçalves, 2016).

Risteävät geneettiset katkaisijat (eng. intersectional genetic switches) ovat valikoivasti ekspressoiva geneettinen komponentti, jota voidaan hyödyntää virusvektorien

kohdistamisessa. Näitä käytetään yhdessä promoottorien kanssa. Usein vektoreita suunniteltaessa valitut promoottorit eivät toimi ilman risteäviä geneettisiä katkaisijoita, joten kun virusvektoriin liitetään nämä molemmat tekijät, saadaan aikaan voimakkaasti vain tiettyyn solujoukkoon kohdistuvia virusvektoreita (Chen & Gonçalves, 2016).

Myös erilaisilla adaptoreilla voidaan virusvektorit kohdistaa haluttuihin kohdesoluihin. Adaptorit ovat molekyyliä, joilla on kaksoisspesifisyys eli yksi pää adaptorista sitoutuu viruksen kiinnittymisproteiineihin ja toinen pää sitoutuu kohdesolun reseptoriin. Näin saadaan kiinnittymisproteiini ja reseptori sitoutumaan toisiinsa, vaikka ne eivät ole toisiinsa sopivat. Tällä menetelmällä on suuret hyödyt, koska sillä saavutetaan joustavuutta, kun useammanlaisia adaptoreita voidaan liittää samaan vektoriin. Tämä menetelmä ei myöskään vaadi itse vektorin geneettistä muokkausta, koska adaptorit sitoutuvat viruksen kiinnittymisproteiineihin ilman että vektoreita tarvitsee muokata. Useimmat adaptorit kykenevät saavuttamaan kaksi kohdennetun toimituksen päätavoitetta, jotka ovat luonnollisen tropismin muokkaus ja haluttuun kohteeseen kohdistuvan uudenlaisen tropismin lisäys. Adaptoreihin liittyy kuitenkin riski sen irtoamisesta vektorista (Chen & Gonçalves, 2016).

Adaptoreita on useanlaisia. Reseptori-ligandi-kompleksit ovat tärkeä adaptoriluokka, jossa virusreseptorit on liitetty kohdesolun ekspressoiman reseptorin ligandiin. Kemiallinen konjugaatio on adaptoriluokka, jossa adaptoriligandi on kovalenttisesti liitetty vektoreihin. Myös monoklonaalaisia vasta-aineita on mahdollista käyttää adaptoreina. Tällöin vasta-ainespesifisyys sitoo vektorin kohdesolun reseptoriin (Chen & Gonçalves, 2016).

Kohdistavat ligandit (eng. targeting ligands) ovat vaihtoehto adaptorien käytölle. Kohdistavat ligandit ovat adaptorien tapaan vektorin pinnalle liitettäviä molekyyliä, jotka kohdistavat vektorit haluttuihin kohdesoluihin. Ligandien geneettinen fuusio kapsidin tai lipidivaipan proteiineihin tuottaa yksittäisen virionin, joka tunnistaa kohdesolun. Näitä on vaikeampi tuottaa kuin adaptoreita, mutta kohdistavilla ligandeilla varustetut vektorit ovat tehokkaampia ja näin saadaan aikaan homogeeninen uudelleen ohjattu vektoripartikkeli. Kohdistavia ligandeja on erityyppisiä. On olemassa polypeptidiligandeja, jotka tuottavat virusvektoreille uuden ja todella spesifisen tropismin soluille, jotka ekspressoivat kohdeantigeeniä. Näiden lisäksi on olemassa pieniä peptidiligandeja, jotka myös tunnistavat kohdeantigeenin (Chen & Gonçalves, 2016).

Suurten polypeptidien lisäys voi olla haitallista virusvektorin rakenteelle eikä ligandien liittyminen kohdeantigeeniin välttämättä johda soluun pääsyyn. Kohdennettujen ligandien

liittäminen voi heikentää infektoivuutta, koska virusten kiinnittymisproteiinien normaalit toiminnat on muutettu. Tämä voi johtaa viruksen ohjaukseen ei-toimivalle sisäänpääsyreaktiotielle joko steerisesti blokkamalla viruksen ja luonnollisen reseptorin vuorovaikutus tai estämällä konformaationaaliset muutokset, joita vaaditaan toimivan fuusion aloittamiseen. Kohdentavia ligandeja voidaan kuitenkin hyödyntää myös siten, että kohdistetaan niiden avulla vektoreita soluihin, joita ei haluta joutuvan vaikutuksen alaiseksi. Koska virukset eivät pääse näihin soluihin sisälle kohdentavien ligandien takia, säästävät ne vektorien vaikutuksilta. Näin on mahdollista vähentää ei-toivottuja vaikutuksia kohdesolujen joukon ulkopuolisiin soluihin. Pienet peptidiligandit eivät häiritse viruksen kiinnittymisproteiinien toimintaa yhtä todennäköisesti, mikä mahdollistaa niiden liittämisen useisiin alueisiin virusvektorin pinnalla. Näin ollen niillä voidaan muuttaa vektorin kohdistusta merkittävästi (Chen & Gonçalves, 2016).

Virusvektoreita voidaan kohdistaa myös sinkkisorminukleaaseilla (eng. zinc finger nucleases). Näitä käytettäessä voidaan vektori kohdistaa tiettyyn kohtaan isäntäsolun genomia. Tätä menetelmää on mahdollista käyttää esimerkiksi lentiviruksilla, jotka liittävät kantamansa terapeuttisen geneettisen materiaalin isäntäsolun genomiin. Kohdistettaessa insertio tiettyyn kohtaan isäntäsolun genomia, voidaan välttyä ei-toivotuilta vaikutuksilta, kuten isäntäsolun tärkeiden geenien tai siirtogeenin toiminnan loppumiselta. Sinkkisorminukleaasit näin ollen myös tekevät vektoreista turvallisempia (Milone & O'doherty, 2018).

## 5.2 Virusvektoreiden tuotto suuressa mittakaavassa

Virusvektoreita tuotetaan tuotantosolulinjoissa, joissa solut replikoivat vektorigenomia, tuottavat muut tarvittavat virusvektoripartikkelit ja pakkaavat valmiit vektorit.

Virusvektoreiden tuotanto suuressa mittakaavassa, siten että vektorien toimivuus ja laatu voitaisiin taata, on vielä kuitenkin vaikeaa. Vektoreiden toimintaan ja laatuun vaikuttavat muun muassa auttajavirusten ja niiden rakenteiden rekombinoituminen virusvektoreihin (Bouard ym., 2009).

Osa virusvektoreista tarvitsee tuotannossaan auttajaviruksia, koska ne eivät tuota kaikkia tarvittavia proteiineja virus-DNA:n replikaation aloitukseen ja virusvektorien pakkaukseen. Tällaisia vektoreita ovat muun muassa adenovirusvektorit. Auttajavirusten käytössä on kuitenkin haasteena vektoreiden kontaminoituminen auttajaviruksilla. Tätä ongelmaa on pyritty ratkaisemaan tekemällä auttajaviruksista replikaation kykenemättömiä, jolloin

kontaminaatiota voidaan vähentää. Tämä menetelmä ei kuitenkaan poista kontaminoivien partikkelien olemassaoloa, mikä asettaa rajoitteita menetelmän käytölle. Toinen vaihtoehto on käyttää auttajaplasmeideja, jotka koodaavat vain tarvittavat lisägenit. Tämä menetelmä on kontaminaation kannalta parempi, mutta näin tuotettujen virusvektorien saanto on rajoitettua (Bouard ym., 2009).

Lentivirusvektoreilla sekä AA-virusvektoreilla vektorituotannossa tarvitaan kaksi komponenttia. Nämä ovat vektorigenomi sekä vektorin replikaatioon sekä pakkaukseen tarvittavat proteiinit. Vektorigenomiin kuuluu siirtogeeni ja sen ekspressoimiseen tarvittavat sekvenssit LTR:ien tai ITR:ien vieressä. Vektorin replikaatioon sekä pakkaukseen tarvittavat proteiinit ovat peräisin avustajarakenteilta. Ei-toivottua rekombinaatiota näiden osien välillä pyritään estämään käyttämällä muita kuin virusten säätelysekvenssejä kontrolloimaan ekspressiota. AA-virusvektoreiden tuotto on hankalampaa kuin lentivirusvektoreiden, koska silloin tarvitaan apua myös heterologisilta viruksilta, kuten adenoviruksilta tai herpesviruksilta. Nykyään käytetään kokonaisten avustajavirusten sijaan plasmideja, jotka koodaavat vain avustajavirusten avustajaominaisuudet, kuten adenovirusvektorienkin tuotossa (Bouard ym., 2009).

Yleisesti virusvektorien tuotannossa haasteena on se, että vektorien tuotantomäärät ovat liian pieniä ja mahdollisuus kontaminaatioon on olemassa suuressa osassa tuotantomenetelmiä. Myös virusvektorien eristys tuotantosolulinjoista voi olla vaikeaa ja vaatia useita vaiheita. Virusvektoreiden tuotantoa haittaa myös se, että eläinmalleja ei aina voida käyttää vektoreiden suunnittelussa, koska vektorit voivat käyttäytyä eri lailla ihmisissä ja eläimissä esimerkiksi immuunipuolustuksen erojen takia (Bouard ym., 2009).

Tulevaisuudessa vektorien tuotanto voi olla helpompaa, kun voidaan hyödyntää baculovirusvälitteistä geenin siirtoa nisäkässoluihin sekä bioreaktorien käyttöä tehokkaassa massatuotannossa (Bouard ym., 2009). Virusvektoreita tuottavia soluja voidaan myös tulevaisuudessa mahdollisesti siirtää suoraan potilaisiin. Tällöin nämä solut on muokattava siten, että ne kulkeutuvat kehossa paremmalle paikalle. Kun virusvektorit vapautuvat tuottajasoluista potilaan kehossa, ne ovat valmiiksi paikassa, josta ne pääsevät helposti kohdesoluihinsa (Young ym., 2006).



### 5.3 Immuunivaste virusvektoreihin

Virusvektorit eivät ole luontaisia ihmiskehelle, joten immuunipuolustus pyrkii tunnistettuaan ne tuhoamaan kehoon lisätyt virusvektorit. Tällöin kaikki edut geeniterapiasta jäävät saamatta (Bouard ym., 2009). Viruksia on ollut ihmisten koko lajihistorian ajan olemassa ja niiltä puolustautumiseen on kehittynyt tehokas immuunipuolustuskoneisto. Eri virukset aiheuttavat erilaisia joko synnynnäisen tai hankitun immuunipuolustuksen aiheuttamia immuunivasteita. Näitä ovat esimerkiksi antigeenejä esittelevien solujen (eng. antigen-presenting cells, APC) sekä dendriittisolujen (eng. dendritic cells, DC) aktivaatio, muisti-T-solujen reaktiot, verisolujen ja veritekijöiden reaktiot, olemassa olevat vasta-aineet, sytokiniinit ja kemokiiniinit. Immuunivasteet aiheuttavat infektoitujen solujen tuhoamista, siirtogeenin toimimattomuutta ja vektorien tuhoamista ennen kuin ne pääsevät kohdesoluunsa tai saavat siirrettyä kantamansa geenit kohdesoluun. Immuunipuolustukseen osallistuvat myös muut kuin immuunipuolustuksen solut, sillä esimerkiksi maksa voi tuhota vektoreiden infektoimia soluja (Nayak & Herzog, 2010; Waehler ym., 2007; Jooss & Chirmule, 2003). Virusvektoreita voidaan kuitenkin muokata siten, että ne eivät aiheuttaisi immuunivastetta.

Immuunivastetta voidaan ehkäistä muun muassa immunomodulaattoreilla, jotka ovat immuunivastetta muuttavia lääkkeitä. Niitä käyttämällä on mahdollista pidentää siirtogeenin ekspressioaikaa (Jooss & Chirmule, 2003). Virusvektorit voidaan myös päällystää polyetyleeniglykolilla (PEG). Tämä PEG-käsittely auttaa virusvektoreita välttämään vasta-ainevälitteisen ja synnynnäisen immuunipuolustuksen aiheuttamat immuunivasteet. Mutta PEG-käsittely tulee yhdistää virusvektoreiden kohdistamiseen, sillä muuten se voi vähentää geenisiirron tehokkuutta (Waehler ym., 2007).

Viruksilla, joilla on kapsidi, voi kapsidin vaihtaminen toisen viruksen tai saman viruksen eri serotyypin kapsidin kanssa poistaa immuunivasteen. Tämä toimii silloin kun toinen virus tai serotyyppi ei ole ihmisillä yleinen, jolloin sille ei mitään luultavimmin ole valmiita vasta-aineita kehossa. Tällöin kapsidi on immuunipuolustukselle tuntematon, jolloin vektori voi päästä immuunipuolustuksen ohitse toimittamaan geneettisen informaation kohdesolulle (Nayak & Herzog, 2010; Waehler ym., 2007; Jooss & Chirmule, 2003).

Jopa pelkkä kapsidiproteiinien vaihto tai muokkaus voi vähentää immuunivastetta merkittävästi tai poistaa sen kokonaan. Rekombinanttikapsidiproteiineja voidaan myös hyödyntää hoidettaessa ihmisiä, joilla on jo olemassa vasta-aineita vektorina käytettävälle virukselle. Nämä rekombinanttikapsidiproteiinit poistavat erityisesti kyseiseen virukseen

kohdistuvat vasta-aineet ihmisten veren seerumista, jolloin immuunipuolustus ei tuhoa virusvektoreita. Tämä menetelmä ei kuitenkaan poista muisti-B-soluja, joiden aktivaatiota on mahdotonta estää. Tämä tarkoittaa sitä, että muistisolujen reaktiot lopulta tuottavat niin suuret määrät vasta-aineita, että ne lopulta estävät vektoreiden toiminnan. Näin voidaan kuitenkin pidentää terapeuttisen vaikutuksen pituutta (Jooss & Chirmule, 2003).

Virusvektoreita valmistettaessa voidaan myös alkujaan valita sellainen virus, joka on ihmisillä harvinaisempi, joten sille ei yhtä todennäköisesti ole valmiita vasta-aineita kehossa kuin yleisille ihmisten viruksille. Esimerkiksi adenoviruksista ihmisten adenovirus 2 sekä ihmisten adenovirus 7 ovat harvinaisempia luonnollisesti, joten niitä on käytetty enemmän hyödyksi virusvektoreiden kehityksessä. AA-viruksilla taas AAV-1, AAV-4, AAV-7 ja AAV-8 ovat harvinaisempi luonnollisesti, joten niitä käytetään pohjana rekombinanttivirusvektoreille (Jooss & Chirmule, 2003).

Myös alueella, jonne virusvektorit siirretään, on merkitystä immuunivasteen kannalta. Jos virusvektorit siirretään verenkiertoon, ne kohtaavat todennäköisesti verenkierron mukana kiertäviä vasta-aineita sekä muita immuunipuolustuksen soluja ja molekyyliä. Jos vektorit sen sijaan voidaan siirtää suoraan kohteeseen, kuten lihakseen tai silmään, niihin ei kohdistu yhtä suuri immuunipuolustuksen uhka (Nayak & Herzog, 2010; Jooss & Chirmule, 2003).

#### 5.4 Biologisten esteiden ylitys

Virusvektoreiden tulee kyetä ylittämään niin kutsuttuja biologisia esteitä ja saavuttaa halutut solut, jotta välttään ei-toivotuilta vaikutuksilta. Näitä biologisia esteitä ovat esimerkiksi se, että vektorin tulee poistua verenkierrosta oikeassa paikassa tai oikean kudoksen kohdalla ja päästä endoteelisen solukerroksen läpi. Vektorin pitää myös sitoutua kohdesolun pinnalle, päästä solun sisälle esimerkiksi reseptorivälitteisellä endosytoosilla tai kalvojen fuusioilla, sekä pystyä kulkeutua tumaan ja siirtää genominsa sinne. Vektoriksi valitusta viruksesta riippuen myös kapsidin poisto sekä genomien konversio kaksijuosteiseksi DNA:ksi voivat olla biologisia esteitä (Bouard ym., 2009; Ding ym., 2005; Waehler ym., 2007).

Biologisten esteiden ylitykseen vaikuttavat suurelta osin samat ratkaisut kuin immuunivasteen välttämiseen ja haluttuihin kohdesoluihin kohdistamiseen. Näitä ovat muun muassa vektorien lisäys alueelle, jossa immuunipuolustus on heikompaa ja immuunipuolustuksen heikennys lääkkeillä. Biologisia esteitä voidaan ylittää myös serotyypin, kapsidien sekä kapsidiproteiinien valinnoilla ja muokkauksella sekä vaikuttamalla kohdesolun reseptoreiden ja virusvektorien kiinnittymiseen (Ding ym., 2005; Nayak & Herzog, 2010).

## 5.5 Siirtogeenin ekspressoituminen

Terapeuttisen siirtogeenin ekspressoitumiseen liittyy myös haasteita virusvektoreita käytettäessä. Siirtogeenin ekspresion säilyttäminen ja pitkäikäisyys vaikuttavat paljon geeniterapian onnistumiseen. Viruksen valinta vaikuttaa paljon geeniekspresion pituuteen. Lentivirusvektorien aikaansaama geeniekspresio on pitempiaikaista, koska ne yleensä liittävät siirtogeenin kohdesolun genomiin. Adenovirusvektorit sen sijaan aiheuttavat lyhempiaikaisen geeniekspresion, koska ne eivät liitä genomiaan kohdesolun genomiin. AA-virusvektorien aikaansaaman geeniekspresion pituus on lentivirusvektorien ja adenovirusvektorien välimaastossa (Bouard ym., 2009).

Siirtogeenin ekspressoitumiseen vaikuttaa muun muassa virusvektorin toksisuus, replikaatio ja sen virheellisyys, geenisäätely, siirtogeenin hiljennys sekä vektorin kyky siirtää genominsa kohdesolun tumaan. Ekspressiota pyritään parantamaan poistamalla mahdollisimman paljon virussekvenssejä vektoreiden genomista sekä geenisäätelyllä. Siirtogeenin ekspresioon voidaan vaikuttaa lisäksi käyttämällä apuvirusia, apuplasמידeja sekä hybridivektoreita eli vektoreita, jotka yhdistävät useamman viruksen ominaisuuksia kuten kapsidiproteiineja. Apuvirusia ja apuplasמידeja käytetään, jos vektori ei ole kykenevä tuottamaan kopioita genomistaan kohdesolussa tai siirtämään genomiaan tumaan tai isäntäsolun genomiin (Bouard ym., 2009).

Siirtogeenin tulee ekspressoitua oikeaan aikaan oikeassa määrin. Tähän vaikuttaa geenisäätely. Geenisäätelyyn voidaan vaikuttaa valituilla viruspromootoreilla, indusoitavilla promootoreilla, kudosspesifisillä promootoreilla sekä endogeenisillä promootoreilla (Bouard ym., 2009). Geenisäätelyyn voidaan vaikuttaa myös vaikuttamalla translaation määrään. Siihen voidaan vaikuttaa cis-toimivien transkription jälkeisten säätelyelementtien (eng. cis-acting post-transkriptional regulatory elements, PREs) kautta. PREsien käytöllä voidaan kasvattaa siirtogeenin ekspressiota moninkertaiseksi (Verma & Weitzman, 2005).

Siirtogeeni voi solussa joutua hiljennetyksi, jolloin se ei enää ekspressoitu. Siirtogeenin hiljennystä voidaan estää lisäämällä siirtogeenin sekvenssin kummallekin puolelle suojaavat sekvenssit, jotka estävät siirtogeeniin kohdistuvat muokkaukset sekä hiljennyksen (Bouard ym., 2009). Myös säätelämällä lääkkeillä ja serotyypin muokkauksilla solunsisäistä liikennettä sekä kapsidin poistoa, voidaan suoraan vaikuttaa geeniekspresion pitkäikäisyyteen (Ding ym., 2005).

## 6. Johtopäätökset

Virusvektoreita on kehitetty paljon. Lentivirusvektoreista, adenovirusvektoreista sekä adeno-assosioiduista virusvektoreista on kehitetty useita sukupolvia. Kaikki nämä sukupolvet ovat edeltäjiään tehokkaampia ja turvallisempia. Virusvektoreita on muunneltu muun muassa pseudotyyppeillä sekä erilaisilla adaptoreilla ja ligandeilla, jotta ne saataisiin kohdennettua kohdesoluihin (Bouard et al., 2009; Waehler et al., 2007; Young et al., 2006). Erilaisia muokkausmenetelmiä voidaan myös yhdistää samaan virusvektoriin parhaan lopputuloksen saavuttamiseksi. Virusvektoreita on myös muokattu ylittämään biologisia esteitä sekä välttämään immuunireaktion laukaisua. Erilaisilla muokkauksilla on pystytty myös vaikuttamaan virusvektorien aikaansaamaan terapeuttisen siirtogeenin ekspression. Kaikkien näiden muokkausten ansiosta virusvektoreista on muodostunut varteenotettava vaihtoehto vektoriksi geeniterapian eri menetelmissä.

Virusvektoreita pystytään käyttämään monella tavalla hyödyksi geeniterapiassa. Niiden avulla voidaan muun muassa korvata toimimattomia geenejä sekä kuljettaa DNA-jaksoja kohdesoluihin, jotka aloittavat toivotun geenituotteen ekspression. Virusvektoreita voidaan myös hyödyntää terapeuttisissa rokotteissa sekä laajalti syöpien hoidossa (Young et al., 2006).

Tulevaisuudessa virusvektoreista voidaan luultavasti kehittää entistä tehokkaampia sekä turvallisempia. Tämä on mahdollista nopeasti kehittyvän tekniikan avulla. Uskon, että virusvektorit tulevat yleistymään lääketieteellisessä hoidossa. Tämä kuitenkin edellyttää, että niiden tuotantoa saadaan edullisemmaksi ja tehokkaammaksi. On myös tärkeää, että virusvektorien kehitys ja tutkimus jatkuu, jotta virusvektorien käytön haasteita voidaan ylittää. Mahdollisimman turvallisten ja tehokkaiden virusvektorien aikaansaamiseksi tarvitaan laajasti tutkimustietoa erilaisten virusten ja virusvektoreiden vaikutuksista kehoon ja yksittäisiin kudoksiin sekä soluihin. On myös tärkeää tietää mahdollisimman tarkkaan, kuinka näiden eri virusten ja virusvektoreiden mekanismit toimivat yhteistyössä solujen organismien ja mekanismien kanssa, jotta niistä voidaan muokata hyviä ja turvallisia vektoreita.

## 7. Läheteet

- Bouard, D., Alazard-Dany, N., & Cosset, F. L. (2009). Viral vectors: From virology to transgene expression. *British Journal of Pharmacology*, *157*(2), 153–165.  
<https://doi.org/10.1038/BJP.2008.349>
- Chen, X., & Gonçalves, M. A. F. V. (2016). Engineered Viruses as Genome Editing Devices. *Molecular Therapy*, *24*(3), 447–457. <https://doi.org/10.1038/MT.2015.164>
- Ding, W., Zhang, L., Yan, Z., & Engelhardt, J. F. (2005). Intracellular trafficking of adeno-associated viral vectors. *Gene Therapy*, *12*, 873–880. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302527>
- Ghosh, S. S., Gopinath, P., & Ramesh, A. (2006). Adenoviral Vectors A Promising Tool for Gene Therapy. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *133*. [www.wiley.co.uk/genmed/clinical](http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical)
- Betley J.N., & Sternson S.M. (2011). Adeno-associated viral vectors for mapping, monitoring, and manipulating neural circuits. *Human Gene Therapy*, *22*(6), 669–677.  
<https://doi.org/10.1089/HUM.2010.204>
- Jooss, K., & Chirmule, N. (2003). *Immunity to adenovirus and adeno-associated viral vectors: implications for gene therapy*. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302037>
- Kafri, T., van Praag, H., Gage, F. H., & Verma, I. M. (2000). Lentiviral Vectors: Regulated Gene Expression. *Molecular Therapy*, *1*(6), 516–521. <https://doi.org/10.1006/MTHE.2000.0083>
- Milone, M. C., & O'doherty, U. (2018). Clinical use of lentiviral vectors. *Leukemia*, *32*, 1529–1541. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0106-0>
- Nayak, S., & Herzog, R. W. (2010). *Progress and prospects: immune responses to viral vectors*. <https://doi.org/10.1038/gt.2009.148>
- Verma I.M. & Weitzman M.D. (2005). Gene therapy: twenty-first century medicine. *Annual Review of Biochemistry*, *74*, 711–738.  
<https://doi.org/10.1146/ANNUREV.BIOCHEM.74.050304.091637>
- Waehler, R., Russell, S. J., & Curiel, D. T. (2007). Engineering targeted viral vectors for gene therapy. *Nature Reviews Genetics* *2007* 8:8, *8*(8), 573–587. <https://doi.org/10.1038/nrg2141>
- Young, L. S., Searle, P. F., Onion, D., & Mautner, V. (2006). Viral gene therapy strategies: From basic science to clinical application. *Journal of Pathology*, *208*(2), 299–318.  
<https://doi.org/10.1002/PATH.1896>