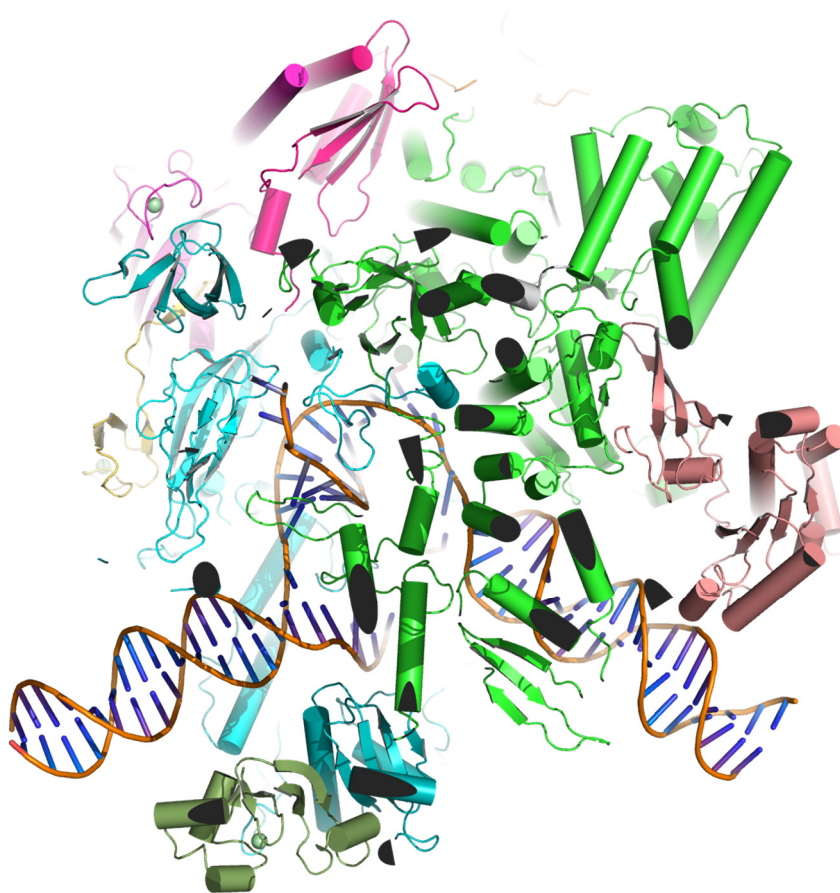


Projektnummer/Project no  
A402021  
Kund/Customer  
Fö  
FoT-område  
Inget FoT-områdeFörfattare/Author  
Fredrik EkströmDatum/Date  
2021-02-04  
Memo nummer/Number  
FOI Memo 7548

## *de novo* syntes av virus

Nina Forsgren, Jonas Näslund, Stefan Nord och Fredrik Ekström

*Omslagsbilden visar en 3D struktur av RNA polymeras II som transkriberar DNA till mRNA (pdb id. 5XON)*

Titel/Title  
de novo syntes av virusMemo nummer/Number  
FOI Memo 7548

# 1 Målgrupp

Detta memorandum vänder sig till läsaren som har intresse av en fördjupad populärvetenskaplig beskrivning av den forskning och de tekniker som ligger till grund för modifiering och syntes av virus. Förmågan att syntetisera virus har utvecklats för att bedriva legitim forskning som exempelvis för att utveckla vaccin mot Covid-19. Det finns dock farhågor om att teknikerna och kunskapen kan missbrukas med antagonistiskt syfte; exempelvis för att återskapa det utrotade smittkoppsviruset. Fokus ligger därför på molekylärbiologiska metoder som har utvecklats inom forskningen på tre grupper av virus som anses utgöra en speciell risk för användning i bioterrorism eller som biologiska vapen. De inledande kapitlen ger en vetenskaplig översikt över de viktigaste forskningsområdena och vänder sig till läsare med en grundläggande naturvetenskaplig kunskap. Det avslutande kapitlet, *Möjliggörande tekniker*, vänder sig till läsare med kunskap om molekylärbiologiska metoder eller som har ett intresse av hotbedömning; det har en högre teknisk nivå och syftar till att ge perspektiv på forskningsfältets komplexitet samt att ge uppslag för vidare läsning i de vetenskapliga originalartiklar som refereras.

Titel/Title  
de novo syntes av virusMemo nummer/Number  
FOI Memo 7548

## 2 Sammanfattning

På ett övergripande plan motiveras modifiering eller syntetisering av virus i behovet av grundläggande biologisk forskning, av medicinska frågeställningar eller för att nyttja virusens speciella förmåga att bära genetisk information (vektor) och till bioteknologiska applikationer. Generella molekylärbiologiska metoder för att bedriva sådan forskning har funnits tillgängliga sedan början av 1980-talet. Konstruktion av syntetiska virus är ett viktigt verktyg som möjliggör nya sätt att ytterligare förstå en organisms egenskaper och gör det också möjligt att återuppliva virus som inte längre existerar i naturen. Idag är det sannolikt möjligt att på helt syntetisk väg framställa eller modifiera de flesta av de virus som utpekats som tänkbara för användning vid bioterrorism eller som biologiska stridsmedel. Detta memorandum ger en översikt av några av de molekylärbiologiska metoder som används för att genetiskt modifiera eller syntetisera virus och visar på flera praktiskt krävande moment, behov av speciell infrastruktur och detaljerad kunskap om virusets genom samt en generell kunskap om virologiska och molekylärbiologiska metoder. Vetenskapens bristande kunskap om virusens mycket unika biologi utgör ytterligare en utmaning vid modifiering och syntes av virus. Samtidigt ökar betydelsen av tekniker som möjliggör syntetisering eller modifiering av virus inom forskning, medicin och inte minst inom bioteknologiska applikationer. Ett bra exempel är Covid-19 pandemin där svensk och internationell krisberedskap är direkt beroende av kunskap kring coronavirus och en förmåga att bedriva avancerad forskning kring coronavirus.

En **vektor** används för att överföra genetisk information mellan olika celler och är ett centralt verktyg inom molekylärbiologin. Förutom virus kan bland annat **plasmider**, fager, cosmider eller artificiella kromosomer användas som vektorer

Ett **genom**, eller **arvs massa** är en organisms samtliga gener. En **gen** är en avgränsad del av arvs massan som innehåller instruktioner för att t.ex. tillverka ett protein

Titel/Title  
de novo syntes av virusMemo nummer/Number  
FOI Memo 7548

### 3 Varför bedrivs forskning med förändrade eller syntetiserade virus?

Utvecklingen av de generella molekylärbiologiska metoder som används för att modifiera eller syntetisera virus sker inom den akademiska grundforskningen för att undersöka frågeställningar kring virusens biologi. Som forskningsobjekt är virus unika eftersom de är beroende av sin värdcell, något som medför att nästan all virologisk forskning innefattar infektionsstudier och studier av patogenes eller virulens. Konsekvensen av detta är att virologisk forskning till sin natur är applicerad. I takt med läkemedelsindustrins framväxt och intresse för infektioner orsakade av virus har metoderna för att modifiera eller syntetisera virus också fått en användning inom läkemedelsindustrin t.ex. vid utveckling av antivirala substanser för behandling av sjukdomar som AIDS och Hepatit C. Virus och metoder för att manipulera virus utvecklas också för medicinska och bioteknologiska applikationer. Ett aktuellt exempel är Covid-19 vaccinkandidaten ChAdOx1 nCoV-19 där produktionen av en komponent (antigen) hos SARS-CoV2 sker i patientens celler efter de infekterats av ett ofarligt adenovirus som bär arvs massa för det specifika antigenet (1, 2). Vaccinet är resultatet av *gain-of-function*<sup>1</sup> (GOF)-forskning där ett adenovirus modifierats så att det fått en ny egenskap och kan agera vektor för produktion av ett antigen specifikt för SARS-CoV2 virus. Ur ett *dual use*-perspektiv har GOF-studier utpekats som potentiellt problematiska eftersom de kan resultera i ett virus med helt nya och potentiellt farliga egenskaper (3). Virus som har växter som värd (växtpatogener) orsakar betydande skador inom jordbruket och eftersom växter dessutom bedöms ha en stor potential inom bioteknologin bedrivs en omfattande forskning som innefattar modifiering och syntes av virus även inom detta område (4).

**Modifiering** av virus avser begränsade förändringar av arvs massan medan **de novo** syntes syftar på nytillverkning av virus från de enkla byggstenar (nukleotider) som bygger upp arvs massan. I dagsläget används arvs massa/genom från existerande virus som förlaga vid *de novo* syntes.

Ett **antiviralt** läkemedel hämmar virusets tillväxt genom att störa funktionen av proteiner som är viktiga för viruset livscykel.

Ett **antigen** är en del av en organism som aktiverar människans immunsystem, något som är centralt för vaccins funktion.

---

<sup>1</sup> Förvärvat egenskap.

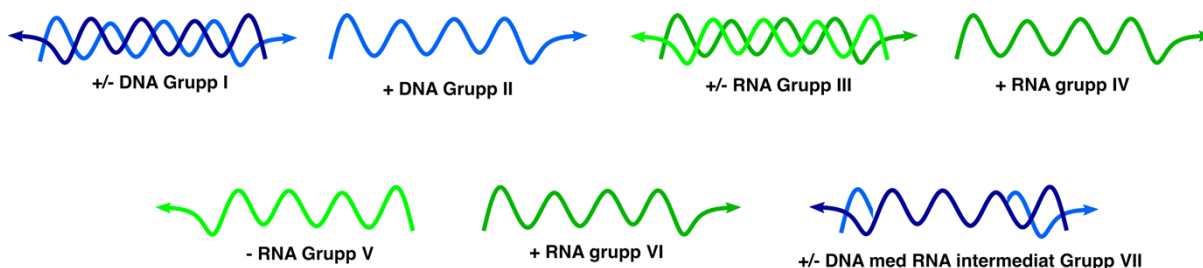
Titel/Title  
de novo syntes av virusMemo nummer/Number  
FOI Memo 7548

## 4 Baltimore-schemat - en klassificering av virus

Virus har en exceptionell mångfald och endast en bråkdel av alla virus har studerats av vetenskapen. En aktuell uppskattning kom till slutsatsen att det finns minst 320 000 okända virus som har ett däggdjur som värd (5), och varje år rapporteras om nya virus som infekterar människor (6). En metod för att systematisera och klassificera virus baserat på deras genetiska material presenterades i början av 70-talet av virologen Prof. David Baltimore (7). Till skillnad mot traditionell taxonomi utgår det så kallade Baltimore-schemat från det genetiska materialets kemiska sammansättning. Beroende på om virusets genom består av DNA eller RNA, om det är enkel eller dubbelsträngat och om det har en positiv eller negativ polaritet klassificeras virus in i sju olika grupper (se figur 1).

**DNA** utgör arvs massa i nästan alla organismer utom vissa virus och fager som i stället har en arvs massa som består av RNA.

**RNA** är nära besläktat med DNA och finns i alla levande organismer. RNA har en lägre stabilitet än DNA och används bland annat som templat vid proteinsyntes (**mRNA**).



**Figur 1.** Baltimore-schemat delar in virus i sju olika grupper efter arvs massans egenskaper.

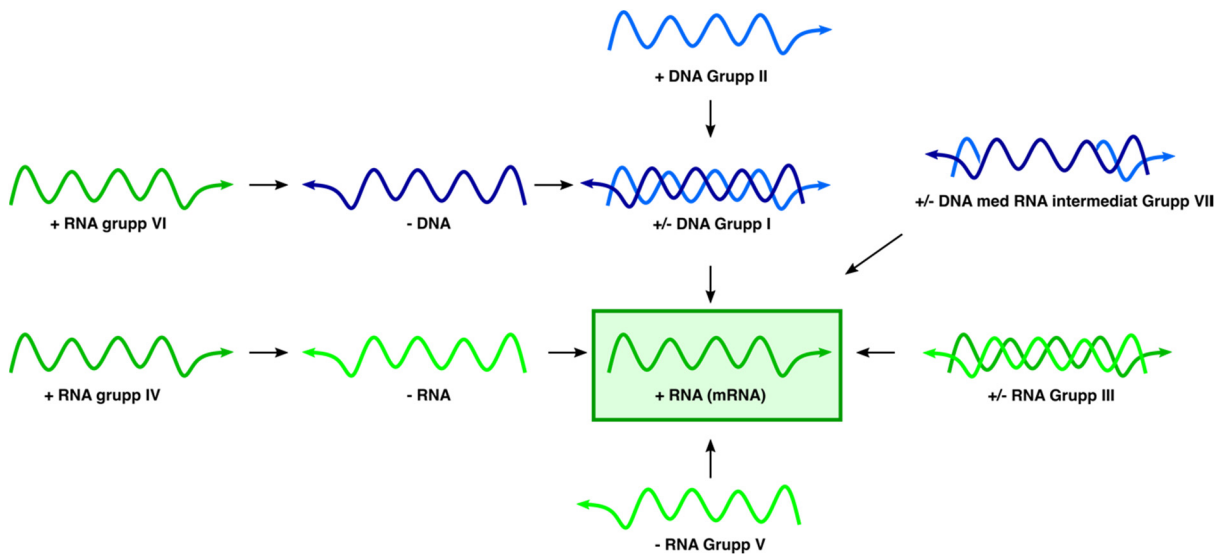
Centralt i Baltimore-schemat är enkelsträngat RNA med positiv polaritet, också känt som budbärar-RNA (mRNA). För att en enskild viruspartikel ska kunna fortplanta sig behöver den dels tillgång till värdcellens system för att tillverka RNA eller DNA, men också tillgång till världens maskineri för att tillverka de proteiner (proteinsyntes) som viruset behöver. Eftersom mRNA fungerar som ett templat till proteinsyntesen måste samtliga virus, oavsett vilken grupp de tillhör i Baltimore-schemat, transformera sin arvs massa till mRNA för att kunna producera protein i värdcellen och replikera sig. Beroende på vilken grupp viruset tillhör involverar transformationen till mRNA ett eller flera olika steg (se figur 2).

**Proteinsyntes** eller *translation*, är den process som utgående från genetisk information (mRNA) och enkla kemiska föreningar (peptider) tillverkar proteiner.

**Proteiner** är komplexa molekyler som har en viktig roll i nästan alla biologiska processer.

**Replikation** är den process som ökar antalet kopior av virusets arvs massa.

**Transkription** är den process där mRNA (*transkript*) produceras från virusets genom.

Titel/Title  
de novo syntes av virusMemo nummer/Number  
FOI Memo 7548

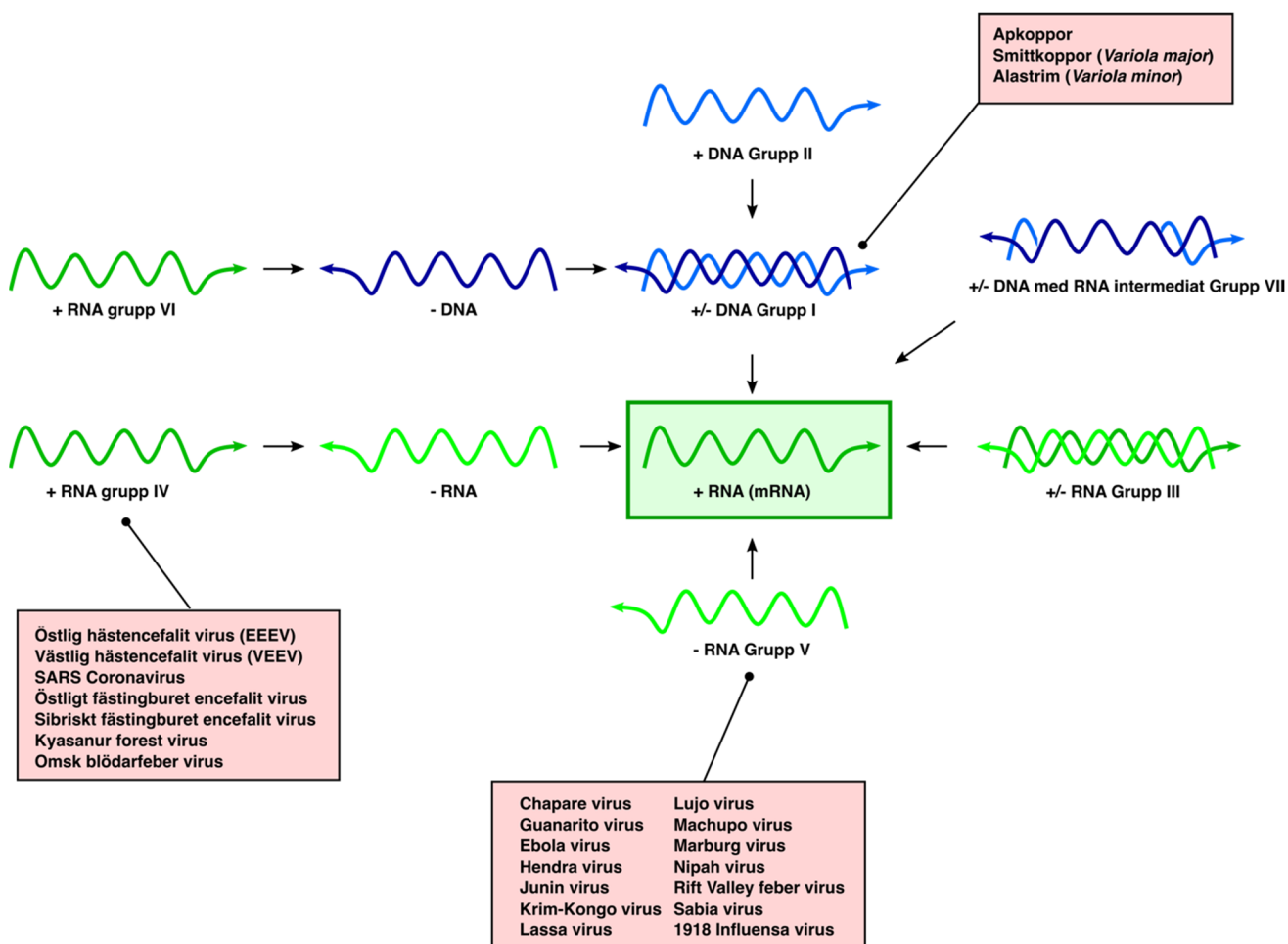
**Figur 2.** Beroende på den kemiska sammansättningen av virusets arvs massa krävs olika typer av transformationer för att generera mRNA.

Baltimore-schemat har ingen direkt koppling till virusens evolutionära historia utan baseras enbart på sättet som transkriptionen av virusets arvs massa sker på. Virus som tillhör samma grupp har ofta samma typ av mekanismer även för att replikera genomet. Därför ger schemat en insikt i både transkription och replikation, två processer som är av central betydelse vid modifiering eller *de novo*-syntes av virus.

Titel/Title  
de novo syntes av virusMemo nummer/Number  
FOI Memo 7548

## 5 Virus med potential för antagonistisk användning

Den amerikanska myndigheten Centre for Disease Control (CDC) inventerar fortlöpande mikroorganismer och toxiner som har potential att utgöra ett allvarligt hot mot folkhälsa och säkerhet, djur och växthälsa eller produkter framställda från djur eller växer. Inventeringen ligger till grund för en lista över valda ämnen (eng. *select agents*) som bland annat innehåller bakterier, virus och toxiner som historiskt vapenförts i offensiva B-program i USA och Sovjetunionen. Den globala forskningen kring dessa ämnen syftar till att skydda mot naturliga utbrott och antagonistisk användning genom att utveckla diagnostik, skyddsmaterial, vacciner, läkemedel och behandlingsstrategier. Vissa ämnen på listan är viktiga verktyg inom grundläggande biologisk forskning eller har viktiga medicinska applikationer som t.ex. *Clostridium botulinum* neurotoxin (BoNT). Listade virus återfinns i Baltimore-schemats grupp I, IV och V (se figur 3). Modifierade eller syntetiserade varianter av bland annat alfavirus från grupp IV, används inom cancerterapi (8), något som bidragit till att molekylärbioologiska verktyg utvecklats för dessa virus. Samtliga tre grupper omfattar virus som har visats möjliga att *de novo* syntetiseras.



**Figur 3.** Virus som utpekats för möjlig användning inom bioterrorism eller som biologiska stridsmedel tillhör grupp I, IV och V i Baltimore-schemat.

Titel/Title  
de novo syntes av virusMemo nummer/Number  
FOI Memo 7548

## 6 Dubbelsträngade DNA virus (grupp I)

Av speciellt intresse inom denna grupp är poxvirus (familjen *Poxviridae*), som bland annat omfattar smittkoppor. Dessa virus är komplexa och utmärks bland annat genom deras stora genom (ca 200 kbp) och att deras replikation sker i cytoplasman av infekterade celler vilket gör att de förutom genomets också behöver proteiner som packas i virionen (9). Trots att smittkoppor förklarades utrotade av WHO 1980 finns farhågor att ett smittkoppsvirus, rekonstruerat från den publikt tillgängliga DNA-sekvensen och kemiskt syntetiserat DNA, kan användas för bioterrorism eller som ett biologiskt stridsmedel. I en kontroversiell artikel som publicerades 2018, demonstrerade ett kanadensiskt forskarlag *de novo* syntes av det närbesläktade hästkoppsviruset (10), något som visar att de tekniska utmaningarna är hanterbara för erfarna forskare med tillgång till nödvändig infrastruktur. Forskarna rekonstruerade hästkoppsviruset genom att ersätta vissa delar av genomets med sekvens från närbesläktade virus, sedan syntetiserade forskargruppen genomets i 10 fragment och använde enzymer från ett hjälpvirus (*Shope fibroma* virus, SFV), för att generera infektiösa virioner (10). Studien visar att aktörer med en hög förmåga kan *de novo* syntetisera virus från *Poxviridae* med nuvarande kunskap och teknologi (10).

Storleken på ett virus arvs massa mäts ofta i **kbp**, kilobaspar (tusen baspar). Små virus har ett genom om ca 7-12 kbp medan stora virus kan ha en arvs massa som är större än 300 kbp.

En cells **cytoplasma** är det material som finns innanför cellväggen med undantag av **kärnan** (som innehåller arvs massan).

En **virion** är den infekterande delen av ett virus som innehåller arvs massa i form av RNA eller DNA och omges av ett skyddande hölje.



Titel/Title  
de novo syntes av virusMemo nummer/Number  
FOI Memo 7548

## 7 Positivt strängade RNA-virus (grupp IV)

Till gruppen hör många virus som orsakar sjukdom i människa, bland annat Coronavirus, Picornavirus (orsakar t.ex. förkylning, kräksjuka och polio), Flavivirus (orsakar t.ex. hepatit C) och Togavirus (orsakar t.ex. Ockelbosjukan). Dessa virus har ett genom som är infektiöst när det introduceras till värdcellen eftersom värdcellens ribosomer direkt kan translatera det virala RNA:t (mRNA) till proteiner. De flesta *reverse genetics*<sup>2</sup> systemen för dessa virus baseras på transfektion av antingen en plasmid eller av RNA transkriberat från plasmid till mottagliga celler.

Av speciellt intresse är alfavirus, en grupp i Togavirus familjen som består av ett trettital virus inklusive några som ingick i USA:s och Sovjetunionens offensiva B-vapenprogram. Dessa virus har ett litet genom (ca 12 kbp) och den omfattande forskningen kring dessa virus har resulterat i väl etablerade metoder för deras syntes och modifiering. Alfavirus har egenskaper som gör dem till lämpliga vektorer för att introducera gener i en rad olika celltyper och de har bland annat använts för att uttrycka cytokiner, toxiska proteiner och hämmare

av angiogenes i cancerceller (11). Picornavirus är RNA-virus med mycket små genom (7-9 kb) som är kapsid-skyddade (tex Poliovirus och Rhinovirus). Forskningen kring Poliovirus har varit framgångsrik vad gäller utveckling av och strategier för exempelvis vaccin och är ett flitigt använt modellsystem för att förstå RNA-virus patogenes och biologi. Den teknik som Racaniello och Baltimore utvecklade och använde för att skapa den första infektiösa cDNA-klonen av poliovirus 1981 (12), har anpassats till flera andra picornavirus däribland Coxsackie B virus och Rhinovirus. Coronavirus är höljebärande virus med det största nu kända RNA-virusgenomet (26-32 kb). Storleken på genomet utgör en utmaning vid *de novo* syntes av coronavirus och flera strategier för syntes har utvecklats (13, 14). Flavivirus är små (10-12 kb genom) höljebärande virus som orsakar sjukdomar som exempelvis denguefeber och gula febern. Framsteg i produktionen av rekombinanta flavivirus har varit viktigt för design av nya vaccin mot dessa sjukdomar.

**Reverse genetics** definieras (inom virologi) som skapande av RNA-virus helt från klonat DNA. Det kan även ses som en molekylärbiologisk princip som syftar till att introducera en förändring i arvsmassan och studera hur den påverkar organismen.

**Transfektion** är en metod där DNA eller RNA förs in i en cell.

**Kapsid** är det yttre skal (kapsel) av proteiner som skyddar virusets arvsmassa.

---

<sup>2</sup> Omvänd genetik.

Titel/Title  
de novo syntes av virusMemo nummer/Number  
FOI Memo 7548

## 8 Negativt strängade RNA-virus (grupp V)

Den minimala infektiösa partikeln för negativt strängade RNA-virus består av ett ribonukleoproteinkomplex av viralt RNA, virala nukleoproteiner och RNA-beroende RNA-polymeraser. I motsats till positivt strängade RNA-virus (grupp IV), kan negativt strängat RNA inte direkt initiera infektion när det uttrycks eller transfekteras till en mottaglig cellinje. Detta medför att det generellt är svårare att rekonstruera negativt strängade RNA-virus än positivt strängade RNA-virus (15). Gruppen innehåller virus som orsakar allvarliga sjukdomar som exempelvis Ebola, 1918 års influensa (Spanska sjukan), mässling och rabies. Redan 1994 rapporterades det om en metod för att generera infektiöst rabies virus (RV) utan något hjälpvirus (16). RV har ett förhållandevis litet genom om ca 12 kbp som består av ett enda segment. Redan två år senare användes en liknande strategi för att rekonstruera ett genom bestående av tre segment (17). Även system för att rekonstruera influensa A viruset (18) och mässling viruset (19) etablerades tidigt genom att överföra kritiska gener till hjälpplasmider, en strategi som för vissa negativt strängade virus helt eliminerar behovet av hjälpvirus.

Titel/Title  
de novo syntes av virusMemo nummer/Number  
FOI Memo 7548

## 9 Möjliggörande tekniker

Med begreppet *möjliggörande teknik* avses tekniker, metoder eller strategier som används för modifiering eller *de novo* syntes av virus. I det här kapitlet diskuteras några av de viktigaste möjliggörande tekniker som bidragit till forskningens utveckling. Syftet med avsnittet är att ge en bild över dessa teknikers komplexitet och att ge uppslag till fortsatt läsning. Fokus ligger på Baltimore-schemats grupp I, IV och V och det förekommer ett visst överlapp med föregående stycken.

### 9.1 Syntetiska metoders historik

I början av 80-talet visades för första gången att cDNA från det positivt strängade RNA-viruset, polioviruset, kunde producera infektiösa virus i celler direkt efter transfektion (12). Genomet klonades i tre separata segment och sedan producerades en komplett DNA-kopia i en bakteriell plasmid som sedan transfekterades in i celler (se figur 4A). När *polymerase chain reaction* (PCR)-tekniken utvecklades 1986 förenklades kloningsmetodiken markant då man inte längre behövde extrahera stora mängder virus-RNA från infekterade cellkulturer utan kunde amplifiera sekvensen med PCR (20). Tillsammans med utvecklingen av *in vitro* transkriptionssystem och bakteriofag-promotorer blev det möjligt att *in vitro* syntetisera viralt fullängds-RNA med hög effektivitet. Ett annat exempel är den första *reverse*

Komplementärt DNA (*cDNA*) bildas när enzymet omvänt transkriptas används för att producera en DNA-kopia av RNA.

En *promotor* är den sekvens som reglerar en gens uttryck (produktion).

*Ligering* när ett speciellt protein används för att sammanfoga två bitar av DNA eller RNA. Ligering är en mycket viktig teknik inom molekylärbiologin.

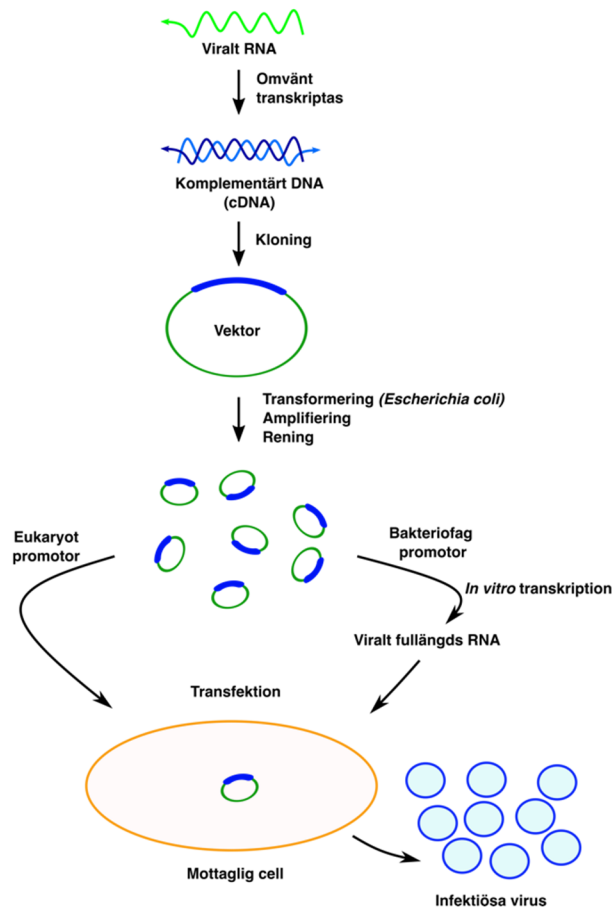
*DNA polymeras* är ett protein som är kritiskt vid replikationen av cellernas DNA där det sammanfogar nukleotiderna till DNA.

*genetics*-systemet för flavivirus som utvecklades i slutet av åttiotalet (21). I detta fall var det inte möjligt att klonas hela genomet i en bakteriell plasmid och därför fördelades genomet på två separata plasmider. Delarna kopplades sedan samman med *in vitro* ligering och efter amplifiering med *in vitro* transkription kunde genomet transfekteras till celler (18). Metoden kräver många tidskrävande steg såsom subkloning och korrigering av fel som introducerats av DNA-polymeraset. Förbättring av PCR-tekniken och utveckling av *reverse transcription* PCR (RT-PCR, sve. omvänd transkriptions-PCR) skapade nya möjligheter att undgå dessa problem (22–25). Metoderna för att tillverka rekombinanta virus förbättrades ytterligare 1995 då Gritsun och Gould skapade en metod för att producera två långa överlappande PCR-produkter med RT-PCR, ligera produkterna och transkribera till viralt fullängds-RNA (24). Metoden öppnade för infektiösa fullängds-RNA-transkript även i situationer när virusgenomet inte kan klonas i bakterier (se figur 4B).

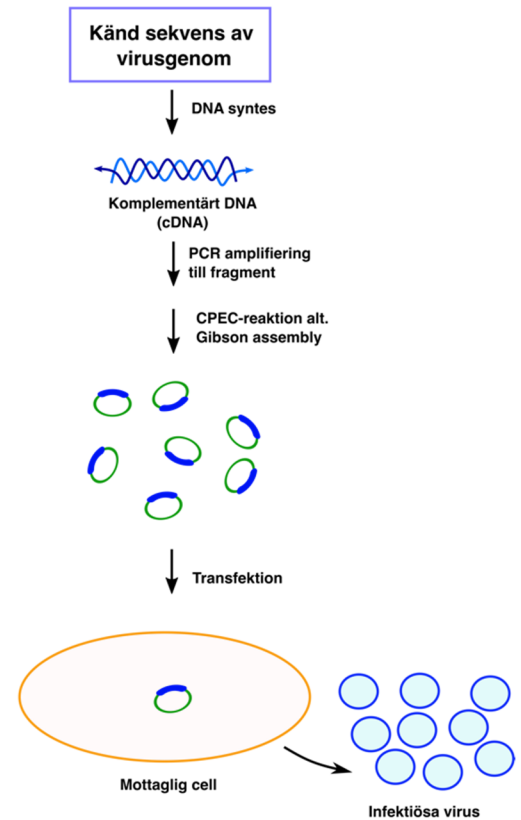
Titel/Title  
de novo syntes av virus

Memo nummer/Number  
FOI Memo 7548

A



B



**Figur 4.** En översikt över ett koncept som används för att generera infektiösa virus (A). Ett exempel på en vidareutveckling från A som utgår från en känd genomsekvens, som involverar *de novo* syntes och som kringgår de begränsningar som propagering i bakterier medför (B).

Den kommersiella utvecklingen av pålitliga reagens och utrustning har påskyndat utvecklingen inom molekylärbiologi och virologi. Andra viktiga förutsättningar för att generera *reverse genetics*-system är förbättrade sekvenseringsmetoder, automatiserade sekvenseringsmaskiner, databaser för genetiska sekvenser (t.ex. GenBank (26)), program som snabbt kan göra detaljerade jämförelser av sekvenser (t.ex. FASTA (27) och BLAST (28)) samt bioinformatiska metoder för att tolka stora mängder data. De stora framstegen inom genomsekvenseringsteknologi och tekniker för DNA-syntes utgör basen för konstruktion av syntetiska genom. Eftersom *de novo* genomsyntes inte är beroende av tillgången till ett naturligt templat tillåter teknikerna modifieringar av virusgenomets struktur och funktion på en nivå som tidigare inte var möjlig. För en mer fullständig beskrivning hänvisar vi till någon av de utmärkta sammanfattande artiklar som behandlar ämnet (29, 30).

Titel/Title  
de novo syntes av virusMemo nummer/Number  
FOI Memo 7548

## 9.2 Aktuella strategier för syntes och modifiering av virus

Det finns nu flera verktyg för att modifiera de viktigaste grupperna av RNA- och DNA-virus och även om strategierna varierar något mellan de olika grupperna så är den gemensamma nämnaren tillgängligheten av klonat komplementärt DNA (cDNA) som kodar för det virala genomet hos viruset man vill studera (se figur 2). Med dagens utbud av kommersiella aktörer är det förhållandevis enkelt och billigt att beställa syntetiskt cDNA. Den enklaste gruppen att modifiera eller syntetisera är positivt enkelsträngade RNA-virus (grupp IV i Baltimore-schemat). Dessa virus har ett genom som värdcellens ribosomer direkt kan translatera till virala proteiner. Det finns ett stort urval av metoder för att modifiera DNA, något som man kan dra nytta av när virusets genom översatts till DNA av proteinet omvänt transkriptas (se figur 4A). Det producerade DNA:t klonas sedan in i en vektor som amplifieras i bakterien *Escherichia coli* för att producera ett stort antal kopior av DNA-klonen. Sekvensen kan sedan manipuleras genom rekombinant DNA-teknik för att t.ex. introducera mutationer och sedan, beroende på vilket typ av promotor som vektorn har, antingen direkt transfekteras in i celler eller först omvandlas till viralt RNA. Efter transfektion till en cell genereras infektiösa virus.

Metoderna ovan involverar bakterier för att amplifiera DNA, något som i vissa fall är problematiskt och involverar flera steg för att skapa stabila kloner. Virusproteinerna som uttrycks kan även vara toxiska för bakterierna. Flera strategier har utvecklats för att undkomma problemet med instabila fullängds-cDNA så som användning av plasmider med lågt kopietal (31, 32), cosmider (32) och olika stammar av *Escherichia coli* (33, 34). Utvecklingen av BAC (eng. *Bacterial Artificial Chromosome*), en vektor som trots stora exogena DNA-fragment har en hög stabilitet i *Escherichia coli*, har varit framgångsrik både för positivt och negativt strängade virus. Genom att använda en kombination av *de novo* syntes och BAC-teknik producerades exempelvis en infektiös klon av MERS-Coronavirus (CoV) (35).

Ett alternativ till BAC är att genom *in vitro* cDNA assembly (sve. *in vitro* cDNA ihopsättning) generera ett komplett DNA genom *in vitro* ligation av flera DNA-fragment som spänner över hela virusgenomet. Metoden har använts vid studier av SARS-CoV och MERS-CoV (36, 37). En fördel med metoden är att den tillåter snabbare modifiering av genomet.

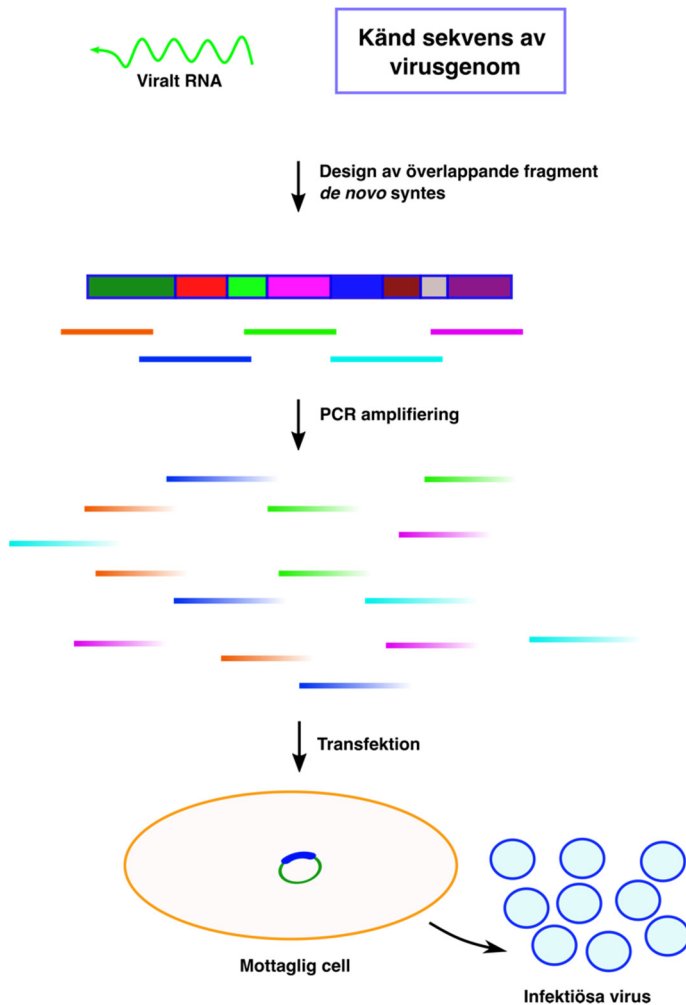
Att skapa infektiösa cDNA-kloner är tidskrävande och både amplifiering av plasmid-DNA i bakterier och *in vitro* RNA transkription har en benägenhet att introducera oönskade mutationer. För att undvika dessa problem har bakteriefria strategier utvecklats där man använder PCR-amplifiering från cDNA för att skapa PCR-amplikon. Amplikonerna kan med olika tekniker sammanfogas till en cirkulär vektor med fullängds-cDNA, som sedan direkt kan transfekteras in i celler och ge upphov till produktion av infektiösa virus (38, 39). En teknik som nyligen utvecklats för positivt strängade RNA-virus är ISA-metoden (eng. *Infectious-Subgenomic-Amplicons*) (se figur 5) (40). Med hjälp av PCR produceras DNA-fragment (amplikon) som täcker hela virusgenomet och som sedan spontant associerar efter transfektion till mottagliga celler. I en vidareutveckling av metoden tillförs de komponenter som behövs för att starta transkription av det virala RNA-genomet i cellerna, i separata amplikon, vilket förkortar processen (41). En av fördelarna med ISA-metoden är att startmaterialet kan vara redan tillgängliga infektiösa kloner, viralt RNA eller *de novo* syntes från känd viral RNA-sekvens (se figur 5). Med den ISA-proceduren har man lyckats generera flera virus inom Flavivirus, Alfavirus och Enterovirus familjerna (40, 42–44).

**Ribosomen** är en organell sammansatt av både proteiner och nukleinsyra som producerar proteiner från ett mRNA templat

**Omvänt transkriptas** är ett protein som omvandlar RNA till motsvarande DNA

En **klon** är en samling individer med ett identiskt genom.

En **plasmids** kopietal anger hur många kopior av en plasmid som finns i en viss cell.

Titel/Title  
de novo syntes av virusMemo nummer/Number  
FOI Memo 7548

**Figur 5.** Schematisk beskrivning av *Infectious-Subgenomic-Amplicons*(ISA)-metoden, ett bakteriefritt *reverse genetic*-system för produktion av RNA-virus.

Olika typer av *reverse genetics*-system har sina respektive för- och nackdelar och vilket system som är mest lämpligt att använda styrs ofta av vilken fråga man vill besvara. För vissa frågeställningar är det problematiskt att använda metoder som ger en klonalitet på det producerade viruset eftersom den naturliga variationen i virusgenomen förloras (30, 45). De modernare bakteriefria metoderna öppnar möjligheter att behålla det mutantspektrum som finns i det ursprungliga virusprovet (t.ex. kliniskt prov eller isolat från cellkultur).

Utveckling av *reverse genetics*-system för negativt strängade RNA-virus (grupp V i Baltimore-schemat) har varit långsammare än utvecklingen av metoder för positivt strängade RNA virus. Dessa virus kräver oftast ytterligare hjälp-konstrukt eller hjälp-virus för att introducera viralt RNA-beroende RNA-polymeras och andra proteiner som behövs för att initiera replikering av genomet (46). Ett alternativt tillvägagångssätt är att syntetisera viralt RNA och driva mRNA-produktion med hjälp av värdens eget RNA-polymeras, t.ex. Pol I och Pol II, något som genomförts med ett influensavirus som har ett genom om bestående av åtta segment (47). Även utvecklingen av metoder för dubbelsträngade DNA virus (grupp I) har varit långsam, delvis beroende på att deras stora genom som i vissa fall är segmenterat, gör dessa virus tekniskt utmanande. Utvecklingen av BAC:ar är en milstøpe inom *reverse genetics*-system för denna grupp av virus.

Titel/Title  
de novo syntes av virusMemo nummer/Number  
FOI Memo 7548

### 9.3 Framtida utveckling

Trots de stora framstegen som skett inom *de novo* syntes av virus kvarstår utmaningar och det saknas fortfarande metoder för att syntetisera många viktiga grupper av virus. Det är också sannolikt att betydelsen av virus som verktyg inom medicin och bioteknologi kommer att öka. Ett forskningsområde som bidrar till denna utveckling är onkolytiska virus, d.v.s. virus som dödar cancerceller, vilket under de senaste 20 åren har bidragit till att ett hundratal onkolytiska virus nått kliniska försök (48). Utvecklingen involverar ofta molekylär design eller avancerade molekylärbiologiska tekniker som exempelvis *directed evolution*<sup>3</sup> (49, 50). Ett koncept som bygger på samma forskning och som har intresse för den medicinska skyddsforskningen är ett adenovirus som används som en vektor för att inducera en endogen produktion av ett protein som inaktiverar nervgaser (51). Mycket forskning återstår, men principen har potential att ge ett profylaktiskt skydd mot nervgasförgiftning. På ännu längre sikt kan man tänka sig att virus används som vektorer för andra proteinbaserade läkemedel eller faktorer som ökar människans förmåga.

---

<sup>3</sup> Riktad evolution.

Titel/Title  
de novo syntes av virusMemo nummer/Number  
FOI Memo 7548

## 10 Referenser

1. P. M. Folegatti, K. J. Ewer, P. K. Aley, B. Angus, S. Becker, S. Belij-Rammerstorfer, D. Bellamy, S. Bibi, M. Bittaye, E. A. Clutterbuck, C. Dold, S. N. Faust, A. Finn, A. L. Flaxman, B. Hallis, P. Heath, D. Jenkin, R. Lazarus, R. Makinson, A. M. Minassian, K. M. Pollock, M. Ramasamy, H. Robinson, M. Snape, R. Tarrant, M. Voysey, C. Green, A. D. Douglas, A. V. S. Hill, T. Lambe, S. C. Gilbert, A. J. Pollard, J. Aboagye, K. Adams, A. Ali, E. Allen, J. L. Allison, R. Anslow, E. H. Arbe-Barnes, G. Babbage, K. Baillie, M. Baker, N. Baker, P. Baker, I. Baleanu, J. Ballaminut, E. Barnes, J. Barrett, L. Bates, A. Batten, K. Beadon, R. Beckley, E. Berrie, L. Berry, A. Beveridge, K. R. Bewley, E. M. Bijker, T. Bingham, L. Blackwell, C. L. Blundell, E. Bolam, E. Boland, N. Borthwick, T. Bower, A. Boyd, T. Brenner, P. D. Bright, C. Brown-O'Sullivan, E. Brunt, J. Burbage, S. Burge, K. R. Buttigieg, N. Byard, I. Cabera Puig, A. Calvert, S. Camara, M. Cao, F. Cappuccini, M. Carr, M. W. Carroll, V. Carter, K. Cathie, R. J. Challis, S. Charlton, I. Chelysheva, J. S. Cho, P. Cicconi, L. Cifuentes, H. Clark, E. Clark, T. Cole, R. Colin-Jones, C. P. Conlon, A. Cook, N. S. Coombes, R. Cooper, C. A. Cosgrove, K. Coy, W. E. M. Crocker, C. J. Cunningham, B. E. Damratoski, L. Dando, M. S. Dato, H. Davies, H. De Graaf, T. Demissie, C. Di Maso, I. Dietrich, T. Dong, F. R. Donnellan, N. Douglas, C. Downing, J. Drake, R. Drake-Brockman, R. E. Drury, S. J. Dunachie, N. J. Edwards, F. D. L. Edwards, C. J. Edwards, S. C. Elias, M. J. Elmore, K. R. W. Emary, M. R. English, S. Fagerbrink, S. Felle, S. Feng, S. Field, C. Fixmer, C. Fletcher, K. J. Ford, J. Fowler, P. Fox, E. Francis, J. Frater, J. Furze, M. Fuskova, E. Galiza, D. Gbesemete, C. Gilbride, K. Godwin, G. Gorini, L. Goulston, C. Grabau, L. Gracie, Z. Gray, L. B. Guthrie, M. Hackett, S. Halwe, E. Hamilton, J. Hamlyn, B. Hanumunthadu, I. Harding, S. A. Harris, A. Harris, D. Harrison, C. Harrison, T. C. Hart, L. Haskell, S. Hawkins, I. Head, J. A. Henry, J. Hill, S. H. C. Hodgson, M. M. Hou, E. Howe, N. Howell, C. Hutlin, S. Ikram, C. Isitt, P. Iveson, S. Jackson, F. Jackson, S. W. James, M. Jenkins, E. Jones, K. Jones, C. E. Jones, B. Jones, R. Kailath, K. Karampatsas, J. Keen, S. Kelly, D. Kelly, D. Kerr, S. Kerridge, L. Khan, U. Khan, A. Killen, J. Kinch, T. B. King, L. King, J. King, L. Kingham-Page, P. Klenerman, F. Knapper, J. C. Knight, D. Knott, S. Koleva, A. Kupke, C. W. Larkworthy, J. P. J. Larwood, A. Laskey, A. M. Lawrie, A. Lee, K. Y. Ngan Lee, E. A. Lees, H. Legge, A. Lelliott, N. M. Lemm, A. M. Lias, A. Linder, S. Lipworth, X. Liu, S. Liu, R. Lopez Ramon, M. Lwin, F. Mabesa, M. Madhavan, G. Mallett, K. Mansatta, I. Marcal, S. Marinou, E. Marlow, J. L. Marshall, J. Martin, J. McEwan, L. McInroy, G. Meddaugh, A. J. Mentzer, N. Mirtorabi, M. Moore, E. Moran, E. Morey, V. Morgan, S. J. Morris, H. Morrison, G. Morshead, R. Morter, Y. F. Mujadidi, J. Muller, T. Munera-Huertas, C. Munro, A. Munro, S. Murphy, V. J. Munster, P. Mweu, A. Noé, F. L. Nugent, E. Nuthall, K. O'Brien, D. O'Connor, B. Oguti, J. L. Oliver, C. Oliveira, P. J. O'Reilly, M. Osborn, P. Osborne, C. Owen, D. Owens, N. Owino, M. Pacurar, K. Parker, H. Parracho, M. Patrick-Smith, V. Payne, J. Pearce, Y. Peng, M. P. Peralta Alvarez, J. Perring, K. Pfaffertott, D. Pipini, E. Plested, H. Pluess-Hall, K. Pollock, I. Poulton, L. Presland, S. Provstgaard-Morys, D. Pulido, K. Radia, F. Ramos Lopez, J. Rand, H. Ratcliffe, T. Rawlinson, S. Rhead, A. Riddell, A. J. Ritchie, H. Roberts, J. Robson, S. Roche, C. Rohde, C. S. Rollier, R. Romani, I. Rudiansyah, S. Saich, S. Sajjad, S. Salvador, L. Sanchez Riera, H. Sanders, K. Sanders, S. Sapaun, C. Sayce, E. Schofield, G. Scream, B. Selby, C. Semple, H. R. Sharpe, I. Shaik, A. Shea, H. Shelton, S. Silk, L. Silva-Reyes, D. T. Skelly, H. Smees, C. C. Smith, D. J. Smith, R. Song, A. J. Spencer, E. Stafford, A. Steele, E. Stefanova, L. Stockdale, A. Szigeti, A. Tahiri-Alaoui, M. Tait, H. Talbot, R. Tanner, I. J. Taylor, V. Taylor, R. Te Water Naude, N. Thakur, Y. Themistocleous, A. Themistocleous, M. Thomas, T. M. Thomas, A. Thompson, S. Thomson-Hill, J. Tomlins, S. Tonks, J. Towner, N. Tran, J. A. Tree, A. Truby, K. Turkentine, C. Turner, N. Turner, S. Turner, T. Tuthill, M. Ulaszewska, R. Varughese, N. Van Doremalen, K. Veighey, M. K. Verheul, I. Vichos, E. Vitale, L. Walker, M. E. E. Watson, B. Welham, J. Wheat,



Titel/Title  
de novo syntes av virusMemo nummer/Number  
FOI Memo 7548

- C. White, R. White, A. T. Worth, D. Wright, S. Wright, X. L. Yao, Y. Yau, Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2: a preliminary report of a phase 1/2, single-blind, randomised controlled trial. *Lancet* (2020), doi:10.1016/S0140-6736(20)31604-4.
2. N. van Doremalen, T. Lambe, A. Spencer, S. Belij-Rammerstorfer, J. N. Purushotham, J. R. Port, V. A. Avanzato, T. Bushmaker, A. Flaxman, M. Ulaszewska, F. Feldmann, E. R. Allen, H. Sharpe, J. Schulz, M. Holbrook, A. Okumura, K. Meade-White, L. Pérez-Pérez, N. J. Edwards, D. Wright, C. Bissett, C. Gilbride, B. N. Williamson, R. Rosenke, D. Long, A. Ishwarbhai, R. Kailath, L. Rose, S. Morris, C. Powers, J. Lovaglio, P. W. Hanley, D. Scott, G. Saturday, E. de Wit, S. C. Gilbert, V. J. Munster, ChAdOx1 nCoV-19 vaccine prevents SARS-CoV-2 pneumonia in rhesus macaques. *Nature* (2020), doi:10.1038/s41586-020-2608-y.
  3. W. P. Duprex, R. A. M. Fouchier, M. J. Imperiale, M. Lipsitch, D. A. Relman, Gain-of-function experiments: Time for a real debate. *Nat. Rev. Microbiol.* (2015), , doi:10.1038/nrmicro3405.
  4. F. Pasin, W. Menzel, J. A. Daròs, Harnessed viruses in the age of metagenomics and synthetic biology: an update on infectious clone assembly and biotechnologies of plant viruses. *Plant Biotechnol. J.* (2019), , doi:10.1111/pbi.13084.
  5. S. J. Anthony, J. H. Epstein, K. A. Murray, I. Navarrete-Macias, C. M. Zambrana-Torrel, A. Solovyov, R. Ojeda-Flores, N. C. Arrigo, A. Islam, S. A. Khan, P. Hosseini, T. L. Bogich, K. J. Olival, M. D. Sanchez-Leon, W. B. Karesh, T. Goldstein, S. P. Luby, S. S. Morse, J. A. K. Mazet, P. Daszak, W. I. Lipkin, A strategy to estimate unknown viral diversity in mammals. *MBio* (2013), doi:10.1128/mBio.00598-13.
  6. M. E. J. Woolhouse, R. Howey, E. Gaunt, L. Reilly, M. Chase-Topping, N. Savill, Temporal trends in the discovery of human viruses. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **275**, 2111–2115 (2008).
  7. D. Baltimore, Expression of animal virus genomes. *Bacteriol. Rev.* (1971), doi:10.1128/membr.35.3.235-241.1971.
  8. K. Lundstrom, Oncolytic alphaviruses in cancer immunotherapy. *Vaccines* (2017), , doi:10.3390/vaccines5020009.
  9. X.-D. Yao, D. H. Evans, High-Frequency Genetic Recombination and Reactivation of Orthopoxviruses from DNA Fragments Transfected into Leporipoxvirus-Infected Cells. *J. Virol.* (2003), doi:10.1128/jvi.77.13.7281-7290.2003.
  10. R. S. Noyce, S. Lederman, D. H. Evans, Construction of an infectious horsepox virus vaccine from chemically synthesized DNA fragments. *PLoS One* (2018), doi:10.1371/journal.pone.0188453.
  11. J. I. Quetglas, M. Ruiz-Guillen, A. Aranda, E. Casales, J. Bezunartea, C. Smerdou, Alphavirus vectors for cancer therapy. *Virus Res.* (2010), , doi:10.1016/j.virusres.2010.07.027.
  12. V. R. Racaniello, D. Baltimore, Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells. *Science* (80-. ). (1981), doi:10.1126/science.6272391.
  13. F. Almazán, J. M. González, Z. Péntes, A. Izeta, E. Calvo, J. Plana-Durán, L. Enjuanes, Engineering the largest RNA virus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2000), doi:10.1073/pnas.97.10.5516.
  14. V. Thiel, J. Herold, B. Schelle, S. G. Siddell, Infectious RNA transcribed in vitro from a cDNA copy of the human coronavirus genome cloned in vaccinia virus. *J. Gen. Virol.* (2001), doi:10.1099/0022-1317-82-6-1273.

Titel/Title  
de novo syntes av virus

Memo nummer/Number  
FOI Memo 7548

15. B. Peeters, O. de Leeuw, A single-plasmid reverse genetics system for the rescue of non-segmented negative-strand RNA viruses from cloned full-length cDNA. *J. Virol. Methods* (2017), doi:10.1016/j.jviromet.2017.07.008.
16. M. J. Schnell, T. Mebatsion, K. K. Conzelmann, Infectious rabies viruses from cloned cDNA. *EMBO J.* (1994), doi:10.1002/j.1460-2075.1994.tb06739.x.
17. A. Bridgen, R. M. Elliott, Rescue of a segmented negative-strand RNA virus entirely from cloned complementary DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1996), doi:10.1073/pnas.93.26.15400.
18. W. Luytjes, M. Krystal, M. Enami, J. D. Parvin, P. Palese, Amplification, expression, and packaging of a foreign gene by influenza virus. *Cell* (1989), doi:10.1016/0092-8674(89)90766-6.
19. F. Radecke, P. Spielhofer, H. Schneider, K. Kaelin, M. Huber, C. Dötsch, G. Christiansen, M. A. Billeter, Rescue of measles viruses from cloned DNA. *EMBO J.* (1995), doi:10.1002/j.1460-2075.1995.tb00266.x.
20. K. Mullis, F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, H. Erlich, Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* (1986), doi:10.1101/sqb.1986.051.01.032.
21. C. M. Rice, A. Grakoui, R. Galler, T. J. Chambers, Transcription of infectious yellow fever RNA from full-length cDNA templates produced by in vitro ligation. *New Biol.* (1989).
22. S. Cheng, S. Y. Chang, P. Gravitt, R. Respass, Long PCR. *Nature* (1994), , doi:10.1038/369684a0.
23. W. M. Barnes, PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from  $\lambda$  bacteriophage templates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1994), doi:10.1073/pnas.91.6.2216.
24. T. S. Gritsun, E. A. Gould, Infectious transcripts of tick-borne encephalitis virus, generated in days by RT-PCR. *Virology* (1995), doi:10.1006/viro.1995.0072.
25. T. S. Gritsun, E. A. Gould, Development and analysis of a tick-borne encephalitis virus infectious clone using a novel and rapid strategy. *J. Virol. Methods* (1998), doi:10.1016/S0166-0934(98)00130-X.
26. D. A. Benson, M. Cavanaugh, K. Clark, I. Karsch-Mizrachi, D. J. Lipman, J. Ostell, E. W. Sayers, GenBank. *Nucleic Acids Res.* (2013), doi:10.1093/nar/gks1195.
27. W. R. Pearson, D. J. Lipman, Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1988), doi:10.1073/pnas.85.8.2444.
28. S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, D. J. Lipman, Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* (1990), doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
29. F. Almazán, I. Sola, S. Zuñiga, S. Marquez-Jurado, L. Morales, M. Becares, L. Enjuanes, Coronavirus reverse genetic systems: Infectious clones and replicons. *Virus Res.* (2014), doi:10.1016/j.virusres.2014.05.026.
30. F. Aubry, A. Nougairède, E. A. Gould, X. De Lamballerie, Flavivirus reverse genetic systems, construction techniques and applications: A historical perspective. *Antiviral Res.* (2015), , doi:10.1016/j.antiviral.2014.12.007.
31. P. J. Bredenbeek, E. A. Kooi, B. Lindenbach, N. Huijkman, C. M. Rice, W. J. M. Spaan, A stable full-length yellow fever virus cDNA clone and the role of conserved RNA elements in

Titel/Title  
de novo syntes av virus

Memo nummer/Number  
FOI Memo 7548

- flavivirus replication. *J. Gen. Virol.* (2003), doi:10.1099/vir.0.18860-0.
32. F. Zhang, Q. Huang, W. Ma, S. Jiang, Y. Fan, H. Zhang, Amplification and cloning of the full-length genome of Japanese encephalitis virus by a novel long RT-PCR protocol in a cosmid vector. *J. Virol. Methods* (2001), doi:10.1016/S0166-0934(01)00331-7.
  33. C. J. Lai, B. Zhao, H. Hori, M. Bray, Infectious RNA transcribed from stably cloned full-length cDNA of dengue type 4 virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1991), doi:10.1073/pnas.88.12.5139.
  34. S. J.W., D. M., F. M., I. N., M. M.Y., P. A., R. C.M., Dengue reporter viruses reveal viral dynamics in interferon receptor-deficient mice and sensitivity to interferon effectors in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2012).
  35. F. Almazán, M. L. Dediego, I. Sola, S. Zuñiga, J. L. Nieto-Torres, S. Marquez-Jurado, G. Andrés, L. Enjuanes, Engineering a replication-competent, propagation-defective middle east respiratory syndrome coronavirus as a vaccine candidate. *MBio* (2013), doi:10.1128/mBio.00650-13.
  36. M. M. Becker, R. L. Graham, E. F. Donaldson, B. Rockx, A. C. Sims, T. Sheahan, R. J. Pickles, D. Corti, R. E. Johnston, R. S. Baric, M. R. Denison, Synthetic recombinant bat SARS-like coronavirus is infectious in cultured cells and in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2008), doi:10.1073/pnas.0808116105.
  37. T. Scobey, B. L. Yount, A. C. Sims, E. F. Donaldson, S. S. Agnihothram, V. D. Menachery, R. L. Graham, J. Swanstrom, P. F. Bove, J. D. Kim, S. Grego, S. H. Randell, R. S. Baric, Reverse genetics with a full-length infectious cDNA of the Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2013), doi:10.1073/pnas.1311542110.
  38. J. Edmonds, E. van Grinsven, N. Prow, A. Bosco-Lauth, A. C. Brault, R. A. Bowen, R. A. Hall, A. Khromykh, A Novel Bacterium-Free Method for Generation of Flavivirus Infectious DNA by Circular Polymerase Extension Reaction Allows Accurate Recapitulation of Viral Heterogeneity. *J. Virol.* (2013), doi:10.1128/jvi.03162-12.
  39. B. Siridechadilok, M. Gomutsukhavadee, T. Sawaengpol, S. Sangiambut, C. Puttikhunt, K. Chin-inmanu, P. Suriyaphol, P. Malasit, G. Sreaton, J. Mongkolsapaya, A Simplified Positive-Sense-RNA Virus Construction Approach That Enhances Analysis Throughput. *J. Virol.* (2013), doi:10.1128/jvi.02261-13.
  40. F. Aubry, A. Nougairède, L. de Fabritus, G. Querat, E. A. Gould, X. de Lamballerie, Single-stranded positive-sense RNA viruses generated in days using infectious subgenomic amplicons. *J. Gen. Virol.* (2014), doi:10.1099/vir.0.068023-0.
  41. T. Atieh, M. D. El Ayoubi, F. Aubry, S. Priet, X. De Lamballerie, A. Nougairède, Haiku: New paradigm for the reverse genetics of emerging RNA viruses. *PLoS One* (2018), doi:10.1371/journal.pone.0193069.
  42. T. Atieh, C. Baronti, X. De Lamballerie, A. Nougairède, Simple reverse genetics systems for Asian and African Zika viruses. *Sci. Rep.* (2016), doi:10.1038/srep39384.
  43. T. Atieh, A. Nougairède, R. Klitting, F. Aubry, A. B. Failloux, X. De Lamballerie, S. Priet, New reverse genetics and transfection methods to rescue arboviruses in mosquito cells. *Sci. Rep.* (2017), doi:10.1038/s41598-017-14522-6.
  44. L. De Fabritus, A. Nougairède, F. Aubry, E. A. Gould, X. De Lamballerie, Utilisation of ISA reverse genetics and large-scale random codon re-encoding to produce attenuated strains of tick-borne encephalitis virus within days. *PLoS One* (2016),

Titel/Title  
de novo syntes av virus

Memo nummer/Number  
FOI Memo 7548

- doi:10.1371/journal.pone.0159564.
45. S. M. Ali, A. Vega-Rúa, J. S. Driouich, X. De Lamballerie, A. B. Failloux, A. Nougairède, Comparison of chikungunya viruses generated using infectious clone or the infectious subgenomic amplicons (isa) method in aedes mosquitoes. *PLoS One* (2018), doi:10.1371/journal.pone.0199494.
  46. G. Neumann, Y. Kawaoka, Reverse genetics systems for the generation of segmented negative-sense RNA viruses entirely from cloned cDNA. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* (2004), , doi:10.1007/978-3-662-06099-5\_2.
  47. E. Hoffmann, G. Neumann, Y. Kawaoka, G. Hobom, R. G. Webster, A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2000), doi:10.1073/pnas.100133697.
  48. N. Macedo, D. M. Miller, R. Haq, H. L. Kaufman, Clinical landscape of oncolytic virus research in 2020. *J. Immunother. Cancer* (2020), , doi:10.1136/jitc-2020-001486.
  49. I. Kuhn, P. Harden, M. Bauzon, C. Chartier, J. Nye, S. Thorne, T. Reid, S. Ni, A. Lieber, K. Fisher, L. Seymour, G. M. Rubanyi, R. N. Harkins, T. W. Hermiston, Directed evolution generates a novel oncolytic virus for the treatment of colon cancer. *PLoS One* (2008), doi:10.1371/journal.pone.0002409.
  50. S. L. Seegers, C. Frasier, S. Greene, I. V. Nesmelova, V. Z. Grdzlishvili, Experimental Evolution Generates Novel Oncolytic Vesicular Stomatitis Viruses with Improved Replication in Virus-Resistant Pancreatic Cancer Cells. *J. Virol.* (2019), doi:10.1128/jvi.01643-19.
  51. V. Gupta, C. Linn Cadieux, D. McMenemy, C. Angelica Medina-Jaszek, M. Arif, O. Ahonkhai, E. Wielechowski, M. Taheri, Y. Che, T. Goode, M. P. Limberis, M. Li, D. M. Cerasoli, A. P. Tretiakova, J. M. Wilson, Adeno-associated virus-mediated expression of human butyrylcholinesterase to treat organophosphate poisoning. *PLoS One* (2019), doi:10.1371/journal.pone.0225188.