

De minister van Volkshuisvesting  
Ruimtelijke Ordening en Milieubeheer  
Mevrouw dr. J.M. Cramer  
Postbus 30945  
2500 GX Den Haag

DATUM 29 april 2009  
KENMERK CGM/090429-04  
ONDERWERP Advies: Conditioneel-replicerende adenovirale vectoren

Geachte mevrouw Cramer,

Naar aanleiding van de aanvraag voor een klinische studie met conditioneel-replicerende adenovirale vectoren, van het Erasmus Medisch Centrum en het VU Medisch Centrum, adviseert de COGEM als volgt.

#### **Samenvatting**

De COGEM is verzocht te adviseren over een klinische studie fase I/II waarbij een zogenaamde conditioneel-replicerende adenovirale vector wordt toegediend aan patiënten met een hersentumor. De vector wordt door infusie (50-68 uur) via katheters ingebracht in of rond de tumor. Deze toediening vindt plaats in een isolatiekamer. Vierentwintig uur na de toediening wordt de patiënt overgebracht naar een verpleegruimte zonder inperkende maatregelen. 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 adenovirus serotype 5 en kan slechts in tumorcellen effectief repliceren. Gezien de aard van het ggo is de COGEM van mening dat het ggo verzwakt is ten opzichte van het oudervirus.

Na toediening van het ggo aan de patiënt, kan niet uitgesloten worden dat het ggo zich vanuit de hersenen verspreidt naar andere delen van het lichaam. Hoewel het lichaam het ggo snel zal inactiveren, valt shedding naar de mening van de COGEM niet geheel uit te sluiten.

Daarnaast is er een 'worst-case' scenario waarbij recombinatie van het ggo met een wildtype adenovirus optreedt, wat theoretisch zou kunnen leiden tot de vorming van een replicerend adenovirus met een verhoogd gastheerbereik. 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.

De risico's van shedding van het ggo en van de theoretische recombinant zijn in de isolatiekamer verwaarloosbaar klein gezien de voorzorgsmaatregelen, waaronder het dragen van beschermende kleding. De COGEM is echter van mening dat buiten de isolatiekamer aanvullende voorzorgsmaatregelen noodzakelijk zijn om de kans op infectie met de potentiële recombinant bij derden te verkleinen. De COGEM adviseert om de patiënten dagelijks te testen op shedding van virale sequenties. Totdat shedding niet meer waargenomen wordt, dient de patiënt verpleegd te worden op een eenpersoonskamer en dienen verzorgers en bezoekers in deze ruimte mondkapjes te dragen.

Onder deze voorwaarde meent de COGEM dat de risico's van deze klinische studie voldoende geminimaliseerd zijn om een vergunning te rechtvaardigen. De COGEM signaleert dat de risicobeoordeling in dit geval tot een andere afweging heeft geleid dan gebruikelijk.

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

Hoogachtend,

A handwritten signature in black ink, consisting of a large loop on the left and a long horizontal stroke extending to the right.

Prof. dr. ir. B.C.J. Zoeteman  
Voorzitter COGEM

cc. Drs. H.P. de Wijs  
Dr. I. van der Leij

# Klinische studie met een conditioneel-replicerende Adenovirale vector

## COGEM advies CGM/090429-04

### 1. Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over een fase I/II klinische studie waarbij een conditioneel-replicerende adenovirale vector wordt toegediend aan patiënten met een hersentumor. De vergunningaanvraag is ingediend door het Erasmus Medisch Centrum en het VU Medisch Centrum.

#### 1.1 Adenovirussen

Adenovirale vectoren zijn afgeleid van adenovirussen (*Adenoviridae*, genus *Mastadenovirus*) en worden veelvuldig gebruikt als een effectief genoverdrachtsysteem. Er bestaan 51 verschillende serotypes humane adenovirussen, welke geclassificeerd kunnen worden in zes groepen (A tot en met F). Adenovirussen hebben een gastheerbereik dat beperkt is tot één soort of tot nauw verwante soorten.<sup>1,2,3</sup> Verschillende adenovirussen kunnen de luchtwegen, het maag-darmstelsel en soms de ogen infecteren.<sup>4</sup> Een infectie verloopt meestal asymptomatisch of met lichte verkoudheidssymptomen waarvoor normaal gesproken geen noodzaak is voor medische behandeling.<sup>31</sup> De infectie is doorgaans zelflimiterend. Bij immuungecompromiteerde patiënten kunnen echter ontstekingen aan de nieren en longen ontstaan met mogelijk fatale gevolgen.<sup>2</sup>

In de onderhavige adviesvraag wordt groep C serotype 5 adenovirus (hAd5) als basis gebruikt voor de adenovirale vector. Infectie met type 5 adenovirus kan leiden tot verkoudheidsverschijnselen.

#### 1.2 Moleculaire karakterisering van adenovirussen

Adenovirussen bestaan uit een lineair dubbelstrengs DNA molecuul omgeven door een eiwitmantel.<sup>1,2</sup> Het genoom van hAd5 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 vroege regio bevat onder andere het gen *E1*. E1 eiwitten zijn betrokken bij de activering van de overige vroege en late genen en induceren de DNA synthese van de gastheercel. Bovendien remt E1 apoptose (geprogrammeerde celdood) van de gastheercel.<sup>1,2,5</sup>

### 2. De adviesvraag

Hieronder wordt ingegaan op de gehanteerde adenovirale vector, het doel en de opzet van het onderzoek.

#### 2.1 De adenovirale vector

De aanvragers gebruiken een conditioneel-replicerend adenovirus (Ad5-Delta24-RGD) als genetisch gemodificeerd organisme. Deze vector is zo geconstrueerd dat replicatie in principe alleen in sneldelende tumorcellen kan plaatsvinden.

Uit het genoom van de vector zijn ten eerste 24 basenparen van het virale *E1A* gen verwijderd, waardoor dit ggo alleen zou kunnen repliceren in tumorcellen en niet in rustende cellen. In rustende cellen is het retinoblastoma eiwit (Rb) gebonden aan het cellulaire eiwit E2F, waardoor celdeling niet plaatsvindt. Bij een infectie met een wildtype virus remt het virale E1A eiwit de functie van Rb,

waardoor E2F vrijkomt. Dit leidt ertoe dat celdeling optreedt, en daarmee ook dat virusrepletie mogelijk wordt. De deletie van 24 basenparen in het virusgenoom van het ggo verandert het virale E1A eiwit, waardoor dit niet meer kan binden aan Rb en E2F niet kan worden vrijgemaakt. Hierdoor kan het ggo niet repliceren in gezonde rustende cellen. Veel tumorcellen, zoals gliomen, hebben echter een gewijzigde vorm van Rb waardoor E2F niet meer wordt gebonden en deze cellen continu delen. De Rb-remmende functie van het adenovirale E1A is in deze cellen dus niet nodig. Het ggo kan daarom wel repliceren in tumorcellen, maar niet in gezonde rustende cellen.

Ten tweede is de virusmantel van de vector aangepast door een sequentie coderend voor het arginine-glycine-asparagine-4C peptide (RGD-motief) aan het erfelijke materiaal toe te voegen. Dit RGD-motief is in de zogenaamde fiber aan de buitenkant van het virusdeeltje geplaatst. De fiber is mede verantwoordelijk voor de herkenning van de cellen welke het virus kan binnendringen (transduceren). Door toevoeging van het RGD-motief is het ggo in staat om cellen te transduceren die bepaalde integrines (met name  $\alpha_v\beta_3$  en  $\alpha_v\beta_5$ ) op hun celmembraan tot expressie brengen, zelfs al bezitten deze cellen niet de natuurlijke receptoren voor hAd5. Dit betekent dat het ggo een groter aantal verschillende celtypen kan binnendringen dan hAd5. Overigens bezit hAd5 ook van nature een RGD-motief.<sup>6</sup> Hoewel dit motief een rol speelt bij de transductie van gastheercellen, is het nauwelijks betrokken bij de primaire interactie van het virus met de gastheercel.

## **2.2 Doel en opzet van het onderzoek**

De studie (met maximaal 42 patiënten) heeft als doel de ontwikkeling van een nieuwe behandelmethodede voor hersentumoren, met name voor glioblastoma multiforme. Deze vorm van kanker is één van de meest agressieve vormen die er bestaan. Ondanks therapie om deze kanker te bestrijden, bedraagt de gemiddelde overlevingsduur na het stellen van de diagnose slechts één jaar.

De huidige therapie bestaat uit het verwijderen van de hersentumor. Echter, de tumorcellen infiltreren ook in het omliggende gezonde hersenweefsel waardoor het niet mogelijk is om het resterende tumorweefsel zonder verlies van hersenfunctie operatief te verwijderen. Daarom hanteren de aanvragers een andere behandelmethodede waarbij de zogenaamde Convection Enhanced Delivery (CED), van belang is. Voorafgaand aan de klinische studie worden bij deelnemers operatief vier katheters in de hersenen geplaatst. Via deze katheters wordt het ggo Ad5-Delta24-RGD gedurende 50 tot 68 uur langzaam direct in de (niet-opereerbare) tumor of in het met tumorcellen geïnfecteerde hersenweefsel gebracht. De toegediende dosis varieert van  $1 \times 10^7$  tot  $1 \times 10^{11}$  virale deeltjes. Het doel van het experiment is dat het ggo de tumorcellen zal binnendringen en daarin zal repliceren. Dit heeft tot gevolg dat de geïnfecteerde cellen doodgaan en dat nieuw gevormde virusdeeltjes vrijkomen. Deze deeltjes kunnen opnieuw tumorcellen infecteren.

Na afloop van de toediening van het ggo worden de katheters verwijderd en worden de wonden gehecht. Vervolgens worden de wonden afgeplakt met een niet-vochtdoorlatend verband dat gedurende de daaropvolgende dagen wordt gecontroleerd op lekkage.

Verder krijgen de patiënten dexamethason toegediend vanaf de dag voor de operatie tot 5 dagen erna. Dexamethason wordt bij hersentumoroperatie toegediend worden ter vermindering van bestaand oedeem (als gevolg van de tumor) en ter voorkoming van het ontstaan van oedeem als gevolg van de operatie.<sup>25</sup>

De aanvragers hebben aanvullende maatregelen opgesteld om verspreiding van het ggo in het milieu en daardoor besmetting van derden (zoals ziekenhuismedewerkers en bezoek voor de patiënt) te

voorkomen. De patiënten worden bijvoorbeeld tijdens de toediening van het ggo, en tot 24 uur daarna, in een isolatiekamer met sluis verpleegd. Er is gekozen voor 24 uur omdat de hoofdwonden na deze periode normaliter dicht zijn. Indien de wond nog vochtig is, blijft de patiënt in de isolatiekamer totdat de wond droog is. Na deze 24 uur zal de patiënt zonder verdere inperkende maatregelen worden verpleegd.

De aanvragers stellen voor om patiënten met een actieve adenovirale infectie uit te sluiten van deelname aan de studie. Om een infectie vast te stellen, wordt patiëntenmateriaal getest dat maximaal 5 dagen voor de toediening van het ggo is afgenomen.

Om meer kennis te vergaren over persistentie en uitscheiding (shedding) van Ad5-Delta24-RGD wordt tijdens de studie bloed, urine, hersenvocht, speeksel en keelslijm afgenomen. De eerste monsters zullen een dag voor de ggo-toediening afgenomen worden. Vervolgens worden op dag 1 (dag van de toediening), dag 3 en 5 en na 1 en 2 weken monsters afgenomen. Tenslotte wordt na 1 maand en na 3 maanden nogmaals bloed afgenomen. De monsters worden overigens slechts voor wetenschappelijke doeleinden gebruikt en de resultaten zullen niet leiden tot een aanpassing van de behandeling of van de veiligheidsmaatregelen. De monsternamen en het transport van de monsters zal plaatsvinden volgens richtlijnen die door de aanvragers zijn opgesteld. De kans op verspreiding van het ggo in het milieu wordt geminimaliseerd door bijvoorbeeld een waterdichte, breukvaste, dubbelwandige container te gebruiken, welke voor transport aan de buitenzijde gedesinfecteerd wordt.

De virale vector wordt geproduceerd in de Verenigde Staten. De productie van de vector is geen onderdeel van de onderhavige adviesvraag, maar de productie van de virusbatch wordt wel door de COGEM in de overwegingen betrokken.

### **3. Eerder COGEM advies**

In 2006 heeft de COGEM geadviseerd over handelingen met muizen en ratten die geïnjecteerd waren met replicatiedeficiënte of met conditioneel-replicerende adenovirussen. Het doel van de aanvraag was het onderzoeken van de effectiviteit van op adenovirus gebaseerde kankertherapieën bij proefdieren. De aanvrager verzocht om voorgenomen bioluminescentie-experimenten uit te voeren op inperkingsniveau DM-II.<sup>7</sup>

De COGEM was van mening dat risico's bij werkzaamheden met dergelijke vectoren betrekking hebben op de eventuele verspreiding van vrije vectordeeltjes en de eventuele aanwezigheid van replicatie competent adenovirus (RCA). Zij adviseerde laboratoriummedewerkers om ten tijde van het experiment (op DM-II niveau) een mondkapje (N-95 of hogere specificatie) en een standaard laboratoriumbril te dragen om (oog)infecties ten gevolge van eventuele spatincidenten te voorkomen.<sup>7</sup> Dit was een aanvulling op de gebruikelijke voorschriften zoals het dragen van beschermende kleding.<sup>8</sup>

### **4. Overweging**

In de onderhavige aanvraag wordt een conditioneel-replicerende adenovirale vector toegediend aan patiënten met een hersentumor. 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.

#### **4.1 Pathogeniteit van Ad5-Delta24-RGD is lager dan van het oudervirus**

Door het toegevoegde RGD-motief is het ggo in staat om effectief te binden aan de integrines  $\alpha_v\beta_3$  en  $\alpha_v\beta_5$ . Onder meer geactiveerde endotheelcellen, fibroblasten en epitheelcellen brengen deze integrines op hun celmembraan tot expressie. Deze cellen zijn te vinden in onder meer de luchtwegen, ogen en de darmen.<sup>9,10,11,12,13</sup> Daarnaast kan het ggo ook de natuurlijke receptoren van hAd5 binden. De COGEM is daarom van mening dat het gastheerbereik van het ggo (dat wil zeggen het aantal celtypes dat gevoelig is voor het binnendringen van het ggo) is uitgebreid ten opzicht van wildtype adenovirus. Dit zou een verhoging van het infectierisico kunnen betekenen.

Daarentegen is het aantal celtypes waarin het ggo zich daadwerkelijk kan repliceren verlaagd, omdat het ggo 24 basenparen van het *E1A* gen mist. Het ggo kan daardoor alleen efficiënt repliceren in cellen met een defectieve Rb-pathway. Dit is een kenmerk van tumorcellen en niet van rustende 'gezonde' cellen. De COGEM merkt op dat in de wetenschappelijke literatuur geen aanwijzingen zijn dat gezonde cellen beschikken over een defectieve Rb-pathway. *In-vitro* onderzoek toont aan dat hAd5 met een deletie van 24 basenparen in het *E1A* gen (hAd5-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.<sup>14</sup> In een andere *in-vitro* studie kon geen replicatie van hAd5-Delta24 in rustende longfibroblasten aangetoond worden.<sup>15</sup>

Naast rustende cellen komen in het lichaam ook gezonde, delende cellen voor, zoals darmcellen. Uit onderzoek blijkt dat hAd5-Delta24 in enige mate kan repliceren in delende longepitheelcellen en microvasculaire endotheelcellen. Replicatie is echter vele malen lager dan in kankercellen (circa 100 maal).<sup>14</sup> 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 virusreplicatie niet meer plaatsvinden.

Overigens wordt replicatie van hAd5-Delta24 in stamcellen niet waarschijnlijk geacht vanwege het specifieke fysiologische replicatiekarakter van deze cellen.<sup>14</sup>

Gezien het bovenstaande is de COGEM van mening dat het ggo in staat is om celtypes te transduceren die normaliter niet door hAd5 geïnfecteerd kunnen worden. Daarentegen is de kans dat het virus zich in gezonde cellen kan vermenigvuldigen klein vanwege de deletie van 24 basenparen. Daarom is de COGEM van mening dat het virus geattenuëerd is ten opzichte van het oudervirus.

#### **4.2 Het ggo zal door het immuunsysteem geneutraliseerd worden**

##### **4.2.1 Immuniteit tegen hAd5 onder de bevolking**

Nagenoeg de gehele bevolking is ooit (over het algemeen al tijdens hun jeugd) geïnfecteerd geraakt met een adenovirus.<sup>16</sup> Deze virusinfectie is effectief opgeruimd door het immuunsysteem. 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 hAd5 gedetecteerd; in Nederland is dit percentage nog iets hoger.<sup>17,18,19,20</sup> 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 cel respons 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.<sup>31</sup> Dit houdt in dat de afweer voldoende is om heftige virusrepletie (en bijkomende symptomen) te voorkomen.

#### 4.2.2 Immunitet tegen hAd5 onder de patiënten

Met het oog op de algemeen aanwezige immunitet onder de populatie is de COGEM van mening dat de patiënten die deelnemen aan de onderhavige klinische studie immunitet zullen bezitten tegen hAd5. Hierdoor zal na toediening van het ggo aan hen het immuunsysteem direct op gang komen en het ggo 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.<sup>21,22</sup> 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.<sup>20,23,24</sup> Deze opname door Kupffercellen is een van de grote belemmeringen voor het ontwikkelen van een systemische gentherapiebehandeling met adenovirale vectoren.<sup>20,21</sup>

De COGEM is van mening dat de duur van eventuele shedding van het ggo beperkt zal worden door het aanwezige immuunsysteem.

De COGEM merkt op dat de patiënten in de onderhavige studie dexamethason toegediend krijgen. Dit gebeurt voor, tijdens en na de toediening van het ggo. Dexamethason heeft een remmend effect op het immuunsysteem.<sup>25</sup> Er bestaat een verhoogde gevoeligheid voor infecties waarbij klinische verschijnselen van infectie en ontsteking gemaskeerd worden.<sup>24,26</sup>

De toepassing van dexamethason kan verschillende gevolgen hebben. Enerzijds bestaat de mogelijkheid dat het ggo minder snel verwijderd wordt, waardoor shedding eventueel zou kunnen toenemen. Daarnaast bestaat er een kans dat de patiënt geïnfecteerd raakt met een wildtype virus zonder dat deze infectie effectief door het immuunsysteem bestreden wordt. Hierdoor wordt de kans op recombinaties tussen ggo en wildtype virus in theorie verhoogd.

Anderzijds blijkt uit *in vitro* studies dat dexamethason de expressie van de coxsackie-adenovirus (CAR) receptor - welke noodzakelijk is voor hAd5 om cellen binnen te dringen - en integrines op cellen beïnvloedt. Dit verandert de transductie-efficiëntie. Het effect van dexametason verschilt per celtype en receptortype. Soms leidt het tot een verlaging van het aantal integrines, maar soms ook tot een verhoging.<sup>29,33</sup> Een eventuele afname van het aantal integrines op de tumorcellen beïnvloedt de efficiëntie van de behandeling aangezien er minder receptoren zijn voor het ggo om aan te binden. Ook de transductie-efficiëntie van gewone cellen kan verlaagd worden. Daarentegen kan een verhoging van de expressie van integrines op bepaalde cellen leiden tot een verbeterde transductie-efficiëntie van het ggo. Verder is gerapporteerd dat de replicatie van hAd5 en daarvan afgeleide recombinanten in baarmoederhalskankercellen en de cytolyse (oncolyse) door dexamethason negatief beïnvloed wordt in *in vitro* studies.<sup>29</sup> Gesuggereerd is dat dit niet door een verlaagde transductie-efficiëntie veroorzaakt wordt.<sup>29</sup>

De beschikbare gegevens zijn afkomstig uit *in vitro* experimenten. Er zijn geen gegevens gepubliceerd over de toename van virale infecties bij gebruik van dexamethason na chirurgische verwijdering van een hersentumor. Bij navraag onder klinische virologen van het Martine Ziekenhuis en het Universitair Medisch Centrum Groningen blijkt dat patiënten met een glioblastoma multiforme die dexamethason toegediend krijgen, niet worden geassocieerd met een toename in virale infecties.

Gezien de beschikbare en soms tegenstrijdige gegevens over de effecten van dexamethason op infectie van adenovirussen of daarvan afgeleide vectoren, kan op dit moment geen uitspraak gedaan worden of toediening van dit corticosteroid leidt tot een verhoogd of verlaagd risico.

### **4.3 Sheddingrisico's**

Of risico's voor mens en milieu kunnen optreden wanneer het ggo zich vanuit de patiënt verspreidt in het milieu is afhankelijk van een aantal factoren, welke hieronder uiteengezet zijn.

#### **4.3.1 Kans op shedding**

Alvorens shedding zou kunnen optreden, dient het ggo allereerst de bloed-hersenbarrière te passeren. In studies waarbij replicatiedeficiënte adenovirale vectoren via de hersenen werden toegediend aan patiënten met glioblastoma multiforme, werd geen virus aangetoond in bloed, urine, feces, sputum of neusswabs.<sup>27</sup> Hieruit kan geconcludeerd worden dat het virus de bloed-hersenbarrière niet eenvoudig kan passeren.

De COGEM wijst er echter op dat patiënten met glioblastoma multiforme vaak beschadigingen van de bloed-hersenbarrière hebben. Een eerste oorzaak hiervoor is de aanwezigheid van de tumor. Een tweede oorzaak is dat tijdens het verwijderen van de tumor de bloed-hersenbarrière beschadigd raakt. Dit betekent dat de barrière niet meer effectief is. De COGEM is daarom van mening dat verspreiding van het virus naar andere delen van het lichaam kan optreden.

Als de bloed-hersenbarrière gepasseerd is, zou het ggo zich via de bloedbaan kunnen verspreiden naar andere delen van het lichaam. Dat adenovirale vectoren, maar ook hAd5, zich kunnen verspreiden door het lichaam blijkt uit verschillende onderzoeken, zowel bij de mens als bij proefdieren.<sup>30,28,29</sup>

Studies in muizen tonen aan dat wanneer een adenovirale vectoren met het oorspronkelijke gastheerberik intraveneus toegediend wordt, dit met name leidt tot transductie van levercellen.<sup>22</sup> Negentig minuten na toediening van de vector is de vectorconcentratie in de lever ongeveer 10x hoger dan in de longen.<sup>22</sup> De aanwezigheid van vector in de lever wordt met name toegeschreven aan de opname door Kupffer cellen. Na drie dagen blijkt de hoeveelheid vector in de lever nog steeds vele malen (circa 10.000x) hoger te zijn dan in de longen.<sup>22</sup> De infectie van verschillende levercellen kan leiden tot een ontstekingsreactie met celdood tot gevolg.<sup>22</sup>

Overigens wordt opgemerkt dat uitzaaiingen buiten de hersenen bij glioblastoma multiforme slechts in 0,44%<sup>30</sup> van de gevallen voorkomen, waardoor de kans op replicatie in tumorcellen buiten de hersenen zeer klein is.<sup>31</sup> Dit alles betekent dat het ggo buiten tumorcellen slechts zeer beperkte replicatiemogelijkheden heeft.

Wanneer het ggo zich verspreidt heeft in het lichaam, dan is shedding naar andere personen niet volledig uit te sluiten. Uit studies met zowel replicatiedeficiënte adenovirale vectoren als met conditioneel-replicerende adenovirale vectoren blijkt dat shedding zou kunnen optreden.<sup>28</sup>

Indien shedding optreedt, dan gebeurt dit waarschijnlijk kort na de toediening van het ggo aan de patiënt. Het immuunsysteem moet dan nog op gang komen voordat het ggo vernietigd kan worden. Een tweede periode van shedding zou kunnen optreden nadat het ggo zich vermeerderd heeft in de tumorcellen. Deze keer is de mate van shedding hoogstwaarschijnlijk lager dan de shedding ten gevolge van de toedieningsdosis. Het immuunsysteem is namelijk al op gang gekomen om het ggo te vernietigen.



De grootste mate van shedding kan optreden via urine en andere lichaamsvloeistoffen. Hoewel het replicatievermogen van het ggo in sneldelende darmcellen beperkt lijkt te zijn, zou het ggo mogelijk ook via feces kunnen worden uitgescheiden wanneer replicatie daadwerkelijk plaatsvindt. Zodoende zou feces ook een mogelijke bron van shedding kunnen vormen. De COGEM verwacht echter dat de kans zeer klein is dat derden besmet raken met de vector via deze wijze van uitscheiding. Zij ziet transmissie via aerosolen als de belangrijke bron voor eventuele adenovirusinfecties en verdere verspreiding in het milieu. In welke mate shedding via aerosolen kan optreden is onduidelijk. De COGEM verwacht echter dat shedding beperkt zal zijn, aangezien longcellen beschikken over een functionele Rb-pathway. Het ggo zal daarom in de longen niet kunnen repliceren.

#### *4.3.2 Gevolgen van shedding*

Gezien de aard van adenovirussen, zal verspreiding via aerosolen, zoals bij niezen, naar de mening van de COGEM het grootste gevaar van besmetting van andere personen zijn. Echter, de COGEM verwacht dat de daaropvolgende kans op infecties door het gehanteerde ggo klein is, omdat – zoals al eerder vermeld is - het virus slechts in zeer weinig cellen kan repliceren.

Verderop in dit advies zal worden ingegaan op de door de aanvragers gehanteerde aanvullende maatregelen tijdens de ggo-toediening om verspreiding van het ggo en infectie van derden te minimaliseren.

#### **4.4 Risico's ten gevolge van recombinatie van het ggo met hAd5**

Indien een patiënt een infectie heeft met hAd5, dan zou dit virus eventueel kunnen recombineren met het ggo. De mogelijkheid tot recombinatie beperkt zich niet alleen tot de patiënt. Recombinatie zou ook mogelijk kunnen zijn wanneer een patiënt het ggo heeft uitgescheiden en andere personen besmet die een infectie met hAd5 hebben.

Voorwaarde voor recombinatie is dat het ggo en het hAd5 zich in dezelfde cel bevinden (co-infectie). Infecties met hAd5 beperken zich tot de luchtwegen. Daarbij komt dat hAd5 slechts een beperkt aantal cellen infecteert. De CAR-receptor bevindt zich aan de basolaterale membraankant van de cellen.<sup>27</sup> Hierdoor zijn de cellen niet eenvoudig door hAd5 te bereiken en zal een adenovirusinfectie alleen optreden wanneer het weefsel beschadigd is.

Samengevat worden er slechts weinig longcellen geïnfecteerd door hAd5. Bovendien acht de COGEM de kans op co-infectie klein, omdat de kans dat het ggo de longcellen bereikt zeer klein is. Op basis van het bovenstaande is de COGEM van mening dat de kans op recombinatie zeer klein is.

Uit onderzoek blijkt dat onder *in-vitro* omstandigheden recombinatie tussen verschillende type adenovirussen niet is uit te sluiten.<sup>32</sup> Overigens zijn er *in-vivo* studies uitgevoerd met replicatiedeficiënte adenovirale vectoren. Hierbij is gekeken of een eventuele recombinatie van de vector met hAd5 tot een replicatiecompetent adenovirus heeft geleid. Bij geen van de studies werd replicatiecompetent adenovirus gedetecteerd.<sup>28</sup>

Ten slotte zou recombinatie kunnen optreden als de vectorbatch tijdens de productie besmet is geraakt met hAd5. Vanwege de gehanteerde productiemethode (reversie van het ggo naar het uitgangsgenoom zal op de gebruikte cellen niet optreden) en de aanvullende testen (er wordt getest op afwezigheid van onder andere hAd5 via Q-PCR), acht de COGEM de kans op een besmetting van de vectorbatch verwaarloosbaar klein.

Indien in het theoretische geval recombinatie tussen het ggo en hAd5 optreedt, zou dit kunnen leiden tot het ontstaan van twee nieuwe varianten, namelijk wildtype adenovirus met een deletie in het E1 gen (Ad5-Delta24) en wildtype adenovirus met een insertie voor het RGD-motief (Ad5-RGD).

#### *4.4.1 Risico's van Ad5-Delta24 zijn verwaarloosbaar klein*

De eerste potentiële recombinant Ad5-Delta24 is een deletiemutant van het wildtype hAd5, zonder nieuwe eigenschappen. Deze deletiemutant is niet meer in staat om te repliceren in cellen met een functionele Rb-pathway, zoals aanwezig in 'gezonde' cellen. De COGEM is van mening dat potentiële risico's van Ad5-Delta24 verwaarloosbaar klein zijn, omdat deze recombinant sterk verzwakt is ten opzichte van hAd5.

#### *4.4.2 Ad5-RGD leidt mogelijk tot risico's*

De tweede potentiële recombinant Ad5-RGD bestaat uit het wildtype adenovirus met een uitgebreid gastheerbereik. Deze variant zou daarom in staat kunnen zijn om vele celtypes te infecteren, zowel gezonde cellen als tumorcellen.

Naar de mening van de COGEM betreft het ontstaan van deze recombinant een 'worst-case' scenario. Zij merkt op dat er geen wetenschappelijke gegevens zijn over de kans op het daadwerkelijke ontstaan van de recombinant Ad5-RGD en over eventuele risico's ervan. Daarnaast vermeldt zij dat onderzoek hiernaar in proefdiermodellen met adenovirussen slechts een beperkte voorspellende waarde heeft. Proefdierenmodellen die in meer of mindere mate geschikt zijn voor studies naar adenovirussen (katoenratten, muizen en rhesusapen) vertonen allemaal belangrijke beperkingen wat betreft de gevoeligheid voor hAd5. Bovendien zijn er nog geen klinische studies met Ad5-Delta24-RGD afgerond. Momenteel loopt in de Verenigde Staten een klinische studie met dit ggo bij patiënten met eierstokkanker.<sup>33</sup> Resultaten over eventuele shedding van het ggo zijn (nog) niet bekend. Uit directe communicatie met de onderzoekers in de Verenigde Staten blijkt dat het ontstaan van Ad5-RGD in de Verenigde Staten geen rol gespeeld heeft bij de discussies rondom de vergunningverlening voor de klinische studie.

De COGEM is van mening dat deze variant hoogstwaarschijnlijk niet minder pathogeen is dan het wildtype adenovirus. Of risico's van een infectie met de recombinant groter zijn dan bij een infectie met hAd5 is niet te voorspellen. Bovendien is het niet te voorspellen of infecties zullen optreden in gezonde en/of mensen met een verminderde weerstand (zoals zuigelingen).

### **4.5 Risicomanagementmaatregelen**

Op een aantal momenten tijdens en na de toediening van het ggo bestaat er een risico op vrijkomen van het ggo in het milieu. Ten eerste is dit bij het aansluiten van de spuit met het ggo op de katheters. Ook de toediening van het ggo zou tot risico's kunnen leiden als een spuit losraakt van een katheter. Verder vormen de hoofdwonden een risico als wondvocht of hersenvocht vrijkomt. Ten slotte vormt shedding van het ggo of de recombinanten een risico.

Om vrijkomen van het ggo en eventuele recombinanten in het milieu tijdens en na de toediening van het ggo te voorkomen, hebben de aanvragers een gentherapieprotocol opgesteld met voorzorgsmaatregelen. Hieronder wordt nader ingegaan op verschillende voorzorgsmaatregelgelen.

#### *4.5.1 Deelname klinische studie*

De aanvragers stellen voor om patiënten met koorts uit te sluiten van deelname in verband met een mogelijke virale infectie. Om de kans op een infectie met een wildtype adenovirus te verkleinen,

geven de aanvragers ten eerste aan de patiënt te beoordelen op een klinisch ziektebeeld van een virale infectie. Ten tweede stellen de aanvragers voor om patiënten maximaal vijf dagen voor aanvang van de ggo-toediening te testen.

De COGEM is van mening dat deze laatste periode te lang is. In de periode tussen de test en aanvang van de ggo-toediening zou de patiënt namelijk alsnog een adenovirusinfectie kunnen krijgen. De COGEM adviseert daarom om de periode van vijf dagen te verkorten. Zij adviseert om deze termijn dusdanig kort te maken als technisch haalbaar is. Daarbij wijst de COGEM erop dat hAd5 in de bloedbaan moeilijk te detecteren is, waardoor een eventuele infectie mogelijk niet opgemerkt wordt. Dit maakt dat de COGEM het optreden van een infectie van de patiënt niet met zekerheid kan uitsluiten. De COGEM acht de klinische beoordeling door een arts en het uitvoeren van de test van belang om het mogelijke ontstaan van recombinanten zo veel mogelijk te beperken.

De COGEM adviseert verder dat personen met een sterk verzwakt immuunsysteem niet mogen deelnemen aan de studie. Het immuunsysteem van deze personen is waarschijnlijk niet in staat om het ggo voldoende snel te vernietigen, waardoor shedding in grotere mate zou kunnen optreden.

#### *4.5.2 Monitoring op shedding*

Excreta en secreta van de patiënt worden op een aantal momenten voor en na de toediening van het ggo getest om enerzijds de persistentie van het ggo in het lichaam en anderzijds de mate van shedding te bepalen. De aanvragers testen de aanwezigheid van het ggo niet in feces. De COGEM is van mening dat dit meegenomen dient te worden. Zodoende wordt meer duidelijkheid verkregen of en in welke mate het ggo in sneldelende darmweefsel zou kunnen repliceren.

Verder adviseert de COGEM om de eerste week dagelijks te testen op shedding van het ggo totdat dit minimaal drie opeenvolgende dagen niet meer wordt gedetecteerd. Hierna kan worden overgegaan op het monitoringsschema dat de aanvragers voorstellen. Wordt shedding na een week toch nog gedetecteerd dan dient doorgesmaakt te worden met dagelijks testen totdat shedding minimaal drie opeenvolgende dagen niet wordt waargenomen.

Zolang de patiënt adenovirale sequenties uitscheidt, dienen voorzorgsmaatregelen genomen te worden om werknemers en bezoekers te beschermen. In de onderstaande paragrafen wordt hierop teruggekomen

#### *4.5.3 Voorzorgsmaatregelen in de isolatiekamer*

Ziekenhuismedewerkers en bezoekers dienen in de isolatiekamer beschermende kleding te dragen, bijvoorbeeld mondmaskers, bril, handschoenen, muts en een vochtdichte jas. Wanneer de patiënt de isolatiekamer moet verlaten vanwege bijvoorbeeld een CT-scan of een noodoperatie, dan worden tijdens transport door het ziekenhuis dezelfde maatregelen gehanteerd als in de isolatiekamer. Hierbij draagt de patiënt onder meer een mondmasker en schone kleding. Daarnaast dienen in deze situatie ook de ziekenhuismedewerkers zichzelf volledig te beschermen op dezelfde wijze als voorgeschreven is in de isolatiekamer. De COGEM is van mening dat met het hanteren van de voorzorgsmaatregelen de kans op een eventuele verspreiding van het ggo of de recombinanten vanuit de patiënt naar derden in de isolatiekamer verwaarloosbaar klein wordt.

#### *4.5.4 Voorzorgsmaatregelen buiten de isolatiekamer*

Hoewel de voorzorgsmaatregelen in de isolatiekamer adequaat zijn, acht de COGEM aanvullende maatregelen bij verblijf van de patiënt buiten de isolatiekamer noodzakelijk. Deze maatregelen dienen gehandhaafd te worden totdat shedding gedurende minimaal drie dagen niet meer gedetecteerd wordt.

De COGEM adviseert verschillende maatregelen. Ten eerste dient persoonlijk contact met de patiënt zo veel mogelijk beperkt te worden. Zodoende wordt eventuele overdracht van het ggo verder verkleind. Daarnaast dient ook contact met personen met een infectie met wildtype adenovirus zo veel mogelijk geminimaliseerd te worden. Concreet betekent dit dat de COGEM verblijf in een éénpersoonskamer wenselijk acht. Bovendien dienen werknemers en bezoekers mondkapjes, handschoenen en een gesloten jas te dragen totdat is aangetoond dat shedding van het ggo minimaal drie dagen niet gedetecteerd is. Deze jas zal bij verlaten van de verpleegkamer achterblijven. Ten slotte adviseert de COGEM dat beddengoed afzonderlijk ingezameld en gesteriliseerd moet worden in verband met eventueel verlies van wondvocht, urine, feces of speeksel. De jas dient samen met het beddengoed te worden afgevoerd en gesteriliseerd.

De COGEM is van mening dat wanneer de patiënt kort na de ggo-toediening het experiment wil beëindigen en het ziekenhuis wil verlaten, de patiënt zorg moet dragen dat de kans op verspreiding van het ggo geminimaliseerd wordt. Overigens informeren de aanvragers de patiënten uitvoerig over hygiënemaatregelen. De COGEM stelt hierbij voor om met wondvocht besmet materiaal in plastic te verpakken en ter vernietiging af te voeren.

## **5 Advies**

Zoals hierboven beschreven, is het worst-case scenario bij het voorgenomen klinische experiment het ontstaan van een Ad5-RGD recombinant. In deze recombinant zou de deletie in de E-regio hersteld zijn en het RGD-motief behouden. De kans dat een dergelijke recombinant ontstaat, is minimaal en mogelijk zelfs verwaarloosbaar klein. Echter, de vorming van deze recombinant kan niet met zekerheid uitgesloten worden.

Verder is de pathogeniteit van Ad5-RGD moeilijk te voorspellen en zijn hierover geen gegevens beschikbaar. Enerzijds is hier sprake van een genetisch gemodificeerd virus waarbij een transgene sequentie in het genoom is ingebouwd. Tot op heden heeft genetische modificatie van virussen – voor zover bekend – altijd geleid tot een verzwakt virus. Daarbij zijn adenovirale infecties zelflimiterend en bezit de gehele bevolking immuniteit tegen adenovirale infecties. Anderzijds is door het inbouwen van het RGD-motief het gastceltropisme uitgebreid. Terwijl wildtype hAd5 alleen longepitheelcellen infecteert, zou de theoretische recombinant mogelijk alle celtypen kunnen infecteren. Gegevens over de eigenschappen van een dergelijke recombinant ontbreken en zijn ook niet eenvoudig te verkrijgen. Eventuele experimenten met een geconstrueerde recombinant in proefdiermodellen zijn weinigzeggend, omdat hAd5 een humane pathogeen is.

Door het nemen van maatregelen is het risico op het optreden van recombinatie verder terug te dringen. Zo vindt controle op adenovirale infecties van de betrokken patiënten plaats. Daarnaast dragen verzorgers en bezoekers in de isolatiekamer beschermende kleding. Verder kunnen door monitoring op shedding van virale sequenties de risico's verder verkleind worden. Zolang de patiënt adenovirale sequenties uitscheidt, moeten maatregelen genomen worden om verzorgers en familieleden te beschermen. Indien de patiënt geen adenovirale sequenties blijkt uit te scheiden, zijn de zorgen over eventuele recombinatie onterecht. De COGEM adviseert daarom om de monitoring de eerste week na toediening van het ggo dagelijks uit te voeren en om ook feces te onderzoeken. Wanneer de patiënten de isolatiekamer verlaten dienen risico's verder teruggedrongen te worden door de patiënt te verplegen op een éénpersoonskamer en doordat verzorgers en bezoekers mondkapjes

dragen. Beddengoed dient afzonderlijke ingezameld te worden. Wanneer shedding gedurende minimaal drie dagen niet gedetecteerd wordt, kunnen deze voorzorgsmaatregelen komen te vervallen.

Verder adviseert de COGEM om het testen van de patiënten op een infectie met hAd5 zo kort mogelijk voor de ggo-toediening uit te voeren. Tevens adviseert zij om personen met een sterk verzwakt immuunsysteem uit te sluiten van deelname aan de studie.

Het opleggen van extra inperkende maatregelen en monitoringsmaatregelen is een beproefde manier om eventuele risico's verder terug te dringen. Inperkende maatregelen kunnen in een ziekenhuis uitgevoerd worden. Echter, een complicerende factor is dat patiënten niet verplicht kunnen worden om in het ziekenhuis te blijven. Patiënten kunnen zelf besluiten het ziekenhuis te verlaten, of er kunnen andere redenen zijn om de patiënt uit het ziekenhuis te ontslaan. Het opleggen en uitvoeren van inperkende en monitoringsmaatregelen in de thuissituatie is lastig uitvoerbaar. Toch adviseert de COGEM dat patiënten met wondvocht besmet materiaal in plastic verpakken en ter vernietiging afvoeren.

Dit alles maakt dat de COGEM niet kan stellen dat de risico's van het voorgenomen experiment verwaarloosbaar klein zijn. Naar de mening van de COGEM zijn onder de hierboven genoemde voorwaarden de risico's van deze klinische studie voldoende geminimaliseerd om een vergunning te rechtvaardigen.

#### *Signalering*

De COGEM signaleert dat de risicobeoordeling in dit geval tot een andere afweging leidt dan gebruikelijk waarbij maatregelen worden geformuleerd die het risico verwaarloosbaar klein maken. De COGEM is van mening dat alle praktisch mogelijke risicobeperkende maatregelen in beeld zijn gebracht. Een rechtvaardiging om een zeer klein risico, mogelijk verwaarloosbaar klein, te aanvaarden is erin gelegen dat het experiment van grote betekenis is voor het ontwikkelen van een behandeling tegen glioblastoma multiforme. Ook het verkrijgen van monitoringsgegevens over shedding is van groot belang voor de ontwikkeling van behandelingen. Immers, dit is de enige manier waarop inzicht verkregen kan worden in de eventuele risico's voor derden (verzorgers en familie) en op de kans op het optreden van recombinaties.

#### **Referenties**

- 1 McConnell M.J & Imperiale, M.J. (2004). Biology of adenovirus and its use as a vector for gene therapy. Hum. Gene Ther. 15:1022-1033
- 2 Knipe DM & Howley PM (2001). Fields virology, volume two, fourth edition. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia.
- 3 Van Regenmortel MHV (2000). Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. Academic Press, San Diego.
- 4 Vorburger SA & Hunt KK (2002). Adenoviral gene therapy. Oncologist 7: 46-59
- 5 Nichols WW et al. (2002). Propagation of adenoviral vectors: use of PER.C6 cells. In: Adenoviral vectors for gene therapy. Academic Press, San Diego, USA.
- 6 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(2): 1053-1061
- 7 COGEM (2006). Bioluminescentie-experimenten met knaagdieren geïnjecteerd met adenovirale

- vectoren. Advies CGM/060516-01
- 8 VROM (2004). Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen.
  - 9 Beer AJ & Schwaiger M (2008). Imaging of integrin  $\alpha\beta3$  expression. *Cancer Metas Rev* 27: 631-644
  - 10 Rayner SA et al. (1998). Distribution of integrins alpha v beta 5, alpha v beta 3 and alpha v in normal human
  - 11 Pechkovsky DV et al. (2008). Transforming growth factor  $\beta1$  induces  $\alpha\beta3$  integrin expression in human lung fibroblasts via a  $\beta$ -, c-*Src*, and p38 MAPK-dependent pathway. *J Biol Chem* 283(19): 12898-12908
  - 12 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
  - 13 Goldman MJ & Wilson JM (1995). Expression of  $\alpha\beta5$  integrin is necessary for efficient adenovirus-mediated gene transfer in the human airway. *J Virol* 69(10): 5951-5958
  - 14 Heise C et al. (2000). An adenovirus E1A mutant that demonstrates potent and selective systemic anti-tumoral efficacy. *Nature Med* 6(10): 1134-1139
  - 15 Fueyo J et al. (2000). A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effects in vivo. *Oncogene* 19:2-12
  - 16 Lenaerts L et al. (2008). Clinical features and treatment of adenovirus infections. *Rev Med Virol* 18: 357-374
  - 17 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
  - 18 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(2): 351-357
  - 19 Chirmule N et al. (1999). Immune respons to adenovirus and adeno-associated virus in humans. *Gene Ther* 6:1574-1583
  - 20 Goossens PH et al. (2001). The influence of synovial fluid on adenovirus-mediated gene transfer to the synovial tissue. *Arthr Reum* 44: 48-52
  - 21 Xu Z et al. (2008). Clearance of adenovirus by kupffer cells is mediated by scavenger receptors, natural antibodies and complement. *J Virol* 82(23):11705-11713
  - 22 Smith J et al. (2008). A quantitative assay for measuring clearance of adenovirus vectors by Kupffer cells. *J Virol Methods* 147: 54-60.
  - 23 Alemany R & Curiel DT (2001). CAR-binding ablation does not change biodistribution and toxicity of adenoviral vectors. *Gene Therapy* 8: 1347-1353
  - 24 Worgall S et al. (1997). Innate immune mechanisms dominate elimination of adenoviral vectors following in vivo administration. *H Gene Therapy* 8: 37-44
  - 25 Netdoctor. Dexamethason tablets. Internet: netdoctor.co.uk (20 april 2009)
  - 26 College voor Zorgverzekeringen. Farmacotherapeutisch kompas. Internet: fk.cvz.nl (21 april 2009)
  - 27 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
  - 28 Schenk-Braat EAM et al. (2006). Inventarisatie van shedding data en analyses: mogelijkheden voor standaardisering. COGEM onderzoeksrapport CGM 2006-04
  - 29 Page JG et al. (2007). Identifying the safety profile of a novel infectivity-enhanced conditionally

- replicative adenovirus, Ad5- $\Delta$ 24-RGD, in anticipation of a phase I trial for recurrent ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol* 196(4): 389.e1-389.e10
- 30 Robert MC & Wastie ML (2008). Glioblastoma multiforme: a rare manifestation of extensive liver and bone metastases. *Biomed Imag Intervent J* 4(1): e3 1-4
- 31 Brew BJ & Garrick R (1987). Gliomas presenting outside the central nervous system. *Clin Exp Neurol* 23: 111-117
- 32 Rainbow AJ & Castillo JE (1992). Homologous recombination of adenovirus DNA in mammalian cells: enhanced recombination following UV-irradiation of the virus. *Mutation Research, DNA repair* 274: 201-210
- 33 Clinical Trials; US National Institutes of Health. Safety Study of a Genetically Modified Adenovirus in Ovarian Cancer Patients (Ad5-Delta24RGD). Internet: [clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00562003](http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00562003) (15 april 2009)