

Aan de minister van
Infrastructuur en Waterstaat
dhr. M.G.J. Harbers
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 29 mei 2024
KENMERK CGM/240529-02
ONDERWERP Advies klinische studie met een conditioneel-replicerende adenovirale vector

Geachte meneer Harbers,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IM-MV 24-001 met de titel 'Local oncolytic adenovirus administration to sensitize the immune microenvironment of esophageal adenocarcinoma for chemoradiation' van het Academisch Medisch Centrum te Amsterdam, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is verzocht te adviseren over een klinische studie waarbij een zogenaamde conditioneel-replicerende adenovirale vector wordt toegediend aan patiënten met slokdarmkanker. De vector wordt direct in de slokdarmtumor geïnjecteerd. De risico's die bij deze klinische studie eventueel kunnen optreden hebben betrekking op de pathogeniteit van de vector, de kans op uitscheiding ('shedding') van het ggo en de kans op recombinatie met wildtype adenovirussen.

De vector is gebaseerd op wildtype humaan adenovirus 5. In de vector zijn drie modificaties aangebracht waardoor de vector alleen replicateert in delende cellen, kankercellen met een hogere efficiëntie geïnfecteert worden, de vector sneller vrijkomt uit geïnfecteerde cellen en de vector naar verwachting sneller herkend wordt door het immuunsysteem. Gezien de aard van het ggo is de COGEM van oordeel dat het verzwakt is ten opzichte van het oudervirus.

In theorie kan het gg-virus zich vanuit de patiënt in het milieu verspreiden en derden infecteren. Echter, het gg-virus kan niet effectief repliceren buiten de tumorcellen en zal snel door het afweersysteem onschadelijk gemaakt worden. Daarnaast acht de COGEM de risico's van verspreiding verwaarloosbaar klein gezien het verzwakte karakter, de manier van toediening en de extra genomen voorzorgsmaatregelen. In het geval van een 'worst-case' scenario waarbij recombinatie van het ggo met een wildtype adenovirus optreedt, zou dit theoretisch kunnen leiden tot de vorming van een replicerend adenovirus met een verhoogd celtropisme. Of de risico's van een infectie met een dergelijk virus groter zijn dan van een infectie met een wildtype adenovirus, is moeilijk te voorspellen. Echter, de COGEM acht de kans op co-infectie en vervolgens recombinatie met inachtneming van de extra maatregelen verwaarloosbaar klein.

Op basis van bovenstaande gegevens is de COGEM van oordeel dat de milieurisico's verbonden aan deze klinische studie met een conditioneel-replicerend humaan adenovirus verwaarloosbaar klein zijn.

De door de COGEM gehanteerde overwegingen en het hieruit voortvloeiende advies treft u hierbij aan als bijlage.

Hoogachtend,



Prof. dr. ing. Sybe Schaap
Voorzitter COGEM

- c.c.
- Drs. Y. de Keulenaar, Hoofd Bureau ggo
 - Ministerie van IenW, Directie Omgevingsveiligheid en milieurisico's, DG Milieu en Internationaal
 - Dr. ir. M.M.C. Gielkens, Loket Gentherapie
 - Dr. K.R.J. Vanmolkot, Centrale Commissie Mensgebonden Onderzoek
 - Drs. K.E. Kok, Ministerie van VWS

Met het oog op eventuele belangenverstrengeling is het COGEM lid dr. A.T. Das niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.

Klinische studie met een conditioneel-replicerende adenovirale vector als aanvullende behandeling van slokdarmkanker

COGEM advies CGM/240529-02

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over een vergunningaanvraag van het Academisch Medisch Centrum te Amsterdam (IM-MV 24-001). Deze aanvraag betreft een klinische studie waarbij gebruik wordt gemaakt van de genetisch gemodificeerd conditioneel-replicerende adenovirale vector ORCA-010 afgeleid van humaan adenovirus 5 (HAdV-5, soort *Mastadenovirus caesari*, voorheen Human mastadenovirus C, type 5), die toegediend zal worden ter behandeling van proefpersonen met slokdarmkanker. In de vector zijn drie modificaties aangebracht waardoor de vector alleen replicateert in delende cellen, kankercellen effectiever geïnfecteerd worden, de vector sneller vrijkomt uit geïnfecteerde cellen en de vector naar verwachting sneller herkend wordt door het immuunsysteem. Het doel van de studie is om een betere behandeling van slokdarmkanker te ontwikkelen door het gebruik van oncolytische adenovirussen als aanvullende therapie naast de standaard toegepaste chemoradiatie en operatieve verwijdering van de tumor.

2. Achtergrondinformatie adenovirussen

Adenovirale vectoren zijn afgeleid van adenovirussen (*Adenoviridae*, genus *Mastadenovirus*) en worden veelvuldig gebruikt als een effectief systeem om genen tot expressie te brengen. Er bestaan 56 verschillende soorten humane adenovirussen. Binnen de species worden adenovirussen verder onderverdeeld in (sero)typen, die met een nummer worden aangegeven.¹ Adenovirussen hebben een gastheerbereik dat beperkt is tot één of enkele nauw verwante soorten.^{2,3} Adenovirussen kunnen de luchtwegen, het maag-darmstelsel en soms de ogen infecteren.⁴ Een infectie verloopt meestal asymptomatisch of met lichte verkoudheidssymptomen, zonder noodzaak tot medische behandeling.⁵ De infectie is doorgaans zelflimiterend. Bij patiënten met een sterk verzwakt afweersysteem kunnen echter ontstekingen aan de nieren en longen ontstaan met mogelijk fatale gevolgen.³

In de onderhavige adviesvraag wordt human adenovirus 5 (HAdV-5) (soort *Mastadenovirus caesari*, voorheen Human mastadenovirus C, type 5) als basis gebruikt voor de adenovirale vector. Infectie met dit type adenovirus kan leiden tot verkoudheidsverschijnselen.

2.1 Immuniteit tegen HAdV-5 onder de bevolking

Nagenoeg de gehele Nederlandse bevolking is ooit (over het algemeen al tijdens de jeugd) geïnfecteerd geweest met een adenovirus.⁶ Hierdoor hebben bijna alle mensen antilichamen gericht tegen adenovirussen (humorale immuniteit). Een deel van deze antilichamen neutraliseert het virus, maar ook niet-neutraliserende antilichamen helpen bij het opruimen van het virus. In de Verenigde Staten zijn bij 33-66% van de bevolking neutraliserende antilichamen tegen HAdV-5 gedetecteerd; in Nederland is dit percentage nog iets hoger.^{7,8,9,10} Dit betekent niet dat het overige deel van de bevolking geen antilichamen bezit, maar dat deze niet gedetecteerd zijn. Waarschijnlijk hebben alle mensen een induceerbare geheugen-B-celrespons tegen humane adenovirussen. Naast de humorale immuniteit hebben de meeste mensen ook een cellulaire immuniteit. De immuniteit tegen adenovirussen is levenslang en als gevolg van de opgebouwde

immuniteit zijn bij mensen op latere leeftijd vrijwel uitsluitend subklinische herinfecties te zien. Dit houdt in dat de afweer voldoende is om heftige virusreplicatie (en bijkomende symptomen) te voorkomen.

2.2 Structuur en genomische organisatie adenovirussen

Adenovirussen bestaan uit een lineair dubbelstrengs DNA-molecuul omgeven door een eiwitmantel.^{2,3} Het genoom van HAdV-5 is onderverdeeld in een vroege (Early) en een late (Late) regio. De vroege regio komt kort na binnenkomst van het virus in de cel tot expressie. De late regio komt pas tot expressie als de DNA-replicatie gestart is. De transcriptie van de vroege genen leidt tot de synthese van ongeveer 17 vroege eiwitten, waaronder E1A, E1B en E3. De E1A-eiwitten zijn betrokken bij de inductie van virale replicatie en de E1B-eiwitten voorkomen geprogrammeerde celdood in de gastheer cel. De E3-eiwitten blokkeren de afweerreactie tegen het virus.^{2,3,11}

3. Voorgenomen werkzaamheden

3.1 Doel en opzet van het onderzoek

Om de huidige behandeling van slokdarmkanker te verbeteren wil de aanvrager onderzoek doen naar het gebruik van een adenovirale vector als adjuvant-therapie. Hierbij gaat het om een genetisch gemodificeerde (gg-) conditioneel-replicerende adenovirale vector. Tijdens deze studie zal de vector tweemaal, met een interval van 10-14 dagen, lokaal in de slokdarmtumor van 70 proefpersonen geïnjecteerd worden, voordat chemoradiatie en na 13 weken operatieve verwijdering van de tumor plaatsvindt. Als onderdeel van de klinische studie zullen er tot 1 jaar na deelname klinische monsters verzameld worden van de patiënten.

3.2 De adenovirale vector ORCA-010

De aanvragers gebruiken een genetisch gemodificeerd organisme (ggo), het conditioneel-replicerende adenovirus (ORCA-010). ORCA-010 is gegenereerd middels een aantal stappen van homologe recombinatie tussen plasmiden die delen van het recombinante adenovirusgenoom bevatten. In de vector zijn drie modificaties aangebracht ten opzichte van het oudervirus HAdV-5.

De eerste modificatie bestaat uit een deletie van 24 baseparen in het E1A-gen, waardoor ORCA-010 niet in rustende cellen repliceert, maar wel in snel delende tumorcellen. In rustende cellen is het retinoblastoma eiwit (Rb) gebonden aan het cellulaire eiwit E2F, waardoor transitie naar de DNA-synthese fase niet plaatsvindt. Bij een infectie met een wildtype adenovirus remt het virale E1A-eiwit de functie van Rb, waardoor E2F vrijkomt. Dit leidt ertoe dat DNA-synthese optreedt, en dat virusreplicatie mogelijk wordt. Door de deletie kan het E1A-eiwit niet meer binden aan Rb en kan E2F niet worden vrijgemaakt. Hierdoor kan ORCA-010 niet repliceren in (gezonde) rustende cellen. Veel tumorcellen hebben echter een gewijzigde vorm van Rb waardoor E2F niet meer wordt gebonden. De DNA-synthese wordt derhalve continu gestimuleerd en deze cellen kunnen continu delen. ORCA-010 kan daarom wel repliceren in tumorcellen, maar niet in gezonde rustende cellen.

De tweede modificatie, T1 genaamd, betreft een enkele nucleotide-insertie (adenine) in het E3/19K 'open reading frame' (ORF).¹² Het resultaat is een ingekort E3/19K-eiwit, dat het deel mist dat het E3/19K eiwit in het endoplasmatisch reticulum vasthoudt. Wildtype E3/19K-eiwit bindt aan MHC klasse I moleculen, waardoor MHC I moleculen in het endoplasmatisch reticulum blijven en niet naar het celmembraan worden

getransporteerd. Doordat de MHC I moleculen niet op het celoppervlakte aanwezig zijn, is er een verminderde immuunreactie tegen cellen geïnfecteerd met wildtype adenovirus. Het gemodificeerde E3/19K-eiwit met de T1-insertie in ORCA-010 zorgt ervoor dat het MHC I molecuul niet meer in het ER blijft en naar de oppervlakte van het celmembraan wordt getransporteerd. In de literatuur is aangetoond dat door deze T1-mutatie de nieuwe vermeerderde virusdeeltjes sneller vrijkomen uit de geïnfecteerde cel.¹² Ook is de verwachting dat, als gevolg van de aanwezigheid van de MHC I-moleculen op het celoppervlak, ORCA-010 sneller herkend wordt door het immuunsysteem en eerder door het lichaam opgeruimd kan worden in vergelijking met een wildtype HAdV-5.

De derde mutatie betreft een insertie van 27 nucleotiden in het ORF van het fibercapside-gen waardoor kankercellen met een hogere efficiëntie worden geïnfecteerd door ORCA-010. Deze insertie codeert voor een extra RGD-motief (het arginine-glycine-asparagine-4C peptide) dat in de fiber aan de buitenkant van het virusdeeltje geplaatst is. De fiber is medeverantwoordelijk voor de herkenning van cellen die het virus kan binnendringen (infecteren). Door toevoeging van het extra RGD-motief is ORCA-010 in staat om cellen te infecteren die bepaalde integrines (met name $\alpha\beta 3$ en $\alpha\beta 5$) op hun celmembraan tot expressie brengen, zelfs al bezitten deze cellen niet de natuurlijke coxsackie-adenovirus receptoren (CAR) voor HAdV-5. Dit betekent dat ORCA-010 een groter aantal verschillende celtypes kan binnendringen dan HAdV-5. Overigens bezit HAdV-5 ook van nature een RGD-motief.¹³ Hoewel dit motief een rol speelt bij de transductie van gastheercellen, is dit nauwelijks betrokken bij de primaire interactie van het virus met de CAR-receptor.

4. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft alle adenovirussen waarover zij tot op heden heeft geadviseerd ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.¹⁴ De COGEM heeft meerdere keren geadviseerd over klinische studies met replicatie-deficiënte adenovirale vectoren.^{15,16,17,18} In 2021 heeft de COGEM in een advies een generieke milieurisicobeoordeling voor klinische toepassingen met replicatie-deficiënte adenovirale vectoren opgesteld.¹⁹ De COGEM heeft ook meerdere keren geadviseerd over klinische studies met conditioneel-replicerende adenovirale vectoren als aanvullende behandeling voor prostaatkanker²⁰ en hersentumoren.^{21,22,23}

In 2009 heeft de COGEM voor het eerst geadviseerd over een klinische studie met conditioneel-replicerende adenovirusvectoren.²¹ Deze vectoren werden toegepast in patiënten met een hersentumor. De vector bezat ten opzichte van het oudervirus een vergroot tropisme, maar kon alleen in tumorcellen effectief repliceren. De gebruikte adenovirale vector in deze studie bezat twee mutaties in HAdV-5, die beide identiek zijn aan twee mutaties in ORCA-010: de 24 baseparen deletie in het E1A-gen en de toevoeging van het RGD-motief. De COGEM was in dit geval van oordeel dat het ggo verzwakt was ten opzichte van het oudervirus. Er kon echter niet uitgesloten worden dat het ggo zich na toediening vanuit de hersenen zou verspreiden naar andere delen van het lichaam en via lichaamsvloeistoffen uitgescheiden zou worden. In het ‘worst case’ scenario zou recombinatie van het ggo met een wildtype adenovirus kunnen leiden tot een virus met een normaal (wildtype) replicatieprofiel en een vergroot celtropisme.

Om de milieurisico's van deze klinische studie in te perken, heeft de COGEM geadviseerd verschillende risicomanagementmaatregelen toe te passen. Deze maatregelen hebben betrekking op de inclusiecriteria

voor de patiënten (geen (adenovirus)infectie, goed functionerend immuunsysteem), het monitoren van shedding en het beschermen van de patiënt en de medewerkers of bezoekers. Mede omdat een patiënt mogelijk het ziekenhuis voor beëindiging van het experiment zou kunnen verlaten, achtte de COGEM de risico's van de klinische studie aanvankelijk niet verwaarloosbaar klein.

Op basis van dit advies heeft de aanvrager destijds aanvullende informatie aangeleverd over de conditie van de patiënten, de kans dat zij het ziekenhuis voortijdig verlaten en het handhaven van inperkingmaatregelen in een andere omgeving (thuis) dan het ziekenhuis. Naar aanleiding van deze aanvullende informatie achtte de COGEM de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.²² In een later stadium, heeft de aanvrager nog verzocht de periode waarin de patiënt in een isolatiekamer moest verblijven, in te mogen korten. De COGEM heeft daarmee ingestemd, indien de wonden na drie opeenvolgende inspecties geen vocht zouden afscheiden.²³

5. Overweging

In de onderhavige aanvraag wordt een conditioneel-replicerende adenovirale vector toegediend aan patiënten met slokdarmkanker. Risico's die hierbij kunnen optreden hebben betrekking op de pathogeniteit van het ggo, de eventuele vorming van nieuwe recombinante virussen en de mogelijke verspreiding van het ggo in het milieu. Door deze verspreiding zouden andere personen dan de deelnemende patiënten geïnfecteerd kunnen worden met het ggo of met een nieuw recombinant virus. Hieronder wordt op deze aspecten ingegaan.

5.1 Moleculaire karakterisering van ORCA-010

Sequencing van het volledige genoom bevestigt dat de sequentie van ORCA-010 identiek is aan HAdV-5 met uitzondering van de drie aangebrachte modificaties. De stabiliteit van ORCA-010 is aangetoond door de 'master virus seed stock' (MVSS) na 20 keer passeren te controleren door middel van restrictie- en sequentieanalyses. De aanvrager heeft geen genetische veranderingen waargenomen na 20 passages. Ter vergelijking geeft de aanvrager aan dat voor productie van ORCA-010 drie passages nodig zijn.

De COGEM is van oordeel dat de aanvrager de moleculaire karakterisering van ORCA-010 voldoende heeft uitgevoerd.

5.2 Pathogeniteit van ORCA-010

ORCA-010 bevat een modificatie in het E3/19K-gen waardoor een geïnfecteerde cel naar verwachting beter door het immuunsysteem herkend kan worden ten opzichte van wildtype HAdV-5, maar ORCA-010 ook sneller vrijkomt uit geïnfecteerde cellen.¹² Daarnaast is ORCA-010 door de deletie van 24 nucleotiden in E1A niet meer in staat effectief te repliceren in niet-delende cellen. Onderzoek toont aan dat HAdV-5 met deze deletie van 24 nucleotiden (HAdV-5-Delta24) niet efficiënt kan repliceren in rustende longepitheelcellen en microvasculaire endotheelcellen. In deze cellen is de replicatie van het wildtype virus 2.000 tot 10.000% meer efficiënt.²⁴ In een andere *in vitro* studie kon geen replicatie van HAdV-5-Delta24 in rustende longfibroblasten aangetoond worden.²⁵

Naast rustende cellen komen in het lichaam ook gezonde delende cellen voor, zoals darmcellen. Uit onderzoek blijkt dat HAdV-5-Delta24 in enige mate kan repliceren in delende longepitheelcellen en

microvasculaire endotheelcellen. Replicatie is echter vele malen lager dan in kankercellen (circa 100 maal).²⁴ Hierbij moet worden opgemerkt dat in gezonde delende cellen het E2F slechts gedurende korte tijd vrij in de cel aanwezig is (enkele uren), waardoor eventuele virusreplicatie tot deze periode beperkt is. Hierna wordt E2F weer gebonden en zal replicatie van ORCA-010 niet meer plaatsvinden.

Door toevoeging van het extra RGD-motief is ORCA-010 in staat om effectief cellen te infecteren die bepaalde integrines (met name $\alpha_v\beta_3$ en $\alpha_v\beta_5$) op hun celmembraan tot expressie brengen, ook als deze cellen niet de natuurlijke receptoren (CAR) voor HAdV-5 bezitten. Door deze modificatie kunnen bepaalde tumorcellen, die deze integrines verhoogd tot expressie brengen, effectiever worden geïnfecteerd. Daarnaast brengen onder meer geactiveerde endotheelcellen, fibroblasten en epitheelcellen deze integrines op hun celmembraan tot expressie. Deze cellen zijn te vinden in onder meer de luchtwegen, ogen en de darmen.^{26,27,28,29,30} De COGEM wijst erop dat daardoor het gastceltropisme (dat wil zeggen het aantal celtypes dat gevoelig is voor het binnendringen van het ggo) van ORCA-010 is uitgebreid ten opzichte van wildtype adenovirus. Echter, hoewel het extra RGD-motief ervoor zorgt dat meer cellen worden geïnfecteerd, zal er in deze cellen geen efficiënte replicatie kunnen plaatsvinden.

Gezien het bovenstaande is de COGEM van oordeel dat ORCA-010 in staat is om efficiënt celtypes te infecteren die normaliter niet efficiënt door HAdV-5 geïnfecteerd kunnen worden. Daarnaast komen virusdeeltjes sneller vrij uit met ORCA-010 geïnfecteerde cellen en worden deze naar verwachting ook sneller herkend worden door het immuunsysteem. Daarentegen kan het gg-virus zich niet efficiënt in gezonde cellen vermenigvuldigen vanwege de deletie van 24 basenparen in het E1A gen. Daarom is de COGEM van oordeel dat het virus geattenuëerd is ten opzichte van het oudervirus.

5.3 Shedding van ORCA-010

5.3.1 Immuniteit tegen HAdV-5 onder de patiënten

Immuungecompromitteerde patiënten zijn uitgesloten van deelname aan de klinische studie. Met het oog op de algemeen aanwezige immuniteit onder de populatie zullen de meeste patiënten die deelnemen aan de onderhavige klinische studie immuniteit bezitten tegen HAdV-5. Hierdoor zal na toediening van ORCA-010 het immuunsysteem direct op gang komen en ORCA-010 inactiveren. Bovendien wordt een adenovirale vector die in de bloedbaan aanwezig is, efficiënt door Kupffercellen in de lever opgenomen en daarbij uit de circulatie verwijderd.^{31,32} Studies waarbij een adenovirale vector systemisch werd toegediend aan dieren laten een aanzienlijke afname (meer dan 90%) van de vector zien binnen 24 uur na toediening.^{33,34,35} Deze opname door Kupffercellen is één van de grote belemmeringen voor het ontwikkelen van een systemische gentherapiebehandeling met adenovirale vectoren.^{33,31}

De COGEM is van oordeel dat de duur van eventuele shedding van ORCA-010 beperkt zal zijn door de verwachte immuunreactie in de proefpersoon.

5.3.2 Risico van shedding

Er zijn geen gegevens beschikbaar over de biodistributie en shedding (uitscheiding) van ORCA-010 na toediening in slokdarmtumoren. Wel zijn er gegevens beschikbaar van klinische studies met vergelijkbare vectoren. In een klinische studie waarbij een ander oncolytisch HAdV-5 geïnjecteerd werd in slokdarmtumoren met dezelfde totale dosis, kon na toediening geen viraal DNA in urine, uitwerpselen,

speeksel en sputum gedetecteerd worden met behulp van qPCR-analyse.³⁶ In het bloed werd vector-DNA tot 90 minuten na toedienen gedetecteerd, maar 24 uur na toediening niet meer. In een andere studie waarbij een HAdV-5-Delta24-RGD (dit gg-virus bezit dezelfde mutaties als het virus van de huidige aanvraag m.u.v. de E3/19K-modificatie) in hersentumoren geïnjecteerd werd, kon geen viraal DNA gedetecteerd worden in orale, anale monsters of in bloed, maar werd het ggo wel in hersenvocht gedetecteerd.³⁷ Adenovirussen worden snel geïnactiveerd in het bloed en uit meerdere klinische studies met oncolytische adenovirussen blijkt dat er geen infectieus virus in bloed of hersenvocht kon worden gedetecteerd.^{38,39,40}

Gezien de aard van adenovirussen zal verspreiding via aerosolen, zoals bij niezen, het grootste gevaar van besmetting van andere personen zijn. Echter, de COGEM is van oordeel dat de daaropvolgende kans op infecties van derden door ORCA-010 zeer klein, omdat ORCA-010 geattenuëerd is ten opzichte van wildtype HAdV5. Door de aangebrachte modificaties kan het virus slechts in een beperkt aantal cellen repliceren en wordt het naar verwachting beter door het immuunsysteem herkend dan wildtype HAdV-5. ORCA-010 zal d.m.v. meerdere injecties (totaal max. $1,5 \times 10^{12}$ genoomkopieën) lokaal in de tumor geïnjecteerd worden. Door de intratumorale toediening is het zeer onwaarschijnlijk dat aerosolen worden gevormd. Verder worden er tijdens de toediening maatregelen genomen om verspreiding te voorkomen, zoals het legen van de maag vlak voor de behandeling, afzuiging van vloeistoffen die eventueel in de slokdarm komen tijdens het injecteren, en afscherming van de injectienaald tijdens de procedure. Daarnaast zal de zure omgeving in de maag de vector naar verwachting inactiveren wanneer ORCA-010 tijdens of na toediening vrijkomt. Humane adenovirussen, zoals HAdV-5, die CAR-bindende capsidfibers hebben worden geïnactiveerd bij 37 °C en een pH lager dan 5,5.^{41,42} Overigens kunnen sommige humane adenovirussen ook het maagdarmsstelsel infecteren, maar bezitten deze HAdV-types specifieke ‘short fibers’ die bestand zijn tegen lage pH waardes.^{42,43} In het geval van regurgitatie hanteert de aanvrager als extra maatregel dat vloeistoffen afkomstig uit de maag tot 24 uur na de toediening van ORCA-010 ontsmet moeten worden door middel van chloor. Verder dient personeel als extra maatregel beschermende wegwerpkleding, handschoenen en een FFP2-gezichtsmasker te dragen.

Bovenstaande in overweging nemende acht de COGEM het risico van shedding verwaarloosbaar klein.

5.4 Recombinatie

Indien een patiënt bij toediening van de vector een infectie doormaakt met HAdV-5 zou dit virus eventueel kunnen recombineren met ORCA-010. De mogelijkheid tot recombinatie beperkt zich niet alleen tot de patiënt.

5.4.1 Risico's van HAdV-5-Delta24 recombinanten zijn verwaarloosbaar klein

Eén van de potentiële recombinanten die kan ontstaan is die waarbij een wildtype HAdV-5 de Delta24-deletie overneemt, al dan niet in combinatie met RGD- en/of E3/19K-modificatie. Recombinanten met de Delta24-deletie zijn niet meer in staat om te repliceren in cellen met een functioneel Rb-pathway, welke aanwezig is in ‘gezonde’ cellen. De COGEM is van oordeel dat potentiële risico's van HAdV-5-Delta24 recombinanten verwaarloosbaar klein zijn, omdat deze recombinanten sterk verzwakt zijn ten opzichte van HAdV-5.

5.4.2 Mogelijke risico's van recombinanten met E3/19K en/of RGD-modificatie

Een andere potentiële recombinant is een HAdV-5-E3/19K die bestaat uit een wildtype HAdV-5 met de E3/19K-modificatie. Uit geïnfecteerde cellen met deze recombinant zal enerzijds nieuw gevormd infectieus virus sneller vrijgelaten worden uit de cel, maar zal anderzijds het virus naar verwachting ook sneller door het immuunsysteem herkend worden. Deze recombinant zou potentieel een hoger risico vormen voor immuungecompromitteerde mensen. Echter, het gaat hier om een deletiemutant die *in vivo* nog nooit aangetroffen is. De COGEM is daarom van oordeel dat het onwaarschijnlijk is dat deze deletiemutant zal leiden tot een virus met een verhoogde fitness.

De laatste potentiële recombinanten zijn een HAdV-5-RGD of een HAdV-5-RGD variant i.c.m. de E3/19K modificatie die zouden resulteren in een adenovirus met een uitgebreid celtropisme. De COGEM beschouwt het ontstaan van deze recombinanten als een 'worst-case' scenario. Deze recombinanten zouden in staat kunnen zijn om vele celtypes te infecteren, zowel gezonde cellen als tumorcellen. Gegevens over de eigenschappen van een dergelijke recombinant ontbreken en zijn niet eenvoudig te verkrijgen. Eventuele experimenten met een geconstrueerde recombinant in proefdiermodellen zijn weinigzeggend, omdat HAdV-5 een humaan pathogeen is.

De COGEM is van oordeel dat een RGD-variant hoogstwaarschijnlijk niet minder pathogeen is dan het wildtype adenovirus en dat immuungecompromitteerde individuen mogelijk meer risico lopen. Of risico's van een infectie met de recombinant groter zijn dan bij een infectie met HAdV-5 is lastig te voorspellen.

5.4.3 De kans op recombinatie

Uit onderzoek blijkt dat onder *in vitro* omstandigheden recombinatie tussen verschillende typen adenovirussen niet is uit te sluiten.⁴⁴ Overigens zijn er *in vivo* studies uitgevoerd met replicatiedeficiënte adenovirale vectoren, waarbij is gekeken of een eventuele recombinatie van de vector met HAdV-5 tot een replicatiecompetent adenovirus leidt. Bij geen van de studies werd replicatiecompetent adenovirus gedetecteerd.⁴⁵

Zoals eerder vermeld, verloopt een infectie met het wildtype virus in mensen met een gezond afweersysteem asymptomatisch of met lichte verkoudheidssymptomen. Wildtype virus en ORCA-010 zullen snel worden geïnactiveerd door het immuunsysteem. Aan de klinische studie mogen alleen patiënten met een goed functionerend immuunsysteem meedoen.

Daarnaast is de aanvrager voornemens om patiënten twee werkdagen vooraf te testen op de aanwezigheid van een actieve adenovirusinfectie. De COGEM is van oordeel deze periode te lang is in geval van weekenden of feestdagen. In de periode tussen de test en aanvang van de toediening zou de patiënt namelijk alsnog een adenovirusinfectie kunnen oplopen. De COGEM adviseert daarom om twee dagen aansluitend aan de dag van toediening te testen op de aanwezigheid van een actieve adenovirusinfectie.

Daarnaast adviseert de COGEM als extra maatregel om patiënten met klinische verschijnselen van een adenovirus infectie zoals koorts, verkoudheidsachtige verschijnselen (hoesten, niezen, kortademig) en diarree uit te sluiten van toediening.

Ook adviseert de COGEM als additionele veiligheidsmaatregel om ook in de periode na de test en toediening van ORCA-010 te monitoren op de bovengenoemde klinische verschijnselen om uit te sluiten dat er een late adenovirale infectie optreedt die niet gedetecteerd kon worden op het moment van testen twee dagen vóór toediening. Indien er sprake is van een adenovirale infectie moet het virus geanalyseerd worden teneinde uit te kunnen sluiten dat recombinatie heeft plaatsgevonden.

Recombinatie tussen ORCA-010 en het HAdV-5 zou alleen kunnen plaatsvinden wanneer beide zich tegelijkertijd in dezelfde cel bevinden (co-infectie). Infecties met HAdV-5 beperken zich veelal tot de luchtwegen. De CAR bevindt zich aan de basolaterale membraankant van de cellen.⁴⁶ Hierdoor zijn de cellen niet eenvoudig door HAdV-5 te bereiken en zal een adenovirusinfectie waarschijnlijk alleen optreden wanneer het weefsel beschadigd is.⁴⁷ Samengevat worden er per infectie een beperkt aantal longcellen geïnfecteerd door HAdV-5. ORCA-010 repliceert door de deletie in het E1A-gen met name in cellen van de tumor en niet in gezonde rustende cellen. De COGEM acht het echter zeer onwaarschijnlijk dat ORCA-010 en een wildtype virus tegelijkertijd dezelfde cel in de patiënt infecteren en hierna recombinatie optreedt. Daarbij wordt de patiënt vooraf getest op de aanwezigheid van een actieve adenovirusinfectie en zijn immuungecompromitteerde patiënten uitgesloten van deelname aan de studie. Daarnaast wordt ORCA-010 lokaal intratumoraal geïnjecteerd en worden extra beschermings- en monitoringsmaatregelen genomen om de kans op recombinatie te verkleinen. Samengevat, is de COGEM van oordeel dat de kans op recombinatie in een patiënt verwaarloosbaar klein is.

Recombinatie zou ook mogelijk kunnen zijn wanneer een patiënt ORCA-010 uitscheidt en andere personen besmet die een infectie met HAdV-5 hebben. De kans op shedding van ORCA-010 door de patiënt is zeer klein. Door de zure omgeving in de maag zal ORCA-010 geïnactiveerd worden wanneer het de maag bereikt. In geval van regurgitatie zullen de vrijgekomen vloeistoffen ontsmet worden met behulp van chloor. Daarnaast is ORCA-010 geattenuëerd. Hierdoor wordt de kans zeer klein geacht dat derden besmet raken met ORCA-010. Voor recombinatie in derden moet deze persoon daarnaast ook een adenovirale infectie doormaken. Gezien de snelle inactivatie door het immuunsysteem en de daarnaast zeer kleine kans op co-infectie acht de COGEM de kans dat recombinatie in derden optreedt, verwaarloosbaar klein.

6. Advies

De aanvrager is voornemens een klinische studie uit te voeren waarbij patiënten met slokdarmkanker worden behandeld met een conditioneel-replicerende gg-HAdV-5, ORCA-010. Risico's die hierbij kunnen optreden hebben betrekking op de pathogeniteit van het ggo, de eventuele vorming van nieuwe recombinante virussen en de mogelijke verspreiding van het ggo in het milieu. In de vector zijn drie modificaties aangebracht waardoor de vector alleen repliceert in delende cellen, kankercellen effectiever geïnfecteerd worden, de vector sneller vrijkomt uit geïnfecteerde cellen en de vector naar verwachting sneller herkend wordt door het immuunsysteem.

De COGEM dat acht ORCA-010 verzwakt is ten opzichte van het wildtype virus vanwege een deletie van 24 nucleotiden in het E1A-gen. Daardoor is de vector niet meer in staat effectief te repliceren in niet-delende cellen. Daarnaast kan, door een modificatie in het E3/19K-gen in ORCA-010, een geïnfecteerde cel waarschijnlijk beter door het immuunsysteem herkend worden ten opzichte van wildtype HAdV-5.

Gezien de intratumorale toediening, de genomen voorzorgsmaatregelen tijdens en na toediening om verspreiding van ORCA-010 te voorkomen en de beschikbare gegevens over biodistributie van vergelijkbare vectoren, acht de COGEM de risico's van shedding verwaarloosbaar klein. Indien ORCA-010 vanuit de patiënt vrijkomt zijn de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein, omdat ORCA-010 geattenuëerd is, adenovirale infecties zelflimiterend zijn en nagenoeg de gehele bevolking immuniteit tegen adenovirale infecties bezit. Hierdoor zal een eventuele infectie na verspreiding in de patiënt of in derden snel uitdoven.

De COGEM acht het echter zeer onwaarschijnlijk dat ORCA-010 en een wildtype virus tegelijkertijd dezelfde cel in de patiënt infecteren en hierna recombinatie optreedt. Door recombinatie zou een HAdV-5 met het RGD-motief kunnen ontstaan. Deze recombinant is mogelijk pathogener door een uitgebreid gastceltropisme. Terwijl wildtype HAdV-5 veelal longepitheelcellen infecteert, zou de theoretische recombinant mogelijk alle celtypen kunnen infecteren. Of de risico's van een infectie met een dergelijk virus groter zijn dan van een infectie met een wildtype adenovirus, is moeilijk te voorspellen. Om de kans op recombinatie te verminderen, adviseert de COGEM om twee dagen vóór toediening te testen op de aanwezigheid van een actieve adenovirus infectie. Daarnaast worden immuungecompromitteerde patiënten of patiënten die klinische verschijnselen vertonen van een adenovirale infectie uitgesloten van deelname aan de studie. Het bovenstaande in overweging nemende, acht de COGEM de risico's van het ontstaan van een recombinant virus verwaarloosbaar klein. Wel adviseert de COGEM als extra maatregel om te monitoren op klinische verschijnselen van een adenovirale infectie om uit te sluiten dat er een late, niet eerder gedetecteerde, adenovirale infectie optreedt in de patiënt. Indien er sprake is van een adenovirale infectie moet het virus geanalyseerd worden teneinde uit te kunnen sluiten dat recombinatie heeft plaatsgevonden.

Concluderend is de COGEM van oordeel dat de milieurisico's verbonden aan deze klinische studie met een conditioneel-replicerend humaan adenovirus verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). <https://ictv.global/report/chapter/adenoviridae/adenoviridae/mastadenovirus> (bezocht op: 29-04-2024)
2. McConnell MJ & Imperiale MJ (2004). Biology of adenovirus and its use as a vector for gene therapy. Hum. Gene Ther. 15: 1022-1033
3. Knipe DM & Howley PM (2001). Fields virology, volume two, fourth edition. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia.
4. Vorburger SA & Hunt KK (2002). Adenoviral gene therapy. Oncologist 7: 46-59
5. Brew BJ & Garrick R (1987). Gliomas presenting outside the central nervous system. Clin. Exp. Neurol. 23: 111-117
6. Lenaerts L *et al.* (2008). Clinical features and treatment of adenovirus infections. Rev. Med. Virol. 18: 357-374

7. Sumida AM *et al.* (2005). Neutralizing antibodies to adenovirus serotype 5 vaccine vectors are directed primarily against the adenovirus hexon protein. *J. Immunol.* 174: 7179-7185
8. Nwanegbo E *et al.* (2004). Prevalence of neutralizing antibodies to adenoviral serotypes 5 and 35 in the adult populations of The Gambia, South Africa, and the United States. *Clin. Diagnos. Lab. Immunol.* 11: 351-357
9. Goossens PH *et al.* (2001). The influence of synovial fluid on adenovirus-mediated gene transfer to the synovial tissue. *Arthr. Reum.* 44: 48-52
10. Chirmule N *et al.* (1999). Immune respons to adenovirus and adeno-associated virus in humans. *Gene Ther.* 6: 1574-1583
11. Miller DL *et al.* (2006). Adenovirus type 5 exerts genome-wide control over cellular programs governing proliferation, quiescence, and survival. *Genome Biology* 8: R58
12. Gros A *et al.* (2008) Bioselection of a gain of function mutation that enhances adenovirus 5 release and improves its antitumoral potency. *Cancer Res.* 68: 8928-37
13. Shayakhmetov DM *et al.* (2005). Deletion of penton RGD motif affects the efficiency of both internalization and the endosome escape of viral particles containing adenovirus serotype 5 or 35 fiber knobs. *J. Virol.* 79: 1053-1061
14. COGEM (2023) Actualisatie van de pathogeniciteitsclassificatielijsten met humaan- en dierpathogene DNA- en RNA-virussen. CGM/230929-01
15. COGEM (2006). Toediening van een adenovirale vector coderend voor interleukine-12 aan patiënten met prostaattumoren. COGEM advies CGM/060512-01
16. COGEM (2019). Klinische studie met gg-adenovirale vector (rAd-INF) bij patiënten met kwaadaardige pleurale mesothelioom. COGEM advies CGM/191017-03
17. COGEM (2020). Klinische studie met een adenovirale vector (Ad26COVS1) ter preventie van COVID-19. COGEM advies CGM/200710-02
18. COGEM (2021). Klinische studies met adenovirale en MVA-vectoren. CGM/210324-03
19. COGEM (2021). Generieke milieuriscobeoordeling van klinische studies met replicatiedeficiënte AdV-vectoren. COGEM advies CGM/210324-02
20. COGEM (2012). Klinische studie met een conditioneel-replicerende adenovirale vector als aanvullende behandeling van prostaatkanker. COGEM advies CGM/120710-01
21. COGEM (2009). Klinische studie met een conditioneel-replicerende adenovirale vector. COGEM advies CGM/090429-04
22. COGEM (2009). Aanvullende informatie over een klinische studie met conditioneel-replicerende adenovirussen. COGEM advies CGM/091021-02
23. COGEM (2011). Verzoek tot wijziging vergunning fase I/II klinische studie met conditioneel-replicerende adenovirussen. COGEM advies CGM/110112-01
24. Heise C *et al.* (2000). An adenovirus E1A mutant that demonstrates potent and selective systemic anti-tumoral efficacy. *Nature Med.* 6: 1134-1139
25. Fueyo J *et al.* (2000). A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effects *in vivo*. *Oncogene* 19: 2-12
26. Beer AJ & Schwaiger M (2008). Imaging of integrin $\alpha v \beta 3$ expression. *Cancer Metas Rev* 27: 631-644
27. Rayner SA *et al.* (1998). Distribution of integrins alpha v beta 5, alpha v beta 3 and alpha v in normal human cornea: possible implications in clinical and therapeutic adenoviral infection. *Eye* 12: 273-277

28. Pechkovsky DV *et al.* (2008). Transforming growth factor β 1 induces $\alpha\beta$ 3 integrin expression in human lung fibroblasts via a β -, c-Src, and p38 MAPK-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 283: 12898-12908
29. Wilder RL (2002). Integrin alpha v beta 3 as a target for treatment of rheumatoid arthritis and related rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* 61: 96-99
30. Goldman MJ & Wilson JM (1995). Expression of $\alpha\beta$ 5 integrin is necessary for efficient adenovirus-mediated gene transfer in the human airway. *J. Virol.* 69: 5951-5958
31. Xu Z *et al.* (2008). Clearance of adenovirus by Kupffer cells is mediated by scavenger receptors, natural antibodies and complement. *J. Virol.* 82:11705-11713
32. Smith J *et al.* (2008). A quantitative assay for measuring clearance of adenovirus vectors by Kupffer cells. *J. Virol. Methods* 147: 54-60
33. Goossens PH *et al.* (2001). The influence of synovial fluid on adenovirus-mediated gene transfer to the synovial tissue. *Arthr. Reum.* 44: 48-52
34. Alemany R & Curiel DT (2001). CAR-binding ablation does not change biodistribution and toxicity of adenoviral vectors. *Gene Ther.* 8: 1347-1353
35. Worgall S *et al.* (1997). Innate immune mechanisms dominate elimination of adenoviral vectors following *in vivo* administration. *Hum. Gene Ther.* 8: 37-44
36. Shirakawa Y *et al.* (2021). Phase I dose-escalation study of endoscopic intratumoral injection of OBP-301 (Telomelysin) with radiotherapy in oesophageal cancer patients unfit for standard treatments. *Eur. J. Cancer* 153: 98-108
37. Van Putten *et al.* (2022). Convection enhanced delivery of the oncolytic adenovirus delta24-RGD in patients with recurrent GBM: a phase I clinical trial including correlative studies. *Clin. Cancer Res.* 28: 1572-1585
38. Freytag SO *et al.* (2002). Phase I study of replication-competent adenovirus-mediated double suicide gene therapy for the treatment of locally recurrent prostate cancer. *Cancer Res.* 62: 4968-4976
39. Freytag SO *et al.* (2003). Phase I study of replication-competent adenovirus-mediated double-suicide gene therapy in combination with conventional-dose three-dimensional conformal radiation therapy for the treatment of newly diagnosed, intermediate-to high-risk prostate cancer. *Cancer Res.* 63: 7497-7506
40. DeWeese, TL *et al.* (2001). A phase I trial of CV706, a replication-competent, PSA selective oncolytic adenovirus, for the treatment of locally recurrent prostate cancer following radiation therapy. *Cancer Res.* 61: 7464-7472
41. Wiethoff CM *et al.* (2005) Adenovirus protein VI mediates membrane disruption following capsid disassembly. *J. Virol.* 79: 1992-2000
42. Rajan A *et al.* (2021). Heparan sulfate is a cellular receptor for enteric human adenoviruses. *Viruses* 13: 298
43. Rodríguez E *et al.* (2013). Short-fiber protein of ad40 confers enteric tropism and protection against acidic gastrointestinal conditions. *Hum. Gene Ther. Methods* 24: 195-204
44. Rainbow AJ & Castillo JE (1992). Homologous recombination of adenovirus DNA in mammalian cells: enhanced recombination following UV-irradiation of the virus. *Mutat. Res.* 274: 201-210
45. Schenk-Braat EAM *et al.* (2006). Inventarisatie van shedding data en analyses: mogelijkheden voor standaardisering. COGEM onderzoeksrapport CGM 2006-04
46. Brandon EFA *et al.* (2008). Effect of administration route on biodistribution and shedding of replication-deficient viral vectors used in gene therapy. RIVM 320001001/2008

47. Walters RW *et al.* (1999). Basolateral localization of fiber receptors limits adenovirus infection from the apical surface of airway epithelia. *J. Biol. Chem.* 274: 10219-10226