

De toekomst van virale vectoren in genterapie

Obstakels en ontwikkelingen

Bachelorscriptie van Renée Hendriks,
studentnummer s1827251

Begeleider: B. L. Waarts
Basiseenheid: Medische microbiologie
Datum: 6 mei 2013

Samenvatting

Genterapie is een methode om genetische defecten op celniveau te herstellen, om op deze manier het fenotype van een ziekte te genezen. Virale vectoren worden al lang gebruikt als medium om therapeutische genen af te leveren. Recente onderzoeken naar non-virale vectoren en fysieke methoden om DNA te bezorgen stellen echter deze wijzen van aanpak, door voordelen in onder andere veiligheid, boven virale vectoren. In deze review wordt antwoord gegeven op de vraag of er voor virale vectoren een toekomst is wanneer de ontwikkelingen op het gebied van non-virale vectoren uitkomst bieden voor de problemen die er zijn met virale vectoren. Er wordt een uitgebreid overzicht gegeven van voordelen, obstakels en ontwikkelingen voor virale vectoren en er wordt kort stilgestaan bij non-virale vectoren en fysieke methoden. De toekomst van genterapie is voorlopig gelijk aan de toekomst van virale vectoren, aangezien dit tot nu toe de meest gevorderde werkzame genterapeutische methoden *in vivo* zijn en er oplossingen voor obstakels te vinden zijn in samengestelde hybride virale vectoren. Zelfs wanneer non-virale vectoren en fysieke methoden zich ontwikkelen tot werkzame therapieën *in vivo* zal dit eerder bijdragen aan een breder spectrum van mogelijke therapieën dan het vervangen van virale vectoren.

Inhoudsopgave

Voorwoord	2
1 Introductie	3
2 Virale vectoren	3
2.1 Vectoren van retrovirussen	3
2.2 Vectoren van DNA virussen	5
2.3 Vectoren van RNA virussen	8
2.4 Hybride vectoren	9
3 Non-virale vectoren	9
3.1 Chemische vectoren	9
3.2 Fysieke DNA aflevering	10
4 Conclusie	12
5 Referenties	13

Voorwoord

Ik heb deze scriptie met veel plezier geschreven en ik wil graag de heer Waarts bedanken voor het enthousiast ontvangen van mijn scriptie voorstel en voor de begeleiding tijdens het schrijven. Ik zie genterapie als een ontwikkeling waaraan af te meten is hoe ver de mens al is gekomen. Wat tegenwoordig mogelijk is vind ik buitengewoon en ik vind het te gek dat ik en mijn generatie gaan bijdragen aan het verder verleggen van de grenzen. Ik hoop dat ik u met deze scriptie wat kan meegeven van mijn enthousiasme voor deze technieken en mogelijkheden en dat u het met net zoveel plezier zult lezen als dat ik het heb geschreven.

Renée Hendriks

1 Introductie

In 1947 werd genterapie voor het eerst genoemd als mogelijke therapie door C. E. Keeler naar aanleiding van de weinige effectieve therapieën voor genetisch overdraagbare ziektes. Hij voorspelde dat er door een “homozygote modificatie in de genetische formule” een “permanente correctie van erfelijke ziektes” bewerkstelligd kon worden [Keeler 1947]. In een artikel uit 1972 beschreven Friedmann en Roblin hun vertrouwen dat genterapie in de toekomst genetische ziektes zou kunnen verbeteren, maar ze adviseerden voorlopig nog geen onderzoeken te doen met mensen in verband met onvoldoende kennis [Friedmann en Roblin 1972]. Na 28 jaar van uitbreiding van het onderzoeksveld, werd in 1990 de eerste klinische studie gedaan waarbij de 4 jaar oude Ashanti deSilva werd behandeld voor de ziekte Adenosine Deaminase Severe Combined Immunodeficiency (ADA SCID). Met behulp van een gammaretrovirus werden geëxtraheerde T-cellen ex-vivo behandeld en na injectie van de verbeterde T-cellen herstelde haar immuunsysteem volledig [Blaese et al 1993, 1995]. Met dit onderzoek werd het voorgestelde principe bevestigd en dat gaf hoop op therapieën voor zowel erfelijke als verworven ziektes.

Het basis principe van genterapie is het vervangen van defecte genen door een functionele kopie en op deze manier het genotype en het fenotype van een ziekte te genezen. Het grootste obstakel in het gen transferproces is het op de juiste plaats bezorgen van de therapeutische genen. Hiervoor worden vectoren gebruikt, welke moeten zorgen voor een goede aflevering. Om dit proces ideaal te laten verlopen, zijn een aantal proceseigenschappen vereist: (1) het DNA moet in zowel ontwikkelende als volgroeide organismen kunnen worden gebracht; (2) de celtransductie moet zeer efficiënt zijn; (3) er moet een lange termijn expressie op het gewenste niveau worden gemedieerd; (4) de cytotoxiciteit moet beperkt blijven; (5) de immunrespons *in vivo* moet klein tot verwaarloosbaar zijn; (6) in de vector moet plaats zijn voor toereikende lengtes van DNA zodat transgenen geaccommodeerd kunnen worden en (7) er moet gereguleerde expressie plaatsvinden [Howarth et al 2010].

Voor het vervoeren van genen naar de targetcellen bestaan twee soorten vectoren, virale vectoren en non-virale vectoren. Een virale vector bestaat globaal gezien uit een virus partikel dat is gestript van het pathogene DNA of RNA, waarvoor in de plaats het therapeutische DNA is ingebouwd. Het

virus partikel is dan in staat een cel binnen te dringen waar het DNA of RNA de mogelijkheid krijgt om tot expressie te komen. Onder de verschillende virale vectoren bestaan vele varianten van alle gentransfer processen die allen voor en nadelen hebben. Non-virale vectoren is een verzamelnaam voor alle fysieke en chemische systemen die geen gebruik maken van virussen. Meestal is er sprake van óf chemische methodes óf fysieke methodes.

Virale vectoren worden nu nog het meeste gebruikt, maar in de onderzoekswereld maken non-virale vectoren hun opmars, en in sommige studies wordt zelfs aangegeven dat non-virale vectoren de voorkeur hebben [Guo en Huang 2012] in verband met veiligheid, ook al is de effectiviteit in gentransductie nu nog veel hoger met virale vectoren [Nayerossadat et al 2012]. Non-virale vectoren worden in deze onderzoeken genoemd als beschikbaar, kostenefficiënt en grenzeloos in grootte. De vraag is of er voor virale vectoren een toekomst is wanneer de ontwikkelingen op het gebied van non virale vectoren uitkomst bieden voor de problemen die er zijn met virale vectoren. In deze scriptie worden de grootste obstakels van verschillende virale vectoren beschreven en wordt onderzocht wat er tot nu toe gedaan is om die virale vectoren te verbeteren. Hiermee zal een duidelijker beeld te scheppen zijn over de toekomst van virale vectoren.

2 Virale vectoren

Bij de beschrijving van onderstaande virale vectoren is de standaard virusindeling aangehouden, waarbij extra aandacht wordt besteed aan de meest ontwikkelde vectoren. Elke beschrijving bestaat uit een aantal eigenschappen, voordelen, obstakels en ontwikkelingen.

2.1 Vectoren van retrovirussen

Retroviruspartikels bestaan uit een lipide envelop met daarin een nucleocapside. In de nucleocapside bevinden zich twee identieke kopieën van het virale RNA genoom, reverse transcriptase, integrase en protease. Retrovirale vectoren hebben een brede variëteit aan targetcellen en een capaciteit van 7-10 kb voor het accommoderen van therapeutische genen [Barquinero et al 2004, Daniel en Smith 2008]. Retrovirussen kenmerken zich door de stabiele integratie in het gastheer genoom, mogelijk gemaakt door reverse transcriptase, dat van het RNA een dubbelstrengs DNA pro-virus maakt, vervolgens plaatst integrase dit DNA in een chromosoom van de gastheer. Door dit mechanisme is het mogelijk therapeutische

genen in het gastheer genoom in te bouwen, waarna deze bij elke celdeling behouden blijven. Her-administratie van de therapie is dan niet nodig. Bestaande retrovirale vectoren zijn onder te verdelen in oncoretrovirale vectoren, lentivirale vectoren en spumavirale vectoren [Verma en Weitsman 2005]. Oncoretrovirussen zijn relatief gezien eenvoudiger en lentivirussen en spumavirussen zijn meer complex, zij beschikken over een aantal extra eiwitten die ingewikkelder functies mogelijk maken.

Obstakels en ontwikkelingen voor oncoretrovirale vectoren

Oncomutagenese Insectie in het gastheergenoom kan nadelig zijn wanneer het dichtbij een proto-oncogen gebeurt [Verma en Weitsman 2005]. De proto-oncogen promotor kan worden geactiveerd door een enhancer in het vector DNA en dit leidt tot ongewone transcriptie van oncogenen. In het verleden leverde dit leukemie op [Staal et al 2008]. Onco retrovirussen integreren bij voorkeur dichtbij transcriptie startpunten [Wu et al 2003]. Om te voorkomen dat er opnieuw in actief transcriberende genen geïntegreerd zou worden, werd de enhancer die het oncogen activeerde verwijderd, en werd een interne promotor toegevoegd voor een meer gerichte transcriptie [Lombardo et al 2007].

Recombinatie De eerste generatie oncoretrovirale vectoren werd ontwikkeld uit het Murine Leukemie Virus (MLV). Bij deze vectoren werd het gen voor replicatie verwijderd. Echter, in de verpakkingscellen die voor de productie van de vectoren zorgden en hiervoor over replicatiegenen beschikten, leken de plasmiden met replicatiegenen erg op de virale vectoren, waardoor er recombinatie mogelijk was. Op deze manier konden er replicatie-competente retrovirussen (RCR) ontstaan bij de productie van de vectoren. Om het aantal RCR's te verminderen werden de replicatiegenen verdeeld over twee plasmiden. Op deze manier is er meer recombinatie nodig om een RCR te produceren, hetgeen de kans op RCR's verkleint [Danos en Mulligan 1988].

Mitose-afhankelijk Lang werd gedacht dat oncoretrovirale vectoren afhankelijk zijn van de afbraak van het nucleaire membraan tijdens mitose om het pre-integratie complex in de celkern te vervoeren [Roe et al 1993]. Dit zou betekenen dat deze virale vectoren alleen delende cellen kunnen binnendringen. Post-mitotische cellen zoals neuronen vallen hierdoor buiten het tropisme van oncoretrovirale vectoren. Recentelijk

is echter geopperd dat neuronen wel gevoelig zijn voor transductie met oncoretrovirale vectoren [Liu et al 2011]. Uitbreiding van dit onderzoek zou kunnen uitwijzen of oncoretrovirussen weer op de kaart gezet moeten worden voor gentherapie in post-mitotische cellen.

De voordelen van complexere retrovirale vectoren: Lentivirale vectoren

Een groot voordeel van lentivirale vectoren is dat afbraak van het nucleaire membraan (tijdens mitose) van de gastheercel niet nodig is [Lewis en Emerman 1994]. Hierdoor is infectie van zowel delende als niet-delende cellen mogelijk. Dit maakt lentivirale vectoren geschikt voor post-mitotische cellen zoals neuronen [Vigna en Naldini 2000]. De meest gebruikte virale vector is geïsoleerd uit Human Immunodeficiency Virus 1 (HIV1).

Obstakels en ontwikkelingen voor lentivirale vectoren

Oncomutagenese Ook bij lentivirale vectoren is oncogenese door mutagene insertie een gevaar voor veilige gentherapie. Lentivirale vectoren hebben een ander integratieprofiel dan oncoretrovirussen, namelijk de voorkeur voor insertie in actief transcriberende genen [Schroder et al 2002]. De ontwikkeling van niet integrerende lentivirale vectoren, met een episomale expressie zou een uitkomst bieden voor dit probleem [Philpott en Thrasher 2007, Wanisch en Yáñez-Muñoz 2009], hiermee gaat echter de stabiele transgeenexpressie verloren.

Productie De productie van lentivirale vectoren kent een aantal obstakels, waaronder de vorming van RCR's en de moeilijkheid in het behalen van hoge titers. Bij lentivirale vectoren kan de vorming van RCR's worden verlaagd met Self Inactivating (SI) LV [Huang et al 2012]. Van deze SI LV is het echter lastig om hoge titers te verkrijgen. Hoge titers zijn wel mogelijk met kortdurende transfectie, maar deze methode is afhankelijk van een langzame en inefficiënte productie [Mátraí et al 2010]. Om deze productieproblemen te overwinnen, worden verpakkingscellijnen ontwikkeld die al een stabiele expressie van de virale genen vertonen [Cockrell et al 2006]. Recentelijk zijn er verbeteringen in de productie van deze cellijnen gerealiseerd waarbij gebruik wordt gemaakt van *flow electroporation* voor de transfectie in de cellijn [Witting et al 2012].

Tropisme Het gp120 eiwit in de envelop van HIV1 zorgt ervoor dat het tropisme van de virale vectoren beperkt blijft tot CD4+ cellen, zoals T-cellen en macrofagen. Het is

gebleken dat pseudotyping van de virale envelop het tropisme van HIV1 vectoren verbreedt. Afhankelijk van de gewenste targetcellen kan de vector worden bewerkt met envelop eiwitten van virussen die wel tropisme hebben voor het gewenste weefsel. Bij deze bewerking worden genen ingebouwd die coderen voor de oppervlakte eiwitten van de betreffende virussen. Op deze manier is het tropisme uitgebreid naar onder andere luchtweg epitheelcellen en endotheelcellen [Kobinger 2001] en levercellen [Bartosch et al 2003, Kang et al 2005]. Om gericht cellen te transduceren, kunnen in celtype specifieke liganden of antilichamen in de virale envelop gebracht worden. Op deze manier kan met een 'suicide' transgen een tumor worden behandeld [Ziegler et al 2008].

Immuunreacties Immuunreacties kunnen worden opgewekt door het vectorpartikel, de getransduceerde cel en het transgeenproduct [Hanawa et al 2005]. Deze immuunreacties kunnen voordelig zijn wanneer genterapie wordt gebruikt bij vaccinatie, wanneer een sterker immuunsysteem gewenst is. Het is echter zeer ongewenst wanneer langdurige transgeenexpressie gewenst is, zoals in erfelijke defecten [Mátraí et al 2010]. De vectorale immuunreacties kunnen worden verminderd door pseudotyping, wat ook voordelen heeft voor het tropisme. Voornamelijk contact met Antigen Presenterende Cellen (APC) lokt immuunreacties uit [VandenDriessche et al 2005], en zolang contact met APC's mogelijk is, kunnen immuunreacties volgen. Het is daarom van belang dat er targetspecifieke promotors en enhancers worden gebruikt om transductie van APC's te voorkomen. Voor dit doel worden ook microRNA's met een specifieke target sequentie ingezet [Brown et al 2007].

Transductier restrictie Het interferon systeem is een deel van het immuunsysteem dat virale infectie tegengaat via allerlei interferon geïnduceerde eiwitten. Het is gebleken dat dit systeem een restrictie oplevert voor celtransductie van lentivirale vectoren [Brown et al 2007]. Met antilichamen tegen de effectoren van dit systeem, zou celtransductie verhoogd kunnen worden.

De voordelen van complexere retrovirale vectoren: Spumavirale vectoren

Spumavirale vectoren zijn relatief nieuwe veelbelovende vectoren aangezien er een aantal voordelen zijn in vergelijking met oncoretrovirale vectoren en lentivirale vectoren. Foamy virus (FV) vectoren zijn niet pathogeen en hebben een

extreem breed tropisme [Hill et al 1999]. Daarnaast zijn hoge titers zonder detecteerbare RCR's relatief makkelijk te verkrijgen [Trobridge 2009].

Obstakels en ontwikkelingen voor spumavirale vectoren

Oncomutagenese Spumavirale vectoren hebben het meest positieve integratie profiel [Trobridge et al 2006], waarbij ze minder integreren in actieve genen dan lentivirale vectoren en minder integreren bij transcriptie startpunten dan oncoretrovirale vectoren [Trobridge 2009]. Of dit integratieprofiel ook daadwerkelijk leidt tot grotere veiligheid in klinische studies moet nog worden onderzocht.

Mitose-afhankelijk FV heeft een speciaal replicatiemechanisme, waardoor replicatie zich voornamelijk afspeelt in de virion producerende cellen [Yu et al 1996]. Het functionele genoom van FV vectoren bestaat hierdoor uit dubbelstreng DNA, al kan er nog wat reverse transcriptie plaatsvinden in de targetcellen [Yu et al 1999]. Aangezien FV transgeenexpressie alleen lijkt op te treden na mitose [Caprariello 2009], is het een handige eigenschap dat FV kan wachten in niet delende cellen, totdat zij wel overgaan in de delingsfase.

Transductier restrictie Als bescherming tegen virusinfecties heeft het menselijk lichaam restrictie mechanismes die transductie van cellen bemoeilijken. Voor FV zijn de er twee van deze systemen, APOBEC3s en TRIM5alfa. Dit zijn cytidine deaminases die het virale genoom hypermuteren en reverse transcriptie inhiberen. Voorheen werd gedacht dat APOBEC3s celproductie niet zou hinderen, maar het is gebleken dat er in de verpakkingcellen nog APOBEC3s aanwezig zouden kunnen zijn [Samuel 2001]. Verbetering van de verpakkingcellen zou op deze manier de celtransductie kunnen verbeteren. Onderzoek met TRIM5alfa wees uit dat menselijk TRIM5alfa geen restrictie vormt voor non-humane FV's [Trobridge 2009]. Ook kan nog worden uitgezocht of spumavirale vectoren restrictie ondervinden van interferon en of er antilichamen nodig zijn tegen de effectoren van dit systeem.

2.2 Vectoren van DNA virussen

Adenovirale vectoren

Een adenovirion bestaat uit een nucleocapside met daarin dubbelstrengs lineair DNA. Deze partikels hebben geen envelop. Van de adenovirussen zijn

meer dan 100 serotypes bekend, waarvan 51 menselijke virussen [Kamimura et al 2011]. Als virale vector zijn voornamelijk humaan adenovirus serotype 5 (Ad5) en humaan adenovirus serotype 2 (Ad2) onderzocht, al zijn er voor een aantal andere serotypes ook vectoren geproduceerd [Howarth et al 2010]. Adenovirale vectoren diffunderen door poriën in het kernmembraan en kunnen hierdoor delende en niet delende cellen bereiken. Met directe injectie is transgeenexpressie te bereiken in onder andere niercellen, hartspiercellen, hersencellen en skeletspiercellen. Intraveneuze injecties leiden in knaagdieren vooral tot expressie in lever en milt [Kamimura et al 2011]. Bij infectie wordt het DNA van een adenovirus niet ingebouwd in het gastheergenoom, maar blijft het los drijven in de nucleus als episome. Tijdens transcriptie worden deze genen net als het gastheer DNA afgelezen, maar bij een celdeling gaat het toegevoegde genetische materiaal verloren. Voor adenovirale vectoren geldt daardoor dat er steeds nieuwe administratie nodig is in een populatie met groeiende cellen. Insertie mutagenese zoals bij het SCID-X [Hacein-Bey-Abina et al 2003] onderzoek is echter niet mogelijk omdat het DNA niet wordt ingebouwd in het gastheergenoom.

Obstakels en ontwikkelingen

1^e generatie vectoren De eerste Ad vectoren, waarbij alleen het gen voor replicatie was verwijderd, hadden ernstige tekortkomingen waaronder immunoreacties. Hierdoor werd de transgeenexpressie verkort, wat ten koste ging van de veiligheid en effectiviteit [Muruve 2004]. Daarnaast werden in perifere organen door cellulaire factoren virale genen gereactiveerd [Spergel et al 1992] en was er zowel *in vitro* als *in vivo* sprake van toxiciteit. In de eerste vectoren was plaats voor 8 kb aan transgenen.

2^e generatie vectoren Om deze gebreken te overkomen werden experimenten gedaan met virale vectoren waarbij elke keer meer virale genen werden verwijderd [Yang et al 1994, Dedieu et al 1997]. Deze virale vectoren hebben helpercellijnen nodig en worden daarom Helper dependant (Hd) vectoren genoemd. Deze helpercellijnen nemen de essentiële functies over van de genen die zijn verwijderd uit de vectoren. Het verwijderen van meer virale genen verminderde de cytotoxiciteit en immunoreacties, en was er nu plaats voor 10 kb aan transgenen [Dedieu et al 1997].

'Gutted' vectoren Ondertussen zijn vectoren geproduceerd waarbij geen enkel viraal gen meer aanwezig is, 'gutted' of 'guttless'

vectoren genaamd. Menselijke embryo niercellen van cellijn 293 [Graham et al 1977] fungeren als helpercellen voor de productie van de vectoren, waarbij hoge virustiters worden behaald. Met deze vectoren is lange termijn expressie mogelijk door vermindering van de immunologische reacties, de hoge virustiters verhogen de effectiviteit. Daarnaast is er in deze vectoren ruimte voor 37 kb aan therapeutische genen [Kamimura et al 2011]. Eerder was het scheiden van 'gutted' vectoren van helpercellen nog een uitdaging [Walther and Stein 2000] nu is de transductie efficiëntie samen met het relatieve gemak van de preparatie en purificatie een reden voor veelvuldig gebruik [Howarth et al 2010].

Adeno Associated virale vectoren

Adeno Associated virale vectoren (AAV) zijn afgeleid van non-pathogene parvovirussen die afhankelijk zijn van co-infectie met adenovirussen en herpes simplex virussen. AAV's hebben geen envelop om het capsid. Het capsid herbergt enkelstrengs DNA van 4-5kb dat willekeurig sense of antisense is. In het DNA bevinden zich Inverted Terminal Repeats (ITR) die integratie op een specifieke plaats in chromosoom 19 mogelijk maken [Smith 2008], al bestaan AAV's voornamelijk in episodale vorm in de celkern [Schnepp et al 2005]. De ITR's zorgen voor een verlaagd risico op recombinatie met wildtype virussen en ook is de cellulaire immunoresponsie hierdoor lager dan bij andere virale vectoren [Kocot et al 1973]. Transductie is mogelijk in zowel delende als niet delende cellen. Er bestaan meer dan 100 non-humane primaat serotypes en 12 humane serotypes met een brede zone aan targetcellen [Daya and Berns 2008]. Voor het gebruik als virale vector is humaan serotype 2 (AAV2) het eerst ontdekt [Hermonat and Muzyczka 1984] en het meest bestudeerd.

Obstakels en ontwikkelingen

Tropisme AAV2 heeft een voorkeur voor transductie van voornamelijk neuronen. Een breder tropisme voor AAV2 werd behaald met behulp van een pseudotyping aanpak waarbij het DNA van AAV2 werd verpakt in het capsid van een andere AAV. Hierbij werd een betere genexpressie bewerkstelligd in spiercellen (AAV1), retinacellen (AAV5), levercellen (AAV8) en hartcellen (AAV9) [Howarth et al 2010]. Toch zijn er een aantal weefsels die niet gevoelig zijn voor transductie met de beschikbare serotypes. Voor deze uitdaging worden een directe en een indirecte benadering nagestreefd. De directe benadering gaat uit van het aanpassen van het virale vector capsid van AAV2. Dit kan door

insertie van kleine eiwitten of liganden direct in het virale capsid [Stachler and Bartlett 2006] of inserties in het DNA dat codeert voor het AAV2 virale capsid [Shi et al 2001]. De indirecte benadering maakt gebruik van een associatiemolecuul zoals een bi-specifiek antilichaam [Bartlett et al 1999] of biotine [Arnold et al 2006] dat het virale capsid oppervlak en een receptor aan het oppervlak van de targetcel bindt [Pulicherla and Asokan 2011].

Immuunreacties Alhoewel AAV's niet erg immunogeen zijn, kunnen ze toch humorale en cellulaire immuunreacties opwekken. Ondanks dat het niet pathogene virussen zijn, hebben sommige mogelijke patiënten hierdoor toch bestaande antilichamen tegen AAV's, en immuno-naïeve patiënten zouden antilichamen kunnen produceren na de 1^e therapie [Louis Jeune et al 2013]. Omdat zelfs lage niveaus van antilichamen de celtransductie kunnen tegengaan, is het van belang dat hiermee rekening gehouden wordt. Aangezien antilichamen zich richten op het capsid zijn de oplossingen voor het verbreden van het tropisme ook relevant voor het ontwijken van een immuunreactie. Pseudotyping en veranderingen in het capsid zouden het immuunsysteem om de tuin kunnen leiden.

Tijdelijke expressie AAV's zijn in staat tot gerichte insertie in chromosoom 19, maar dit is nog nooit aangetoond in menselijk weefsel [Schnepp et al 2005]. Dit houdt in dat huidige AAV's niet in staat zijn om permanente veranderingen te induceren. Dat er enkel episomaal DNA aanwezig is, lijkt te komen doordat AAV's het *rep*-gen missen, aangezien dit is verwijderd om veiligheidsredenen [Kamimura et al 2011]. Recente studies onderzoeken de eigenschappen van dit *rep*-gen en hoe dit op een veilige manier kan worden toegevoegd voor de gerichte insertie in het humane DNA van zowel AAV's als andere virale vectoren [Huang et al 2012].

Trage conversie Na de transductie van de targetcellen komt de genexpressie maar langzaam op gang doordat conversie van AAV DNA in dubbelstrengs DNA nodig is [Howarth et al 2010]. Om dit te overkomen zijn self-complementary AAV2 vectoren ontworpen, waarbij het genetische materiaal zichzelf tot dubbelstrengs DNA kan vouwen. De snelheidsbeperkende stap wordt zo omzeild, wat de efficiëntie dramatisch kan verbeteren [McCarty 2008].

Kleine vector AAV vectoren zijn de kleinste carriers voor het accommoderen van transgenen, en door het ontwerp van self-complementary vectoren wordt de ruimte beperkt tot een maximum van 3,3 kb [13]. Toch kunnen deze vectoren worden ingezet voor genen die coderen voor kleine eiwitten (tot 55 kd) en huidige therapieën die gebaseerd zijn op RNA [McCarty 2008].

Herpes virale vectoren Herpes virussen bestaan uit een lipide dubbellaag als envelop, met daarin een capsid. In de capsid bevindt zich 150 kb aan lineair dubbelstrengs DNA. Uit deze virussen zijn verscheidene vectoren geïsoleerd, waaronder Herpes Simplex 1 virus (HSV1) vectoren, Epstein-Barr virus (EBV) vectoren en Human Cytomegalo virus (HCMV) vectoren. Van deze vectoren is HSV1 het meest onderzocht en ontwikkeld. HSV1 heeft een breed tropisme met een voorkeur voor neuronen en kan zowel delende als niet delende cellen transduceren [Walther en Stein 2000]. Een infectie met HSV1 kan lytisch zijn, of het virus blijft jarenlang latent aanwezig. HSV1 vectoren imiteren deze infectiestrategieën. De mogelijkheid tot lange termijn transgene expressie in neuronen is de afgelopen jaren aangetoond [Glorioso en Fink 2009]. Er is een capaciteit van minimaal 30 kb aan transgenen en er zijn hoge virustiters produceerbaar met relatief stabiele partikels [Walther en Stein 2000].

Obstakels en ontwikkelingen voor HSV vectoren
Toxiciteit De toxiciteit die optreedt bij HSV1 infectie is bij het gebruik van vectoren ongewenst. Om deze reden zijn de genen voor Infected Cell Proteins (ICP) verwijderd uit de huidige HSV1 vectoren [Walther en Stein 2000], waardoor de toxiciteit is verlaagd.

Recombinatie De hoge titers die zijn behaald, waren mogelijk met de productie van vectoren met helper virus partikels [de Silva en Bowers 2009]. Bij deze hoge concentraties zitten echter ook resten van de helper partikel concentratie, wat productie van replicatie competente vectoren tot gevolg kan hebben. Om deze reden zijn er met succes mogelijkheden onderzocht om helper-free vectoren te produceren [Fraefel et al 1996]. Voor sommige applicaties is het wel interessant om vectoren te gebruiken waarbij replicatie intact is gebleven. Behandelingen voor hersentumoren hebben voordeel van deze vectoren omdat replicatie in proliferatieve tumorcellen leidt tot oncolysis en afbraak van de tumor [Walther en Stein 2000].

Titer Een probleem met de helper-free productiemethode is dat de behaalde titers lang niet zo hoog zijn. Men denkt dat dit probleem te maken heeft met de inefficiënte transfectie van de Bacterial Artificial Chromosome (BAC) in de vector, die nu met behulp van lipides werkt [Laimbacher and Fraefel 2012]. Daarnaast zou het kunnen zijn dat de cellijnen die worden gebruikt tijdens de productie van de vector niet optimaal zijn [de Silva en Bowers 2009].

Promotor silencing Het is gebleken dat de gebruikte virale promotors binnen 1 tot 2 weken onderdrukt worden de gastheercel. Om deze reden zijn neuronale subtypenspecifieke cellulaire promotors onderzocht [Kaplitt et al 1994, Jin et al 1996, Song et al 1997, Rasmussen et al 2007] welke de transgeenexpressie verlengde naar 2 tot 14 maanden. Daarnaast heeft de toevoeging van insulator elementen lange termijn expressie van één deze promotors tot stand gebracht [Zhang et al 2000].

Transgeen regulatie Gereguleerde expressie van transgenen is een van eigenschappen van een optimale genetherapie. Voor de HSV1 vectoren zijn met succes verschillende expressie systemen ontwikkeld [de Silva en Bowers 2009]. Voor verbetering van deze systemen op het gebied van blijvende controle en immuunreacties is verder onderzoek nodig.

2.3 Vectoren van RNA virussen

Alfavirale vectoren

Alfavirale vectoren bestaan uit een lipide envelop met daarin een kern, welke omringd is door nucleocapside. Hierin bevindt zich positief enkelstrengs RNA. De meest gebruikte alfavirale vectoren zijn geïsoleerd uit het Sindbis virus (SIN), Semliki Forest virus (SFV) en Venezuelan Equine Encefalitis virus (VEE). Deze vectoren worden nog niet erg veel gebruikt en nodigen nog veel ontwikkeling, maar door de vele voordelen is verder onderzoek toch aantrekkelijk. Zo is het gemakkelijk om snel hoge virustiters te produceren, is een hoge transgeen expressie op zeer korte termijn (uren) haalbaar, en is er een breed tropisme met een voorkeur voor neuronen. Daarnaast zijn de ziektebeelden in mensen voor SIN en SFV respectievelijk vrij mild en zeer uitzonderlijk voorkomend [Ehrengruber 2002].

Obstakels en ontwikkelingen

Toxiciteit Een van de grootste problemen met wildtype alfavirale vectoren, is de

inhibitie van eiwitsynthese in de gastheercel, wat uiteindelijk leidt tot apoptose [Ehrengruber 2002]. Kleine mutaties in SIN en SFV non-structurele genen hebben vectoren geproduceerd met een lagere toxiciteit. Deze puntmutaties of deleties werden willekeurig aangebracht in de bewuste genen en er lijkt een correlatie te zijn tussen een verlaagde productie van interferon of andere cytokines en aanhoudende expressie [Agapov et al 1998, Perri et al 2000].

Tijdelijke expressie Door cytotoxiciteit en tijdelijke aard van viraal RNA kan de expressie van transgenen maar kort duren. Zoals hierboven genoemd is het verlagen van de cytotoxiciteit al één van de beschikbare oplossingen voor dit probleem. Echter voor sommige applicaties is de expressie van tijdelijke duur en apoptose gewenst, zoals bij kankertherapieën [Tseng et al 2004].

Transgeen regulatie Regulatie van transgeenexpressie is belangrijk voor functionaliteit van het proces. De meeste promotors die gereguleerd kunnen worden, zijn werkzaam in de nucleus. Aangezien transcriptie van alfavirale vectoren plaatsvindt in het cytoplasma, is regulatie van de alfavirale transgeen expressie niet mogelijk met dit soort promotors en kan er alleen gebruik worden gemaakt van de 26S subgenomic promotor die bij de wildtype vectoren hoort [Ehrengruber 2002]. Temperatuurafhankelijke regulatie maakt regulatie van transgeenexpressie in het cytoplasma mogelijk [Boorsma et al 2000]. Deze temperatuurafhankelijkheid is bewerkstelligd door mutaties in SIN en SFV [Hahn et al 1989, Xiong et al 1989]. GFP expressie was voor SIN bij 31 graden Celsius aanwezig en afwezig bij 37 graden Celsius, voor SFV gold dit andersom. Daarnaast viel op dat bij bepaalde temperaturen transductie van andere cellen de voorkeur had [Ehrengruber 2002].

Overexpressie Voor veel toepassingen is de hoge transgeenexpressie van alfavirale vectoren wenselijk of niet problematisch. Echter in sommige gevallen is over expressie cytotoxisch of er is een bepaalde verhouding met een ander eiwit gewenst [Ehrengruber 2002]. Om lagere expressie niveaus te creëren zijn een aantal puntmutaties in 26S subgenomic RNA promotor van SFV aangebracht [Lundstrom et al 2001]. De corresponderende eiwitniveaus van deze mutaties waren 1%, 3% en 30% van de eiwitniveaus van wildtype vectoren. Green Fluorescent Protein (GFP) werd door de reductie in eiwitniveaus echter onbruikbaar gemaakt, omdat getransduceerde cellen niet worden herkend door de lage GFP

fluorescentie.

Kleine vector In de wildtype vectoren is ruimte voor ongeveer 5 kb aan transgenen [Wahlfors 2000]. Net als bij AAV vectoren is deze capaciteit nadelig, aangezien dat het aantal mogelijke applicaties beperkt. In SIN vectoren is in 2009 een mutatie aangebracht welke de vector 130 nm groter maakte, waardoor er nu een capaciteit van minimaal 18 kb bestaat [Nanda et al 2009].

2.4 Hybride vectoren

Voor een aantal problemen die er zijn met virale vectoren, geldt dat een andere virale vector hier een oplossing voor heeft. De ontwikkeling van hybride vectoren, die gebruik maken van twee of meer componenten van virale vectoren, heeft in de afgelopen 10 jaar plaatsgevonden. Deze hybriden kunnen met kruisingen van vectoreigenschappen de mogelijke applicaties vergroten. Op dit moment richten onderzoekers zich vooral op het verbeteren of toevoegen van integratie bij vectoren, of op het mogelijk maken van langdurige transgeenexpressie met episodale aanwezigheid.

Integratie

Adeno-hybrides Een van de nadelen van adenovirale vectoren is dat de transgeenexpressie niet permanent is, omdat er geen integratie in het humane genoom plaatsvindt. Retrovirale vectoren en AAV vectoren beschikken wel over deze mogelijkheid en daarom zijn er hybriden ontwikkeld met deze vectoren, respectievelijk Adv/RV [Picard-maureau et al 2004] en Adv/AAV [Goncalves et al 2005, 2008]. Daarnaast zijn er ook hybriden met een aantal andere systemen, onder andere Sleeping Beauty transposon (SB) en Cre-loxP die in staat zijn DNA te integreren [Ehrhardt et al 2007, Kubo et al 2006, Sorrel et al 2010, Hausl et al 2010]. Deze hybriden zijn in staat te integreren in het humane genoom dan wel gericht, dan wel willekeurig.

Retro-hybrides Om integratieprofielen te verbeteren zijn er ook hybride retrovirale en lentivirale vectoren ontwikkeld waarbij gerichte integratie wordt bewerkstelligd door DNA-bindende domeinen [Lim et al 2010] en homologe recombinatie na knippen met nuclease [Izmiryan et al 2011]. Daarnaast zijn de SB en Cre-loxP systemen ook met deze vectoren gecombineerd [Bak en Mikkelsen 2011, Huang et al 2010].

AAV-hybrides Hybriden van AAV's

werken ook met DNA-bindende domeinen en homologe recombinatie na het knippen met bepaalde nucleases. De hybriden zijn vernoemd naar de gebruikte nuclease, genaamd AAV/I-Scel [Gellhaus et al 2010], AAV/Anil [Metzger et al 2011] en AVV/ZFN [Handel et al 2012]. Al deze hybrides verzorgen integratie in het humane genoom op artificiële plaatsen.

Herpes-hybrides HSV/AAV, HSV/RV, HSV/EBV/RV en HSV/SB hybriden zijn ontwikkeld om integratie met HSV-1 te bewerkstelligen [Cortes et al 2008, de Felipe et al 2001, Sena-Esteves et al 1999, Sia et al 2010]. Van deze hybriden is alleen HSV/AAV in staat tot gerichte integratie.

Episomaal

Herpes-hybrides Componenten van het eerder genoemde EBV kunnen gebruikt worden om episodale genen te verbeteren zodat zij in staat zijn zichzelf te repliceren. Dit is gelukt voor zowel HSV/EBV [Sia et al 2010] als Adv/EBV [Gil et al 2010]. Een HSV-1 hybride met zogenaamde scaffold/matrix attachment regions, HSV/S/MARS was ook in staat om de vector als episoom te behouden na meer dan 100 replicaties [Lufino et al 2007]. HSV/HAC hybrides, waarbij van de HSV'1 vector een Human Artificial Chromosoom wordt gemaakt door toevoeging van centromeer sequenties. Deze HSV/HAC kunnen verschillende cellijnen transduceren en stabiele transgeenexpressie voor meer dan 3 maanden is mogelijk [Moralli et al 2006].

Voor hybriden geldt dat het onderzoeksveld nog vrij jong is en aangezien hybride systemen nog complexer zijn dan de originele vectoren, is veelvuldig onderzoek vereist om veiligheid te kunnen garanderen. Daarnaast zijn vaak extra productiestappen nodig. Dit maakt dat hybride vectoren voorlopig nog vaak minder efficiënt zijn dan de bestaande vectorsystemen [Huang en Kamihira 2013].

3 Non-virale vectoren

Onder non-virale middelen bestaan oplossingen voor problemen die er zijn met virale vectoren. Recombinatie en reactivatie van virussen, insertie mutagenese en beperkingen in grootte van therapeutische genen komen vrijwel niet voor met non-virale vectoren. De verschillende alternatieven voor virale vectoren hebben echter hun eigen nadelen die ervoor verantwoordelijk zijn dat er nog geen menselijke studies zijn verricht.

3.1 Chemische vectoren

De chemische vectoren zijn onder te verdelen in drie klassen, liposoom-gebaseerde vectoren, polymeer-gebaseerde vectoren en de derde klasse bestaat uit hybriden van de eerste twee. Deze lipide- en polymeercomplexen zijn meestal positief geladen omdat dit voordelen heeft bij het aanpassen van het gastheer DNA. Daarnaast zijn deze vectoren gemakkelijk en goedkoop te produceren en veroorzaken ze geen ziektes [Pezzoli et al 2012]. Ze zijn erg effectief *in vitro*, maar toepassing *in vivo* levert een aantal problemen op.

Obstakel en ontwikkelingen voor chemische vectoren

Biologische instabiliteit Door de positieve lading van de vectoren worden willekeurige elektro-statische verbindingen aangegaan met negatieve serumcomponenten waarbij aggregaten vormen [Li et al 2007]. Dit bemoeilijkt de transfectie. Een oplossing hiervoor is het aanbrengen van een polyethyleen glycol (PEG) coating op de complexen [Luo et al 2012] welke als een schild voor ladingen functioneert. Helaas belemmert het PEG-schild de cellulaire opname en transfectie [Rudolph et al 2002].

Selectiviteit Aangezien chemische vectoren afhankelijk zijn van endocytose voor het binnengaan van de cel, is er sprake van niet-selectieve opname. Om dit te verbeteren kunnen suikers, eiwitten en antilichamen worden toegevoegd aan het vectoroppervlak waardoor gerichte targetopname mogelijk wordt [Issa et al 2006]. Het toevoegen van componenten aan de vector gaat echter ten koste van de positieve lading van de vector, wat de transfectie minder effectief maakt.

Endosomale opname Bij het endocytoseproces hoort opname in een endosoom. Lipidecomplexen zijn in staat het endosoom te verlaten maar polymeercomplexen worden na fusie met het lysosoom afgebroken. Endosoomlytische middelen zijn toegepast, al zijn die niet geschikt voor *in vivo* toepassingen [Pezzoli et al 2012]. De complexen coaten met eiwitten die een gaatje maken in het endosomale membraan is hiervoor een oplossing [Ghosh et al 2008], al gaat ook dit ten koste van de benodigde positieve lading.

Immuunreacties Net als voor virale vectoren geldt dat chemische vectoren niet lichaamseigen zijn en immuunreacties en toxiciteit kunnen opwekken [Kamimura et al 2011]. Aangezien deze reacties minder aanwezig zijn de

bij virale vectoren, wordt in het onderzoeksveld meer aandacht besteed aan de andere beperkingen van non-virale vectoren.

3.2 Fysieke DNA aflevering

Naast de bestaande vectoren die ontworpen zijn om zelfstandig therapeutische genen af te leveren in targetcellen, bestaan er nog een aantal fysieke methodes die gebaseerd zijn op een tijdelijke penetratie van een celmembraan. Voor deze methodes wordt gebruik gemaakt van mechanische, elektrische, ultrasone, hydrodynamische of op lasertechnieken gebaseerde energie (zie tabel 1). De werking van de verschillende methodes zijn al eerder beschreven [Kamimura et al 2011] en vallen buiten het bestek van deze scriptie. Bij deze groep van technieken valt op dat gerichte transfectie op targetcellen ten koste gaat van transductie efficiëntie en dat hierbij weefsel beschadigingen optreden. Bij technieken die wel een efficiënte transductie verzorgen, is een chirurgische procedure vereist voor interne organen. Voor de enige techniek met een redelijk gerichte transfectie en een hoge efficiëntie is katheterisatie vereist. In tabel 1 is een overzicht te vinden van de verschillende vectoren en methoden en hun voordelen en obstakels.

Tabel 1. Een overzicht van vectoren en methodes.

	Vector/Methode	Transfectiekenmerk	Voordelen	Obstakels	
Virale vectoren	Retro-viraal	Oncoretrovirale vectoren	Reverse transcriptie	Stabiele integratie, breed tropisme	Oncomutagenese, recombinatie, mitose-afhankelijk
		Lentivirale vectoren	Reverse transcriptie	Stabiele integratie, mitose-onafhankelijk	Oncomutagenese, recombinatie, productie, tropisme, immunoreacties, restrictiefactoren
		Spumale virale vectoren	Reverse transcriptie	Stabiele integratie, niet pathogeen, lage immunorespons, breed tropisme, blijft aanwezig tot mitose, hoge titers zonder recombinatie	Oncomutagenese, mitose-afhankelijk, restrictiefactoren
	DNA viraal	Adenovirale vectoren	Helper-afhankelijk	Mitose-onafhankelijk, grote vector, geen oncomutagenese	Immunoreacties, tijdelijke expressie
		AAV virale vectoren	Co-infectie	Mitose-onafhankelijk, niet pathogeen, stabiele integratie mogelijk, breed tropisme onder serotypes	Tropisme, immunoreacties, trage conversie, tijdelijke expressie, kleine vector
		HSV virale vectoren	Latentie	Mitose-onafhankelijk, breed tropisme, grote vector, geen oncomutagenese, transgeenregulatie	Toxiciteit, recombinatie, tijdelijke expressie, promotorsilencing
	RNA viraal	Alfavirale vectoren		Snel hoge titers, snel hoge transgeenexpressie, breed tropisme, mild pathogeen, geen oncomutagenese, transgeenregulatie	Toxiciteit, tijdelijke expressie, overexpressie, kleine vector
		Hybride virale vectoren	Samenstelling	Mogelijk veilige stabiele integratie	Extra productiestappen, complexiteit
Non-viraal	Chemisch	Liposoomgebaseerd	positief geladen	Zeer efficiënt in vitro, eenvoudig te produceren	Biologische instabiliteit, niet-selectief, mogelijke immunoreactie
		Polymeergebaseerd	positief geladen	Zeer effectief in vitro, eenvoudig te produceren	Toxiciteit, biologische instabiliteit, niet-selectief, endosomale opname, mogelijke immunoreacties
		Chemische hybriden	positief geladen	Zeer effectief in vitro	Lage activiteit in vivo
	Fysiek	Naaldinjectie	mechanisch	Simpel	Lage efficiëntie, expressie alleen op naaldroute
		Partikelbombardement	Druk	Efficiëntie	Gentransfectie in beperkt gebied, chirurgische ingreep vereist voor interne organen
				Efficiëntie	Weefsel beschadiging, Gentransfectie in beperkt gebied, chirurgische ingreep vereist voor interne organen
		Electroporatie	Elektriciteit		
		Sonoporatie	Ultrasoon geluid	Weefselgericht	Lage efficiëntie, weefsel schade
		Fotoporatie	Laserstraal	Weefselgericht	Lage efficiëntie, weefsel schade
		Magnetoporatie	Magnetisch veld	Weefselgericht	Lage efficiëntie
Hydroporatie	Hydrodynamische druk	Simpel, efficiëntie, weefselgericht	Katheter benodigd bij grote dieren		

*Het non-virale deel van de tabel is overgenomen uit tabel II van Kamimura et al 2011.

4 Conclusie

In de zoektocht naar een perfecte gentransfectie komen veel obstakels naar voren en een ideale universele vector is waarschijnlijk niet waar naar gestreefd moet worden. Voor elke aandoening zal een individuele therapie moeten worden ontwikkeld, waarvan de eigenschappen zo goed mogelijk aansluiten op de wensen.

Voor bijna alle vereisten aan een optimale gentransfer zoals genoemd in de introductie zijn manieren te vinden onder de verschillende virale vectoren. De grootste problemen die zich opwerpen, zijn de immunoreacties en de mogelijkheid dat insertie leidt tot oncogenese. Voor het verlagen van immunoreacties tot verwaarloosbare niveaus is ten eerste meer kennis over het immuunsysteem nodig. Daarmee kan door middel van pseudotyping veel verbetering worden bereikt. Mutagenese is een lastig probleem en ook hier geldt dat meer kennis nodig is, maar hybride vectoren met gerichte insertie of replicerende episomen lijken hiervoor een oplossing te bieden. Met hybriden is het theoretisch gezien mogelijk de positieve eigenschappen van verschillende virale vectoren te combineren en zo een ideale gentransfectie te ontwikkelen voor verschillende therapieën. Helaas is het onderzoeksveld van hybride vectoren nog jong en zou een oplossing nog een tijd op zich kunnen laten wachten.

In vergelijking met virale vectoren staat het onderzoek naar non-virale vectoren nog in de kinderschoenen, met name door problemen met biologische instabiliteit, endosomale opname en gebrek aan selectiviteit, welke de werking *in vivo* ernstig benadelen. Daarnaast is er bij de chemische non-virale vectoren ook sprake van immunoreacties, al zijn deze niet zo extreem als bij virale vectoren. Wanneer deze moeilijkheden worden overwonnen, zijn chemische non-virale vectoren echter zeer interessant door de voordelen met betrekking tot de veiligheid. Voor de fysieke methodes geldt dat ontwikkelingen in techniek en celbiologische kennis een belangrijke bijdrage zouden kunnen leveren aan de vooruitgang van gentherapie. Op dit moment zijn de ontwikkelingen op het gebied van virale vectoren echter zodanig gevorderd dat therapeutische mogelijkheden met non-virale vectoren en fysieke methodes nog lang niet in de buurt komen van de virale vector-gemedieerde mogelijkheden. Beschikbare klinische therapieën en de mogelijkheid om transgeenexpressie te reguleren geven aan dat sommige virale vectoren zich al in een vergevorderd stadium bevinden.

Al met al is gentherapie met virale vectoren het verst gevorderd. Bij het beantwoorden van de onderzoeksvraag of virale vectoren een toekomst hebben naast andere methoden die duidelijke voordelen hebben, kan geconcludeerd worden dat juist deze vergevorderdheid een voordeel is voor virale vectoren. Voor de genoemde virale obstakels lijken oplossingen met non-virale vectoren niet dichterbij dan oplossingen met hybriden, welke misschien zelfs meer voordelen hebben dan non-virale vectoren. De toekomst van gentherapie is voorlopig gelijk aan de toekomst van virale vectoren en virale hybriden, aangezien dit tot nu toe de enige werkzame gentherapeutische methoden *in vivo* zijn. Zelfs wanneer non-virale vectoren en fysieke methoden zich ontwikkelen tot werkzame therapieën *in vivo* zal dit eerder bijdragen aan een breder spectrum van mogelijke therapieën dan leiden tot de vervanging van virale vectoren. Verschillende genetische defecten vereisen op maat gemaakte therapieën en om deze reden zullen verschillende vectoren en methoden eerder naast elkaar bestaan dan dat zij elkaar verdringen. Voorlopig hebben virale vectoren echter een groot voordeel aan hun vergevorderde ontwikkeling en zullen ze niet snel worden ingehaald door andere methoden.

5 Referenties

- Agapov EV, Frolov I, Lindenbach BD, Pragai BM, Schlesinger S, and Rice CM (1998). Non-cytopathogenic Sindbis RNA vectors for heterologous gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:12,989–12,994.
- Arnold GS, Sasser AK, Stachler MD, Bartlett JS (2006). Metabolic biotinylation provides a unique platform for the purification and targeting of multiple AAV vector serotypes. *Mol Ther.* 14(1):97-106. Epub 2006 Apr 19.
- Bak RO, Mikkelsen JG (2011). Mobilization of DNA transposable elements from lentiviral vectors. *Mob Genet Elem.* 1:139–44.
- Bartlett JS, Kleinschmidt J, Boucher RC, Samulski RJ (1999). Targeted adeno-associated virus vector transduction of nonpermissive cells mediated by a bispecific F(ab'γ)2 antibody. *Nat Biotechnol.* 17(2):181-6. Erratum in: *Nat Biotechnol* 1999 Apr;17(4):393.
- Bartosch B, Vitelli A, Granier C, Goujon C, Dubuisson J, Pascale S et al (2003). Cell entry of hepatitis C virus requires a set of co-receptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B1 scavenger receptor. *J Biol Chem* 278: 41624–41630.
- Barquinero J, Eixarch H, Perez-Melgosa M (2004). Retroviral vectors: new applications for an old tool. *Gene Ther.* 11 (Suppl 1):S3–9. [PubMed]
- Blaese RM, Culver KW, Chang L, Anderson WF, Mullen C, Nienhuis A and Carter C, et al (1993). Treatment of severe combined immunodeficiency disease (SCID) due to adenosine deaminase deficiency with CD34⁺ selected autologous peripheral blood cells transduced with a human ADA gene. Amendment to clinical research project, Project 90-C-195, January 10, 1992. *Hum Gene Ther* 4: 521–527.
- Blaese RM, Culver KW, Miller AD, Carter CS, Fleisher T, Clerici M and Shearer G, et al (1995). T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years. *Science* 270: 475 – 480.
- Brown BD, Sitia G, Annoni A, Hauben E, Sergi LS, Zingale A, et al (2007). In vivo administration of lentiviral vectors triggers a type I interferon response that restricts hepatocyte gene transfer and promotes vector clearance. *Blood.* 109(7):2797–805.
- Boorsma M, Nieba L, Koller D, Bachmann MF, Bailey JE, and Renner WA (2000). A temperature-regulated replicon-based DNA expression system. *Nature Biotech.* 18:429–432.
- Caprariello AV, Miller RH, Selkirk SM (2009). Foamy virus as a gene transfer vector to the central nervous system. *Gene therapy* 16(3):448–52.
- Cockrell AS, Ma H, Fu K, McCown TJ and Kafri T (2006). A trans-lentiviral packaging cell line for high-titer conditional self-inactivating HIV-1 vectors. *Mol Ther* 14: 276–284.
- Cortes ML, Oehmig A, Saydam O, Sanford JD, Perry KF, Fraefel C, et al (2008). Targeted integration of functional human ATM cDNA into genome mediated by HSV/AAV hybrid amplicon vector. *Mol Ther.* 16:81–8.
- Daniel R, Smith JA (2008). Integration site selection by retroviral vectors: molecular mechanism and clinical consequences. *Hum Gene Ther.* 19:557–68.
- Danos O, Mulligan RC (1988). Safe and efficient generation of recombinant retroviruses with amphotropic and ecotropic host ranges. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85:6460–4.
- Daya S, Berns KI (2008). Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clin Microbiol Rev.* 21:583–93.
- Dedieu JF, Vigne E, Torrent C, et al (1997). Long term gene delivery into the livers of immunocompetent mice with E1/E4-defective adenoviruses. *J Virol* 71: 4626-37
- de Silva and Bowers WJ (2009). Herpes Virus Amplicon Vectors. *Viruses.* 1;594-629; doi:10.3390/v1030594
- Ehrengruber MU (2002). Alphaviral gene transfer in neurobiology. *Brain Res Bull.* 59(1):13-22.
- Ehrhardt A, Yant SR, Giering JC, Xu H, Engler JA, Kay MA (2007). Somatic integration from an adenoviral hybrid vector into a hot spot in mouse liver results in persistent transgene expression levels in vivo. *Mol Ther.* 15:146–56.
- Fraefel C, Song S, Lim F, Lang P, Yu L, Wang Y, Wild P, Geller AI (1996). Helper virus-free transfer of herpes simplex virus type 1 plasmid vectors into neural cells. *J. Virol.* 70:7190- 7197.
- Friedmann T, Roblin R (1972). Gene therapy for human genetic disease? *Science.* 175(4025):949-55.

- Gellhaus K, Cornu TI, Heilbronn R, Cathomen T (2010). Fate of recombinant adeno-associated viral vector genomes during DNA double-strand break-induced gene targeting in human cells. *Hum Gene Ther.* 21:543–53.
- Ghosn B, Kasturi SP, Roy K (2008). Enhancing polysaccharide-mediated delivery of nucleic acids through functionalization with secondary and tertiary amines. *Curr Top Med Chem.* 8: 331-40.
- Glorioso JC, Fink DJ (2009). Herpes vector-mediated gene transfer in the treatment of chronic pain. *Mol Ther.* 17(1):13-8. doi: 10.1038/mt.2008.213. Epub 2008 Oct 7.
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, et al (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36: 59-74
- Goncalves MA, van Nierop GP, Tijssen MR, Lefesvre P, Knaan-Shanzer S, van der Velde I, et al (2005). Transfer of the full-length dystrophin-coding sequence into muscle cells by a dual high-capacity hybrid viral vector with site-specific integration ability. *J Virol.* 79:3146–62.
- Goncalves MA, Holkers M, van Nierop GP, Wieringa R, Pau MG, de Vries AA (2008). Targeted chromosomal insertion of large DNA into the human genome by a fiber-modified high-capacity adenovirus-based vector system. *PLoS One.* 3:e3084.
- Guo X, Huang L (2012). Recent advances in nonviral vectors for gene delivery. *Acc Chem Res.* 45(7):971-9. doi: 10.1021/ar200151m. Epub 2011 Aug 26.
- Hacein-Bey-Abina S, Le Deist F, Carlier F, et al (2003). A Serious Adverse Event after Successful Gene Therapy for X-Linked Severe Combined Immunodeficiency. *N Engl J Med.* 348:255-256 DOI: 10.1056/NEJM200301163480314
- Hahn YS, Strauss EG, and Strauss JH (1989). Mapping of RNA- temperature-sensitive mutants of Sindbis virus: assignment of complementation groups A, B, and G to nonstructural proteins. *J. Virol.* 63:3142–3150.
- Hanawa H, Persons DA and Nienhuis AW (2005). Mobilization and mechanism of transcription of integrated self-inactivating lentiviral vectors. *J Virol.* 79:8410–8421.
- Handel EM, Gellhaus K, Khan K, Bednarski C, Cornu TI, Muller-Lerch F, et al (2012). Versatile and efficient genome editing in human cells by combining zinc-finger nucleases with adeno-associated viral vectors. *Hum Gene Ther.* 23:321–9.
- Hausl MA, Zhang W, Muther N, Rauschhuber C, Franck HG, Merricks EP, et al (2010). Hyperactive sleeping beauty transposase enables persistent phenotypic correction in mice and canine model for hemophilia B. *Mol Ther.* 18:1896–906.
- Hermonat PL, Muzyczka N (1984). Use of adeno-associated virus as a mammalian DNA cloning vector: transduction of neomycin resistance into mammalian tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 81(20):6466-70.
- Hill CL, Bieniasz PD, McClure MO (1999). Properties of human foamy virus relevant to its development as a vector for gene therapy. *J Gen Virol.* 80(Pt 8):2003–9.
- Howarth JL, Lee YB, Uney JB (2010). Using viral vectors as gene transfer tools (Cell Biology and Toxicology Special Issue: ETCS-UK 1 day meeting on genetic manipulation of cells). *Cell Biol Toxicol.* 26(1):1-20. doi: 10.1007/s10565-009-9139-5. Epub 2009 Oct 15. Wahlfors JJ, Zullo SA, Loimas S, Nelson DM, Morgan RA (2000). Evaluation of recombinant alphaviruses as vectors in gene therapy. *Gene Ther.* 7(6):472-80.
- Huang S, Kamihira M (2013). Development of hybrid viral vectors for gene therapy. *Biotechnol Adv.* 31(2):208-23. doi: 10.1016/j.biotechadv.2012.10.001. Epub 2012 Oct 13.
- Huang S, Kawabe Y, Ito A, Kamihira M (2012). Adeno-associated virus Rep-mediated targeting of integrase-defective retroviral vector DNA circles into human chromosome 19. *Biochem Biophys Res Commun.* 417(1):78-83. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.11.059. Epub 2011 Nov 22.
- Huang S, Kawabe Y, Ito A, Kamihira M (2010). Cre recombinase-mediated site-specific modification of a cellular genome using an integrase-defective retroviral vector. *Biotechnol Bioeng* 107:717–29.
- Issa MM, Koping-Hoggard M, Tommeraaas K et al (2006). Targeted gene delivery with trisaccharide-substituted chitosan oligomers in vitro and after lung administration in vivo. *J Control.* 115: 103-12.
- Izmiryan A, Basmaciogullari S, Henry A, Paques F, Danos O (2011). Efficient gene targeting

mediated by a lentiviral vector-associated meganuclease. *Nucleic Acids Res.* 39:7610–9.

Jin BK, Belloni M, Conti B, Federoff HJ, Starr R, Son JH, Baker H, Joh TH (1996). Prolonged in vivo gene expression driven by a tyrosine hydroxylase promoter in a defective herpes simplex virus amplicon vector. *Hum. Gene Ther.* 7:2015–2024.

Kamimura K, Suda T, Zhang G, Liu D (2011). *Advances in Gene Delivery Systems. Pharmaceut Med.* 25(5):293–306.

Kang Y, Xie L, Tran DT, Stein CS, Hickey M, Davidson BL et al (2005). Persistent expression of factor VIII in vivo following nonprimate lentiviral gene transfer. *Blood* 106: 1552–1558.

Kaplitt MG, Kwong AD, Kleopoulos SP, Mobbs CV, Rabkin SD, Pfaff DW (1994). Preproenkephalin promoter yields region-specific and long-term expression in adult brain after direct in vivo gene transfer via a defective herpes simplex viral vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 91:8979–8983.

Keeler CE (1947). *Gene Therapy. J Hered.* 38(10):294–8.

Kobinger GP, Weiner DJ, Yu QC, Wilson JM (2001). Filovirus-pseudotyped lentiviral vector can efficiently and stably transduce airway epithelia in vivo. *Nat Biotechnol* 19: 225–230.

Kocot FJ, Carter BJ, Garon CF, Rose JA (1973). Self-complementarity of terminal sequences within plus or minus strands of adenovirus-associated virus DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 70(1):215–9

Kubo S, Seleme MC, Soifer HS, Perez JL, Moran JV, Kazazian Jr HH, et al (2006). L1 retrotransposition in nondividing and primary human somatic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:8036–41.

Laimbacher AS, Fraefel C (2012). Gene delivery using helper virus-free HSV-1 amplicon vectors. *Curr Protoc Neurosci. Chapter 4:Unit 4.14.* doi: 10.1002/0471142301.ns0414s60.

Lewis PF, Emerman M (1994). Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus. *J Virol.* 68(1):510–6.

Li W, Szoka FC, Jr (2007). Lipid-based nanoparticles for nucleic acid delivery. *Pharm Res.* 24: 438–49.

Lim KI, Klimczak R, Yu JH, Schaffer DV (2010). Specific insertions of zinc finger domains into Gag–

Pol yield engineered retroviral vectors with selective integration properties. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107:12475–80.

Liu XH, Xu W, Russ J, Eiden LE, Eiden MV (2011). The host range of gammaretroviruses and gammaretroviral vectors includes post-mitotic neural cells. *PLoS One.* 6(3):e18072. doi: 10.1371/journal.pone.0018072.

Lombardo A, Genovese P, Beausejour CM, et al (2007). Gene editing in human stem cells using zinc finger nucleases and integrase-defective lentiviral vector delivery. *Nat Biotechnol.* 25:1298–306.

Louis Jeune V, Joergensen JA, Hajjar RJ, Weber T (2013). Pre-existing Anti-Adeno-Associated Virus Antibodies as a Challenge in AAV Gene Therapy. *Hum Gene Ther Methods.* 24(2):59–67. doi: 10.1089/hgtb.2012.243. Epub 2013 Apr 3

Lufino MM, Manservigi R, Wade-Martins R (2007). An S/MAR-based infectious episomal genomic DNA expression vector provides long-term regulated functional complementation of LDLR deficiency. *Nucleic Acids Res.* 35:e98.

Lundstrom K, Ziltener P, Hermann D, Schweitzer C, Richards JG, and Jenck F (2001). Improved Semliki Forest virus vectors for receptor research and gene therapy. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 21:55–70.

Luo X, Feng M, Pan SR et al (2012). Charge shielding effects on gene delivery of polyethylenimine/DNA complexes: PEGylation and phospholipid coating. *J Mater Sci-Mater M.* 23: 1685–95.

Mátraí J, Chuah MK, VandenDriessche T (2010). Recent advances in lentiviral vector development and applications. *Mol Ther.* 18(3):477–90. doi: 10.1038/mt.2009.319. Epub 2010 Jan 19.

McCarty DM (2008). Self-complementary AAV vectors; advances and applications. *Mol Ther.* 16(10):1648–56. doi: 10.1038/mt.2008.171. Epub 2008 Aug 5.

Metzger MJ, McConnell-Smith A, Stoddard BL, Miller AD (2011). Single-strand nicks induce homologous recombination with less toxicity than double-strand breaks using an AAV vector template. *Nucleic Acids Res.* 39:926–35.

Moralli D, Simpson KM, Wade-Martins R, Monaco ZL (2006). A novel human artificial chromosome gene expression system using herpes simplex virus type 1 vectors. *EMBO Rep.* 7: 911–8.

- Muruve DA (2004). The innate immune response to adenovirus vectors. *Hum Gene Ther.* 15(12):1157-66.
- Nanda K, Vancini R, Ribeiro M, Brown DT, Hernandez R (2009). A high capacity Alphavirus heterologous gene delivery system. *Virology.* 390(2):368-73. doi: 10.1016/j.virol.2009.05.026. Epub 2009 Jun 16.
- Perri S, Driver DA, Gardner JP, Sherrill S, Belli BA, Dubensky TW Jr, and Polo JM (2000). Replicon vectors derived from Sindbis virus and Semliki Forest virus that establish persistent replication in host cells. *J. Virol.* 74, 9802–9807.
- Pezzoli D, Chiesa R, De Nardo L, Candiani G (2012). We still have a long way to go to effectively deliver genes! *J Appl Biomater Funct Mater.* 10(2):e82-91. doi: 10.5301/JABFM.2012.9707.
- Picard-Maureau M, Kreppel F, Lindemann D, Juretzek T, Herchenroder O, Rethwilm A, et al (2004). Foamy virus–adenovirus hybrid vectors. *Gene Ther.* 11:722–8.
- Philpott NJ and Thrasher AJ (2007). Use of nonintegrating lentiviral vectors for gene therapy. *Hum Gene Ther* 18: 483–489.
- Pulicherla N, Asokan A (2011). Peptide affinity reagents for AAV capsid recognition and purification. *Gene Ther.* 18(10):1020-4. doi: 10.1038/gt.2011.46. Epub 2011 Apr 14.
- Raper SE, Chirmule N, Lee FS, Wivel NA, Bagg A, Gao GP, Wilson JM, Batshaw ML (2003). Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab.* 80(1-2):148-58.
- Rasmussen M, Kong L, Zhang GR, Liu M, Wang X, Szabo G, Curthoys NP, Geller AI (2007). Glutamatergic or GABAergic neuron-specific, long-term expression in neocortical neurons from helper virus-free HSV-1 vectors containing the phosphate-activated glutaminase, vesicular glutamate transporter-1, or glutamic acid decarboxylase promoter. *Brain Res.* 1144:19-32.
- Rauschhuber C, Noske N, Ehrhardt A (2012). New insights into stability of recombinant adenovirus vector genomes in mammalian cells. *Eur J Cell Biol.* 91(1):2-9. doi: 10.1016/j.ejcb.2011.01.006. Epub 2011 Mar 25.
- Roe T, Reynolds TC, Yu G, Brown PO (1993). Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *EMBO J.* 12:2099–108.
- Rudolph C, Schillinger U, Plank C et al (2002). Nonviral gene delivery to the lung with copolymer-protected and transferrin-modified polyethylenimine. *Biochim Biophys Acta.* 1573: 75-83.
- Samuel CE (2001). Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev.* 14(4):778–809.
- Schnepp BC, Jensen RL, Chen CL, Johnson PR, Clark KR. Characterization of adeno-associated virus genomes isolated from human tissues. *J Virol.* 2005;79:14793–14803.
- Shi W, Arnold GS, Bartlett JS (2001). Insertional mutagenesis of the adeno-associated virus type 2 (AAV2) capsid gene and generation of AAV2 vectors targeted to alternative cell-surface receptors.. *Hum Gene Ther.* 12(14):1697-711.
- Sia KC, Chong WK, Ho IA, Yulyana Y, Endaya B, Huynh H, et al (2010). Hybrid herpes simplex virus/Epstein–Barr virus amplicon viral vectors confer enhanced transgene expression in primary human tumors and human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Gene Med.* 12:848–58.
- Smith RH (2008). Adeno-associated virus integration: virus versus vector. *Gene Ther.* 15:817–22.
- Song S, Wang Y, Bak SY, Lang P, Ullrey D, Neve RL, O'Malley KL, Geller AI (1997). An HSV-1 vector containing the rat tyrosine hydroxylase promoter enhances both long-term and cell type-specific expression in the midbrain. *J. Neurochem.* 68:1792-1803.
- Spergel JM, Hsu W, Akira S, Thimmappaya B, Kishimoto T, Chen-Kiang S (1992). NF-IL6, a member of the C/EBP family, regulates E1A-responsive promoters in the absence of E1A. *J Virol* 66(2):1021-30
- Sorrell DA, Robinson CJ, Smith JA, Kolb AF (2010). Recombinase mediated cassette exchange into genomic targets using an adenovirus vector. *Nucleic Acids Res.* 38:e123.
- Staal FJ, Pike-Overzet K, Ng YY, van Dongen JJ (2008). Sola dosis facit venenum. Leukemia in gene therapy trials: a question of vectors, inserts and dosage? *Leukemia.* 22(10):1849-52. doi: 10.1038/leu.2008.219. Epub 2008 Sep 4.

- Stachler MD, Bartlett JS (2006). Mosaic vectors comprised of modified AAV1 capsid proteins for efficient vector purification and targeting to vascular endothelial cells. *Gene Ther.* 13(11):926-31.
- Trobridge GD (2009). Foamy virus vectors for gene transfer. *Expert Opin Biol Ther.* 9(11): 1427–1436. doi:10.1517/14712590903246388.
- Trobridge GD, Miller DG, Jacobs MA, Allen JM, Kiem HP, Kaul R et al (2006). Foamy virus vector integration sites in normal human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 1498–1503.
- Tseng JC, Levin B, Hurtado A, Yee H, Perez de Castro I, Jimenez M, Shamamian P, Jin R, Novick RP, Pellicer A, Meruelo D (2004). Systemic tumor targeting and killing by Sindbis viral vectors. *Nat Biotechnol.* 22(1):70-7. Epub 2003 Nov 30.
- VandenDriessche T, Thorrez L, Naldini L, Follenzi A, Moons L, Berneman Z et al (2002). Lentiviral vectors containing the human immunodeficiency virus type-1 central polypurine tract can efficiently transduce nondividing hepatocytes and antigen-presenting cells in vivo. *Blood* 100: 813–822.
- Verma IM, Weitzman MD (2005). Gene therapy: twenty-first century medicine. *Annu Rev Biochem.* 74:711-38.
- Vigna E, Naldini L (2000). Lentiviral vectors: excellent tools for experimental gene transfer and promising candidates for gene therapy. *J Gene Med.* 2(5):308-16.
- Walther W, Stein U (2000). Viral vectors for gene transfer: a review of their use in the treatment of human diseases. *Drugs.* 60(2):249-71.
- Wanisch K and Yáñez-Muñoz RJ (2009). Integration-deficient lentiviral vectors: a slow coming of age. *Mol Ther* 17: 1316–1332. Schroder AR, Shinn P, Chen H, Berry C, Ecker JR, Bushman F (2002). HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell.* 110(4):521–9.
- Witting SR, Li LH, Jasti A, Allen C, Cornetta K, Brady J, Shivakumar R, Peshwa MV (2012). Efficient large volume lentiviral vector production using flow electroporation. *Hum Gene Ther.* (2):243-9. doi: 10.1089/hum.2011.088. Epub 2011 Oct 24
- Wu J, Zhao W, Zhong L, Han Z, Li B, Ma W, Weigel-Kelley KA, Warrington KH, Srivastava A (2007). Self-complementary recombinant adeno-associated viral vectors: packaging capacity and the role of rep proteins in vector purity. *Hum Gene Ther.* 18(2):171-82.
- Wu X, Li Y, Crise B, Burgess SM (2003). Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science.* 300(5626):1749–51.
- Xiong C, Levis R, Shen P, Schlesinger S, Rice CM, and Huang HV (1989). Sindbis virus: an efficient, broad host range vector for gene expression in animal cells. *Science* 243:1188–1191.
- Yang Y, Nunes FA, Berencsi K, et al (1994). Inactivation of E2A in recombinant adenovirus improves transgene persistence and decreases inflammatory response in mouse liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 7: 362-9
- Yu SF, Baldwin DN, Gwynn SR, Yendapalli S, Linial ML (1996). Human foamy virus replication: a pathway distinct from that of retroviruses and hepadnaviruses. *Science.* 271(5255):1579–82.
- Yu SF, Sullivan MD, Linial ML (1999). Evidence that the human foamy virus genome is DNA. *Journal of virology.* 73(2):1565–72.
- Zhang GR, Wang X, Yang T, Sun M, Zhang W, Wang Y, Geller AI (2000). A tyrosine hydroxylase-neurofilament chimeric promoter enhances long-term expression in rat forebrain neurons from helper virus-free HSV-1 vectors. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 2000, 84, 17-31.
- Ziegler L, Yang L, Joo K, Yang H, Baltimore D and Wang P (2008). Targeting lentiviral vectors to antigen-specific immunoglobulins. *Hum Gene Ther* 19:861–872.