

Aan de minister van
Infrastructuur en Waterstaat
drs. C. van Nieuwenhuizen-Wijbenga
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 17 oktober 2019
KENMERK CGM/191017-03
ONDERWERP Advies klinische studie met gg-adenovirale vector (rAd-IFN) bij patiënten met kwaadaardige pleurale mesotheliom

Geachte mevrouw Van Nieuwenhuizen,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IM-MV 19-009_000 getiteld: 'A Phase III, Open-Label, Randomized, Parallel Group Study to Evaluate the Efficacy and Safety of Intrapleural Administration of adenovirus-Delivered Interferon Alpha-2b (rAd-IFN) in Patients with Malignant Pleural Mesothelioma' van het Erasmus Medisch Centrum, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over een vergunningaanvraag voor een klinische studie bij patiënten met kwaadaardige pleurale mesotheliom (asbestkanker), een vorm van kanker die de vliezen van de borstkas en longen of luchtwegen aantast. In deze studie wordt een replicatie-deficiënte, genetisch gemodificeerde (gg-) adenovirale vector (rAd-IFN) intrapleuraal toegediend aan de patiënt. Deze vector bevat een expressiecassette die codeert voor humaan interferon alpha-2b (hIFN- α 2b) eiwit. Productie van hIFN- α 2b in de pleuraholte en tumor moet er voor zorgen dat de micro-omgeving van de tumor verandert, tumorcellen worden gedood en het immuunsysteem wordt gestimuleerd.

Het gg-virus mist enkele genen die nodig zijn voor de eigen replicatie en voor remming van het afweersysteem. Hierdoor is het niet in staat om zich te verspreiden in het milieu.

Tijdens de productie en na toediening in de patiënt kan mogelijk replicatie-competent adenovirus (RCA) gevormd worden als gevolg van recombinatie. De COGEM is van oordeel dat hieraan geen milieurisico's verbonden zijn, omdat het RCA sterk verzwakt is en zich niet kan verspreiden in het milieu.

Onder de door de aanvrager gestelde voorwaarde dat patiënten met een actieve infectie worden uitgesloten van deelname aan de studie, is de COGEM van oordeel dat de milieurisico's verbonden aan deze klinische studie met rAd-IFN 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. Dr. J. Westra, Hoofd Bureau ggo
 Mr. J.K.B.H. Kwisthout, Ministerie van IenW
 Dr. B.M. te Riet-Schulte, Loket Gentherapie
 Dr. C. de Heer, Centrale Commissie Mensgebonden Onderzoek
 Mr. N. Gušić, Ministerie van VWS

Met het oog op eventuele belangenverstrengeling is het COGEM lid prof. dr. C. M. F. Dirven niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.

Advies klinische studie met gg-adenovirale vector (rAd-IFN) bij patiënten met kwaadaardige pleurale mesothelioom

COGEM advies CGM/191017-03

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over een vergunningaanvraag (IM-MV 19-009) voor een klinische fase III studie bij patiënten met kwaadaardige pleurale mesothelioom (asbestkanker). Deze vorm van kanker tast de vliezen van de borstkas en longen of luchtwegen aan. In de studie wordt gebruik gemaakt van een replicatie-deficiënte, genetisch gemodificeerde (gg-)adenovirale vector (rAd-IFN) die een expressiecassette bevat coderend voor recombinant humaan interferon alpha-2b (hIFN- α 2b) eiwit. De vector zal intrapleuraal toegediend worden aan de patiënt. Naar verwachting zullen na toediening van rAd-IFN, gezonde mesotheelcellen (plaveiselepitheel) en maligne mesothelioomcellen door de vector getransduceerd worden. Dit moeten resulteren in hoge, stabiele en lokale productie van het therapeutische eiwit hIFN- α 2b in de pleuraholte en tumor, waardoor de micro-omgeving van de tumor verandert, tumorcellen worden gedood en het immuunsysteem wordt gestimuleerd. De afweerreactie tegen de adenovirale vector zal ook bijdragen aan de anti-tumor respons. Het doel van de studie is om de overlevingskans na toediening van rAd-IFN (al dan niet in combinatie met conventionele kankertherapeutica) te bepalen en het sheddingprofiel van rAd-IFN te bestuderen.

1.1 Adenovirus

Adenovirussen behoren tot de familie van de *Adenoviridae* en komen voor bij gewervelde dieren zoals mensen, apen, knaagdieren, runderen, slangen, varkens, vissen en vogels. De familie van de *Adenoviridae* omvat vijf genera (*Atadenovirus*, *Aviadenovirus*, *Ichtadenovirus*, *Mastadenovirus* en *Siadenovirus*) en 74 soorten.^{1,2} Regelmatig worden er nieuwe adenovirussen ontdekt. Het genus *Mastadenovirus* is het omvangrijkst en omvat 45 soorten.¹

Binnen adenovirussen worden op basis van hun nucleotidensequentie-overeenkomst, hemagglutinatieprofiel en gevoeligheid voor neutraliserende antisera diverse typen onderscheiden.³ Deze serotypen worden aan de hand van een nummer weergegeven. Binnen sommige soorten zijn serotypen met een verschillend gastheertropisme ondergebracht. Zo omvat *Human mastadenovirus C* humane adenovirussen (bijvoorbeeld humaan adenovirus type 2 en 5 (HAdV-2, HAdV-5)), een runderadenovirus (bovine adenovirus type 9 (BAdV-9)), en een apenadenovirus (simian adenovirus type 13 (SAdV-13)).^{1,4}

1.1.1 Structuur en genomische organisatie adenovirussen

Adenovirusdeeltjes bestaan uit een lineair dubbelstrengs DNA molecuul omgeven door een eiwitmantel.^{1,5} De eiwitmantel is opgebouwd uit hexonen, pentonbasen en diverse kleinere eiwitten.^{7,8} In de pentonbasen zijn zogenaamde 'fibers' verankerd. Deze fibers steken uit boven het mantelopervlak en binden aan een receptor op de gastheercel.³ De hexonen, pentonbasen en fibers bezitten antigene determinanten, en spelen een belangrijke rol bij de herkenning door het

immuunsysteem.⁷ Het hemagglutinatie- en neutralisatieprofiel van een adenovirus wordt hoofdzakelijk door deze manteleiwitten bepaald.

De grootte van het genoom van een adenovirus varieert per soort en omvat tussen de 26 en 49 kilobaseparen (kbp). Het genoom is onderverdeeld in een ‘packaging’ signaal ψ (psi), een zogenaamde ‘vroege’ (Early of E) en ‘late’ (Late of L) regio, en de ‘inverted terminal repeats’ (ITR’s).³

De ITR’s bevinden zich aan weerszijden van het genoom en functioneren als ‘origin of replication’. De E-regio komt kort na binnenkomst van het virus in de cel tot expressie en bestaat uit verschillende transcriptie-units die elk voor meerdere eiwitten coderen: E1A, E1B, E2A, E2B, E3 en E4.^{2,3,7,8} De E1A eiwitten zijn betrokken bij de inductie van de virusrepliatie en expressie van de overige E-genen, en bij het controleren van de celcyclus. De E1B eiwitten remmen de geprogrammeerde celdood (apoptose) van de geïnfecteerde cel. Daarnaast wordt aan het 3’ uiteinde van de E1 regio het ‘minor capsid’ eiwit pIX tot expressie gebracht. Dit eiwit maakt deel uit van de virusmantel, en fungeert als een activator van transcriptie en speelt een rol bij reorganisatie van eiwitten in de celkern.¹ De E2A en E2B eiwitten zijn noodzakelijk voor repliatie van het virale genoom: E2A codeert voor het enkelstrengs DNA bindende eiwit, en E2B voor het DNA-polymerase en het ‘precursor terminal protein’. De E3 eiwitten blokkeren de ontstekingsreactie tegen het virus, onder meer door de functie van ‘natural killer’ (NK-) cellen, cytotoxische T-lymfocyten en ‘tumor necrosis factor’ (TNF) tegen te werken. De E4 regio codeert voor eiwitten die betrokken zijn bij het controleren van de celcyclus en bij de expressie van de L-regio.^{2,3,7} De L-regio bevat genen die coderen voor structurele eiwitten die betrokken zijn bij de opbouw van het virusdeeltje.^{2,3} Het ‘packaging’ signaal ψ is betrokken bij het inpakken van het virale genoom in het virusdeeltje.² Repliatie en assemblage van het virus vinden plaats in de celkern van de gastheercel.^{4,7}

1.1.2 Pathogeniteitskenmerken adenovirussen

De humane adenovirussen HAdV-2 en HAdV-5 veroorzaken hoofdzakelijk infecties aan de bovenste luchtwegen en soms het maagdarmsstelsel en de urinewegen.⁶ Een infectie verloopt doorgaans subklinisch of met lichte symptomen, zonder noodzaak tot medische behandeling, en is meestal zelflimiterend. Bij patiënten met een sterk verzwakt afweersysteem kunnen ontstekingen aan de nieren en longen ontstaan met mogelijk fatale gevolgen.³ Na het doormaken van een infectie, kunnen adenovirussen in de vorm van inert DNA episomaal in de cel en latent in weefsels aanwezig blijven.^{7,8}

Besmetting met adenovirus vindt plaats via (in)direct contact, feces en urine, en ten gevolge van aerogene transmissie.^{3,9} Sommige adenovirusinfecties kunnen met behulp van antivirale middelen behandeld worden, maar in veel gevallen zijn deze middelen niet werkzaam.^{1,4,7,10}

1.1.3 Immunitet tegen HAdV-5 onder de bevolking

Nagenoeg de gehele bevolking is ooit (over het algemeen al tijdens hun jeugd) geïnfecteerd geweest met een adenovirus.¹¹ Hierdoor hebben bijna alle mensen antilichamen gericht tegen adenovirussen (humorale immunitet). Een deel van deze antilichamen neutraliseert het virus, maar ook niet neutraliserende antilichamen helpen bij het opruimen van het virus. In de Verenigde Staten is bij 33-66% van de bevolking neutraliserende antilichamen tegen HAdV-5 gedetecteerd; in Nederland is dit

percentage nog iets hoger.^{12,13} 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. Dit houdt in dat de afweer voldoende is om heftige virusreproductie (en bijkomende symptomen) te voorkomen.²¹

1.2 gg-AdV vector rAd-IFN

De virale vector rAd-IFN uit onderhavige aanvraag is een zogenaamde ‘eerste type’ AdV vector met een deletie in de E1 regio (Δ E1aE1b) (basenparen (bp) 360-4030). Hierdoor is de virale vector reproductie-deficiënt. Ook ontbreekt door de deletie in de E1 regio de sequentie coderend voor het eiwit pIX. Op de plek van de E1 regio is de expressiecassette met het transgen hIFN- α 2b opgenomen. In de virale vector zijn aanvullend 1875 basenparen van de E3 regio gedeleteerd (bp 28591-30466).

Het is een zogenaamde ‘hybride vector’ omdat de backbone van de vector is samengesteld uit verschillende serotypen adenovirussen (HAdV-5 en HAdV-2). Het vectorgenoom heeft een grootte van 31.879 bp. Op de plek van de E1 regio is een expressiecassette ingebracht (bp 360-1850). Aan de 5' kant wordt de expressiecassette geflankeerd door de ITR sequentie en het ‘packaging’ signaal van HAdV-5 (bp 1-359). Aan de 3' kant wordt de expressiecassette geflankeerd door HAdV-2 sequenties die het polyadenyleringssignaal bevatten en coderen voor het IVa2 eiwit en E2b polymerase (bp 1851-8290 van de vector). De rest van het vectorgenoom (bp 8291-31879) is afkomstig van HAdV-5.

De vector bevat een expressiecassette met het gen coderend voor humaan interferon alpha-2b (hIFN- α 2b). Het transgen staat onder controle van een ‘CMV immediate early promoter/enhancer’. Tussen de CMV promoter/enhancer en het transgen bevindt zich een ‘tripartite leader’ (TPL) sequentie afkomstig van HAdV-2 ten einde de translatie van IFN- α 2b te verhogen.¹⁴

1.3 Productie van rAd-IFN

Voor de productie en de vermeerdering van de reproductie-deficiënte virale vectordeeltjes uit onderhavige aanvraag wordt gebruik gemaakt van de productiecellijn HEK293.¹⁵ In deze productiecellijn zijn nucleotiden 1 tot 4344 van de E1 regio van HAdV-5 ingebracht, waardoor de productiecellijn de functie van de E1 regio kan complementeren. De functie van de E3 regio (blokkade van de ontstekingsreactie tegen het virus) hoeft niet door de productiecellijn te worden gecompenseerd, omdat de E3 genen niet voor eiwitten coderen die voor vectorproductie noodzakelijk zijn.^{2,4,7,8} De productie van rAd-IFN vindt elders plaats en valt niet onder deze vergunningaanvraag.

2. Eerdere COGEM adviezen

De COGEM heeft alle adenovirussen waarover zij tot op heden heeft geadviseerd, waaronder HAdV-5 en HAdV-2, ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.¹⁶

In 2006 heeft de COGEM geadviseerd over een klinische studie met niet-replicerende adenovirale vectoren die coderen voor het humaan interleukine-12. Deze adenovirale vectoren werden als adjuvant

toegediend aan patiënten met prostaatkanker.¹⁷ Aangezien het ggo rechtstreeks in de prostaat geïnjecteerd werd, achtte de COGEM het waarschijnlijk dat het ggo via excreta in het milieu terecht zou komen. Hoewel de COGEM van oordeel was dat het effect van een infectie van derden met dit ggo zeer klein zou zijn, was zij van oordeel dat de patiënten gebruik dienden te maken van op barrière berustende anticonceptie en dat de urine van de patiënten met chloortabletten geïnactiveerd moesten worden. Dit om de kans op verspreiding van het ggo via urine of sperma te minimaliseren.

In 2009 heeft de COGEM geadviseerd over een klinische studie met conditioneel-replicerende adenovirusvectoren.¹⁸ 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 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 ten opzichte van wildtype.

Om de risico's van deze klinische studie te beperken heeft de COGEM geadviseerd verschillende risicomanagementmaatregelen toe te passen. Deze maatregelen hadden 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 vanwege de mogelijkheid dat een patiënt het ziekenhuis voor beëindiging van het experiment zou kunnen verlaten, achtte de COGEM de risico's van de klinische studie aanvankelijk niet verwaarloosbaar klein.¹⁸

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 inperkingsmaatregelen 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 en adviseerde zij positief over de vergunningaanvraag.¹⁹ In een later stadium heeft de aanvrager nog verzocht de periode, die 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.²⁰

In 2012 heeft de COGEM geadviseerd over een klinische fase I studie met een conditioneel-replicerend adenovirale vector die werd toegediend aan patiënten met prostaatkanker.²¹ De vector was gebaseerd op wildtype HAdV-5 en kon alleen in de prostaat effectief repliceren. In de vector ontbraken het E1B en E3 domein waardoor de vector minder efficiënt kon repliceren en sneller door het afweersysteem geïnactiveerd werd. De vector bevatte geen eiwitcoderend transgen. De COGEM was van oordeel dat het ggo verzwakt was ten opzichte van het oudervirus. Er kon niet worden uitgesloten dat het ggo vanuit de patiënt in het milieu zou verspreiden en derden geïnfecteerd zouden raken. Aangezien het ggo niet buiten de prostaat kon repliceren en snel door het afweersysteem onschadelijk gemaakt zou worden achtte de COGEM de risico's die hieraan verbonden zijn

verwaarloosbaar klein. De COGEM achtte de kans op het ontstaan van een recombinant virus tijdens de productiefase of na toediening in de patiënt (vanwege de mogelijke aanwezigheid van een wildtype virus in de patiënt) aanwezig. Echter, in het uiterste geval zou een recombinatie leiden tot een virus met een normaal (wildtype) replicatieprofiel en pathogeniteit. Dergelijke virussen circuleren altijd in de samenleving. De COGEM was van oordeel dat de milieurisico's verbonden aan deze klinische studie met een conditioneel-replicerend humaan adenovirus verwaarloosbaar klein waren.²¹

3. Voorgenomen werkzaamheden

De klinische studie met rAd-IFN zal plaatsvinden in het Erasmus Medisch Centrum. In totaal zullen er maximaal 20 patiënten deelnemen, die willekeurig verdeeld zullen worden in twee groepen. De helft van de patiënten zal behandeld worden met rAd-IFN, de andere helft met celecoxib en gemcitabine. Patiënten ontvangen een eenmalige dosis van 3×10^{11} of maximaal 6×10^{12} 'viral particles' (vp). Het ggo zal via een intrapleurale katheter of een vergelijkbaar intrapleuraal apparaat worden toegediend in de pleurale holte.

Het ggo zal in een bioveiligheidskabinet klasse II worden voorbereid, hierbij wordt het ggo verdund en overgebracht in een injectiespuit. De injectiespuit wordt in een gesloten, lekvrije, breukvaste container naar de kamer van de patiënt vervoerd. Toediening van het ggo vindt plaats in een patiëntenkamer met beperkte toegang. De katheter mag na minimaal zes uur na toediening worden verwijderd. Het personeel draagt beschermende kleding en hanteert standaard geldende procedures en voorschriften.

Om kennis te vergaren over het sheddingprofiel van de virale vector worden patiënten die behandeld zijn met rAd-IFN gevraagd om deel te nemen aan een 'Viral Shedding Cohort'. Van deelnemende patiënten zal op verschillende momenten onder meer urine-, bloed- en sputummonsters worden afgenomen. Ook zullen er *in situ* monsters van de intrapleurale katheter en swab monsters van de pleurale toedieningsplaats worden verzameld. Bij de andere patiënten zullen urine- en bloedmonsters worden afgenomen.

Bij de selectie van patiënten voor de studie worden door de aanvrager de volgende inclusie- en exclusiecriteria gehanteerd:

- Patiënten met een ongecontroleerde bijkomende ziekte, zoals een actieve infectie worden uitgesloten van de studie;
- Vrouwelijke patiënten zijn gesteriliseerd of postmenopauzaal (minimaal 12 maanden na de laatste menstruatieperiode), of als zij zich in de vruchtbare leeftijd bevinden is een negatieve zwangerschapstest vereist en dienen zij als zij seksueel actief zijn effectieve contraceptie in acht te nemen;
- Mannelijke patiënten zijn gesteriliseerd, of als zij vruchtbaar zijn, dienen zij als zij seksueel actief zijn effectieve contraceptie in de vorm van een fysiek barrièremiddel in acht te nemen.

4. Overwegingen

In de onderhavige aanvraag wordt de replicatie-deficiënte vector rAd-IFN toegediend aan patiënten met kwaadaardige pleurale mesothelioom. Mogelijke 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 verspreiding zouden andere personen dan de deelnemende patiënten geïnfecteerd kunnen worden met het ggo of met een recombinant virus.

4.1 Eigenschappen van het ggo

4.1.1 Vector

In de onderhavige klinische studie wordt een hybride AdV vector gebruikt met HAdV-2 en HAdV-5 als basis. In de virale vector bevindt zich een deletie in de E1 regio. Hierdoor is rAd-IFN replicatie-deficiënt.⁴ Ook ontbreekt door de deletie in de E1 regio de coderende sequentie van het eiwit pIX. Op de plek van de E1 regio is de expressiecassette met het transgen hIFN- α 2b opgenomen. Verder bevat de vector een gedeeltelijke deletie in de E3 regio, dit draagt bij aan de attenuatie van rAd-IFN.⁴ De aangebrachte modificaties hebben geen effect op het tropisme en het gastheerbereik van het ggo.

Bovenstaand in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat de virale vector rAd-IFN geattenuerd en biologisch ingeperkt is, en daardoor niet in staat is zich in het milieu te verspreiden.

4.1.2 Transgen hIFN- α 2b

De vector bevat een expressiecassette dat codeert voor recombinant humaan interferon α -2b (hIFN- α 2b). Interferonen (IFNs) zijn induceerbare cytokines die worden geproduceerd door lichaamscellen in reactie op bepaalde virussen, bacteriën en antigenen. IFN- α en IFN- β behoren tot de type I IFNs, die ook wel bekend zijn als virale IFNs. Deze IFNs vormen de eerste verdedigingslinie van het immuunsysteem tegen een infectieus agens. Er zijn 13 humane IFN- α genen die worden onderverdeeld in verschillende sequentievarianten. Het hIFN α -2 gen kan worden onderscheiden in 3 subtypen (hIFN α -2a, hIFN α -2b en hIFN α -2c). Hiervan is het meest voorkomende allel hIFN α -2b. Met uitzondering van één aminozuur zijn de aminozuursequenties van hIFN α -2b en hIFN α -2a identiek.²²

Recombinant humaan IFN α -2b is sinds 1986 door de Amerikaanse 'Food and Drug Administration' (FDA) goedgekeurd als therapeutisch eiwit en wordt gebruikt voor de behandeling van hepatitis en kanker. Naast hIFN- α 2b (Intron A, Schering-Plough) is ook hIFN- α 2a (Roferon-A, Hoffman-La Roche) geregistreerd voor antitumor toepassingen.²³

IFN α heeft vele biologische activiteiten en werkt onder andere antiproliferatief, immunomodulerend en antiviraal.²³ IFN α kan op meerdere manieren de tumorcel functie inhiberen. IFN α remt de groei van kankercellen direct door 'cell cycle arrest', apoptose of differentiatie. Indirecte inhibitie van kankercellen door IFN α gebeurt door activatie van immuuncellen zoals T cellen en 'natural killer'(NK) cellen, inhibitie van vascularisatie en inductie van cytokines.²³

4.1.3 Eerdere klinische studies met rAd-IFN

Er zijn twee klinische studies afgerond met rAd-IFN bij patiënten met kwaadaardige pleurale mesothelioom.^{24,25,26,27}

De eerste studie was een fase I studie, waarbij patiënten een intrapleurale dosis van Ad.IFN- α 2b ontvingen op dag 1 en 4. De resultaten van 9 patiënten die deelnamen zijn gepubliceerd.²⁴ De eerste 3 patiënten ontvingen 1×10^{12} vp en kregen relatief ernstige langdurige koorts als gevolg van zeer hoge pleurale en systemische IFN- α concentraties. De hierop volgende 6 patiënten ontvingen een lagere dosering van 3×10^{11} vp. Ook deze patiënten hadden hoge hoeveelheden van IFN- α in serum en pleurale vloeistof, maar de symptomen waren milder. Intrapleurale toediening van Ad.IFN- α 2b werd in het algemeen goed getolereerd.^{24,25}

De andere afgeronde studie is een klinische fase I/II studie waaraan 40 patiënten deelnamen; ook hiervan zijn de resultaten gepubliceerd.²⁷ Op dag 1 en dag 4 ontvingen patiënten een intrapleurale dosis van Ad.hIFN- α 2b van 3×10^{11} vp. Gelijktijdig ondergingen de patiënten een 14-dagen durende behandeling met celecoxib gevolgd door chemotherapie. Bij de meeste patiënten werd milde toxiciteit waargenomen als gevolg van de vector en transgenexpressie. Gerapporteerde symptomen waren 'cytokine release syndrome', misselijkheid, moeheid, anemie, lymfopenie en hypoalbuminemie. 'Serious adverse events' (SAE's) die optraden waren onder andere pleurale katheterinfectie (n=2), hypoxia (n=2), 'supraventricular tachycardia' (hartritmestoornis) (n=1) en oesophagitis (slokdarmonsteking) (n=1). Deze SAE's waren niet direct toe te schrijven aan de toediening van de vector. De behandeling werd in het algemeen goed getolereerd.^{26,27}

Naast bovengenoemde studies zijn er ook drie klinische studies afgerond waarbij patiënten met blaaskanker (*non-muscle invasive bladder cancer* (NMIBC)) rAd-IFN intravesicaal kregen toegediend. Ook bij deze studies werd in het algemeen de behandeling goed getolereerd.^{28, 29,30,31,32}

Het bovenstaande in overweging nemende concludeert de COGEM dat het transgen IFN- α 2b geen verhogend effect heeft op de pathogeniteit en het verspreidingspotentieel van de vector.

4.2 Moleculaire karakterisering

De aanvrager heeft de 'Master Viral Seed Stock' (MVSS) en zeven verschillende vectorbatches gesequenced. De aanvrager geeft aan dat de sequentie van MVSS 100% identiek is aan de referentiesequenties in GenBank. In de vectorbatches werden 2 polymorfismen gevonden (positie 3844, A naar G met 10-11% frequentie en positie 3859 T naar G 10% frequentie) ten opzichte van de referentiesequenties. De aanvrager geeft aan dat de polymorfismen zich in de coderende sequentie van het E2B polymerase van HAdV-5 bevinden en resulteren in aminozuurveranderingen T780P en F782L. Met het oog op de genoemde polymorfismen in de vectorbatches is de COGEM van oordeel dat deze, gezien de positie van de nucleotideveranderingen, geen impact hebben op de eigenschappen van het ggo.

De aanvrager geeft verder aan dat de identiteit van het product bevestigd is met een PCR, waarbij de PCR primers op zodanige wijze zijn ontworpen dat het IFN- α 2b transgen specifiek geamplificeerd wordt. Ook is de identiteit van de vector bevestigd met restrictie-enzym analyse. Verder is de identiteit van de vector bevestigd met behulp van een SDS-PAGE. Hierbij is het moleculair gewicht van de virale eiwitten vergeleken met dat van HAdV-5.

De COGEM merkt op dat de informatie in het dossier met betrekking tot de beschrijving van de rAd-IFN vector en enkele beweringen over de gevonden veranderingen tijdens de sequentieanalyse van de oorspronkelijke vector beperkt onderbouwd worden in het dossier. Ondanks deze tekortkomingen is de COGEM is van oordeel dat de aanvrager de moleculaire karakterisering afdoende heeft uitgevoerd in het kader van deze studie.

4.3 Vorming van RCA tijdens de productie van de virale vector

De aanvrager is voornemens gebruik te maken van een zogenaamde ‘eerste type’ AdV productiesysteem (productie $\Delta E1$ -AdV of $\Delta E1\Delta E3$ -AdV vectoren). Voor de productie en vermeerdering van rAd-IFN maakt de aanvrager gebruik van een HEK293 cellijn. Deze cellijn bezit nucleotiden 1 tot 4344 van de E1 regio van HAdV-5.¹⁵

Op basis van de aangeleverde gegevens concludeert de COGEM dat er sequentiehomologie is tussen de virale vector rAd-IFN en de E1 regio in de HEK293 productiecellijn. Hierdoor kan er tijdens de productie replicatie-competent adenovirus (RCA) gevormd worden als gevolg van homologe recombinatie. Het ontstane RCA is samengesteld uit HAdV-5 (E1 gebied en bp ~10.000-36.000) en HAdV-2 (bp ~4.000-10.000) sequenties. De deletie in de E3 regio blijft aanwezig, verder ontbreekt de coderende sequentie van het eiwit pIX.

4.3.1 Sterke attenuatie van het RCA door E3 deletie

Het RCA dat kan ontstaan is weliswaar replicatie-competent, maar door de E3 deletie is het RCA sterk geattenuëerd en zal het *in vivo* niet tot een productieve infectie leiden, omdat de geïnfecteerde cellen door het immuunsysteem zullen worden opgeruimd. Voor zover bij de COGEM bekend zijn in de natuur ook nog nooit $\Delta E3$ adenovirussen aangetroffen. Dit onderbouwt de stelling dat het RCA door de deletie in de E3 regio zich niet in het milieu kan verspreiden.⁴

4.3.2 RCA assay

De aanvrager test bij de productie op aanwezigheid van RCA met een gevalideerde assay die gebaseerd is op een ‘roller bottle method’. De negatieve controle bestaat uit cellen die geïnoculeerd zijn met kweekmedium, de positieve controle uit cellen die geïnoculeerd zijn met wildtype HAdV-5 met een titer van 1 of 5 ‘plaque-forming units’ (pfu) per cultuur. De aanvrager geeft aan dat deze assay betrouwbaar 1 pfu per fles kan detecteren.

Als acceptatielimit hanteert de aanvrager dat er <10 RCA in 3×10^{10} vp (i.e. <10 van de 15 flessen positief) aanwezig mag zijn in de ‘bulk harvest’. Dit betekent dat er maximaal 100 pfu RCA bij een toegediende dosis van rAd-IFN van 3×10^{11} vp en maximaal 2000 pfu RCA bij een maximale toegediende dosis van 6×10^{12} vp aanwezig kan zijn in het medisch product.

De COGEM plaatst als kanttekening dat bij het valideren van de RCA test, het effect van aanwezigheid van IFN- $\alpha 2b$ niet is onderzocht. IFN α heeft antivirale activiteit.²³ Mogelijk heeft IFN- $\alpha 2b$ een remmende werking op het replicerend vermogen van de virale vector in de cellijn waarin de RCA assay wordt uitgevoerd. Hierdoor kan de COGEM niet uitsluiten dat de gevonden waarde een onderschatting is van de werkelijke RCA titer van de ‘bulk harvest’ van rAd-IFN.

Samenvattend concludeert de COGEM dat er RCA in het medisch product aanwezig kan zijn. De COGEM is van oordeel dat hieraan geen milieurisico's verbonden zijn, omdat het RCA sterk geattenuëerd is, niet tot een productieve infectie zal leiden *in vivo*, en zich daarom niet kan verspreiden in het milieu.

4.4 Complementatie en recombinatie van de vector in de patiënt

4.4.1 Complementatie door en recombinatie met wildtype humaan adenovirus

Na toediening van het ggo aan de patiënt kan in theorie eenzelfde cel gelijktijdig geïnfecteerd worden met rAd-IFN en wildtype humaan adenovirus.

In theorie zou als gevolg hiervan recombinatie tussen de E1 regio van rAd-IFN en het wildtype adenovirus kunnen optreden. Hierdoor zal het replicatie-deficiënte rAd-IFN het transgen verliezen en het E1 gen verkrijgen, terwijl het adenovirus het E1 gen verliest en het transgen verkrijgt. Daarmee is de uitkomst van de recombinatie een replicatie-deficiënte adenovirale vector met transgen in plaats van het E1 gen en geattenuëerd RCA zonder transgen.

Verder zou in theorie als gevolg van de co-infectie met wildtype adenovirus de ontbrekende functie van de E1 regio in de vector gecompenseerd kunnen worden, waardoor replicatie van de gg-rAd-IFN vector en daarmee verhoogde uitscheiding van rAd-IFN deeltjes door de patiënt kunnen plaatsvinden.

De COGEM acht het onwaarschijnlijk dat het ggo de pleurabarière kan passeren en de longcellen kan bereiken waardoor co-infectie van het ggo en het wildtype adenovirus zou kunnen plaatsvinden. De kans op co-infectie wordt verder verkleind omdat patiënten met een actieve infectie door de aanvrager worden uitgesloten van deelname aan de studie. Op basis van deze gegevens is de COGEM van oordeel dat de kans dat er in de patiënt co-infectie met wildtype adenovirus zal plaatsvinden verwaarloosbaar klein.

4.4.2 Complementatie door en recombinatie met RCA

In het medisch product kan naast het ggo ook sterk geattenuëerd RCA aanwezig zijn. De mogelijkheid bestaat hierom dat na toediening in de patiënt, eenzelfde cel gelijktijdig geïnfecteerd wordt met rAd-IFN en het RCA.

In theorie zou als gevolg hiervan recombinatie kunnen optreden tussen de E1 regio van rAd-IFN en het RCA. Hierbij zal het replicatie-deficiënte rAd-IFN het transgen verliezen en het E1 gen verkrijgen, terwijl het geattenuëerde RCA het E1 gen zal verliezen en het transgen zal verkrijgen. Daarmee is de uitkomst van de recombinatie hetzelfde als ervoor: een sterk geattenuëerd RCA zonder transgen en een replicatie-deficiënte adenovirale vector met transgen.

Verder is het in theorie mogelijk dat het RCA de ontbrekende functie van de E1 regio in de vector complementeert en dat door replicatie van het RCA de vector meegaat repliceren in de patiënt. Hierdoor kunnen verhoogde hoeveelheden vectordeeltjes en RCA deeltjes worden uitgescheiden door de patiënt. Wel zal de replicatie waarschijnlijk enigszins worden afgeremd worden doordat de vector IFN- α 2b (antivirale activiteit) produceert.

In het theoretische geval dat derden blootgesteld worden aan RCA en door RCA gecomplementeerde vector, is de COGEM van oordeel dat de milieurisico's die hieraan verbonden zijn verwaarloosbaar klein zijn, omdat rAd-IFN replicatie-deficiënt is, het RCA sterk geattenuëerd is, zich niet kan verspreiden in het milieu, en de immuniteit tegen wildtype HAdV-5 en HAdV-2 onder de bevolking groot is.

Signalering

De COGEM signaleert dat er mogelijk wel een risico is voor de patiënt indien er complementatie optreedt door een RCA in de patiënt. Door de replicatie van de rAd-IFN deeltjes wordt er meer IFN- α 2b eiwit geproduceerd in de patiënt dan beoogd, gezien de vele biologische activiteiten van dit eiwit kan niet uitgesloten worden dat dit nadelige effecten heeft voor de patiënt. Echter dit is niet van invloed op de milieurisicobeoordeling.

4.5 Shedding

In de eerder uitgevoerde klinische fase /II studies waar rAd-IFN intrapleuraal werd toegediend aan patiënten is shedding van het ggo niet onderzocht.^{24,25,26,27}

De aanvrager geeft aan te beschikken over data van niet-klinische en andere klinische studies waarin shedding van zeven AdV vectoren (waaronder rAd-IFN) is bestudeerd. Twee van deze vectoren hebben dezelfde backbone en promoter maar een ander gen insert dan rAd-IFN. Deze data laten volgens de aanvrager zien dat intraperitoneale of intrapleurale toediening van een AdV vector niet leidt tot verspreiding naar de keel-of neusholte, ontlasting of urine.

Verder beschrijft de aanvrager resultaten van een klinische fase I studie met een E1/E3-gedeleteerd replicatie-deficiënte AdV vector die IFN- β tot expressie bracht. De vector Ad.huIFN- β werd intrapleuraal toegediend aan 10 patiënten in een dosis variërend van 9×10^{11} tot 3×10^{12} vp.³³

Bij de patiënten zijn borstwand swabs, pleurale vloeistof en serum geanalyseerd op dag 0 (voorafgaand aan de behandeling) en na de toediening op dag 2, 3, 4, 7, 14, 21 en 28. Monsters werden gekweekt op 293 cellen (die adenovirale E1 eiwit tot expressie brengen) om replicatie-deficiënte vector te detecteren. Kweken van afgenomen pleurale vloeistofmonsters waren positief in 5 patiënten voor aanwezigheid van replicatie-deficiënte vector (tot op dag 7 voor 3 patiënten). Op dag 14 waren alle pleurale vloeistofmonsters negatief. Eén van de patiënten testte positief voor vector in serum (en alleen op dag 1).³³

De afgenomen monsters zijn ook geanalyseerd op vector-specifieke DNA sequenties door middel van PCR. Serummonsters van vier patiënten waren tot op dag 4 na behandeling positief. Pleurale vloeistofmonsters werden tot op dag 10 getest en waren bij alle patiënten positief. Op dag 28 was de PCR positief voor 6 van de 8 patiënten en in 3 van de 5 patiënten op dag 42 en in geen van de 4 patiënten op dag 56 (het was niet mogelijk om van alle patiënten gedurende de hele periode monsters af te nemen).³³

Alles in ogenschouw nemende is de COGEM van oordeel dat er, gezien rAd-IFN intrapleuraal toegediend zal worden, er kortdurend shedding van de virale vector en het RCA in de pleurale vloeistof kan plaatsvinden. De COGEM heeft geen reden om aan te nemen dat de virale vector en het RCA zich kunnen verspreiden naar andere delen in het lichaam waar shedding kan optreden.

5. Conclusie

De vector rAd-IFN is replicatie-deficiënt en geattenuëerd door de deleties in de E1 en E3 regio's. Tijdens de productie en na toediening in de patiënt kan RCA zonder transgen gevormd worden als gevolg van recombinatie. De COGEM is van oordeel dat hieraan geen milieurisico's verbonden zijn, omdat het RCA sterk geattenuëerd is en zich niet kan verspreiden in het milieu.

Met inachtneming dat patiënten met een actieve adenovirale infectie worden uitgesloten van deelname aan de studie, is de COGEM van oordeel dat de kans verwaarloosbaar klein is dat de vector in de patiënt door wildtype adenovirus gecomplementeerd kan worden.

Concluderend is de COGEM van oordeel dat onder de door de aanvrager gestelde voorwaarde dat patiënten met een actieve infectie worden uitgesloten van deelname aan de studie, de milieurisico's verbonden aan deze klinische studie met rAd-IFN verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. International Committee on Taxonomy of Viruses (2019). <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (bezoekt: 23 september 2019)
2. Berk AJ (2013). *Adenoviridae*. In: Fields virology, volume 2, sixth edition. Ed. Knipe DM *et al.*, Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia
3. Harrach B *et al.* (2012). Family *Adenoviridae*. In: Virus taxonomy, classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Ed. King AMQ *et al.*, Elsevier Academic Press, Amsterdam
4. COGEM (2018). Generiek advies inschaling replicatie-deficiënte adenovirale vectorsystemen. COGEM advies CGM/180316-01
5. McConnell MJ & Imperiale MJ (2004). Biology of adenovirus and its use as a vector for gene therapy. *Hum. Gene Ther.* 15: 1022-1033
6. Wold WS & Toth K (2013). Adenovirus Vectors for Gene Therapy, Vaccination and Cancer Gene Therapy. *Curr. Gene Ther.* 13: 421-433
7. Wold WSM & Ison MG (2013). Adenoviruses. In: Fields virology, volume 2, sixth edition. Ed. Knipe DM *et al.*, Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia
8. Bergmans JEN *et al.* (2017). Omlaagschaling van werkzaamheden met replicatie-defectieve AAV- en adenovirale vectoren. COGEM rapport CGM 2017-4
9. Lion T (2014). Adenovirus infections in immunocompetent and immunocompromised patients. *Clin. Microbiol. Rev.* 27: 441-462

10. Hoeben RG & Uil TG (2013). Adenovirus DNA replication. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5: a013003
11. Lenaerts L *et al.* (2008). Clinical features and treatment of adenovirus infections. *Rev. Med. Virol.* 18: 357-374
12. 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
13. Chirmule N *et al.* (1999). Immune response to adenovirus and adeno-associated virus in humans. *Gene Ther.* 6:1574-1583
14. Kaufman RJ (1985). Identification of the components necessary for adenovirus translational control and their utilization in cDNA expression vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82: 689-693
15. Kovesdi I & Hedley SJ (2010). Adenoviral producer cells. *Viruses* 2: 1681-1703
16. COGEM (2019). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van een groot aantal humaan- en dierpathogene RNA en DNA virussen (2019). COGEM advies CGM/190905-02
17. COGEM (2006). Toediening van een adenovirale vector coderend voor interleukine-12 aan patiënten met prostaattumoren. COGEM advies CGM/060512-01
18. COGEM (2009). Klinische studie met een conditioneel-replicerende adenovirale vector. COGEM advies CGM/090429-04.
19. COGEM (2009). Aanvullende informatie over een klinische studie met conditioneel-replicerende adenovirussen. COGEM advies CGM/091021-02
20. COGEM (2011). Verzoek tot wijziging vergunning fase I/II klinische studie met conditioneel-replicerende adenovirussen. COGEM advies CGM/110112-01
21. COGEM (2012). Klinische studie met een conditioneel-replicerende adenovirale vector als aanvullende behandeling van prostaatkanker. COGEM advies CGM/120710-01
22. Gull I *et al.* (2013). Heterologous expression, immunochemical and computational analysis of recombinant human interferon alpha 2b. *Springerplus* 2: 264
23. Asmana Ningrum R (2014). Human Interferon Alpha-2b: A Therapeutic Protein for Cancer Treatment. *Scientifica (Cairo)* 970315
24. Sterman DH *et al.* (2011). A trial of intrapleural adenoviral-mediated Interferon- α 2b gene transfer for malignant pleural mesothelioma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 184: 1395-1399
25. U.S. National Library of Medicine. Intrapleural Gene Transfer for Pleural Mesothelioma (IFN-alpha). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01212367> (bezocht: 24 september 2019)
26. U.S. National Library of Medicine. Combination Gene Transfer and Chemotherapy <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01119664> (bezocht: 25 september 2019)
27. Sterman DH *et al.* (2016). A pilot and feasibility clinical trial evaluating immuno-gene therapy of malignant pleural mesothelioma (mpm) using intrapleural delivery of adenovirus- interferon-alpha (ad.hifn- α 2b) in combination with high-dose celecoxib and systemic chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* 22: 3791-3800
28. U.S. National Library of Medicine. A Safety and Tolerability Study of SCH 721015 in Patients With Transitional Cell Carcinoma of the Bladder (Study P03816). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00536588> (bezocht: 24 september 2019)

29. Dinney CP *et al.* (2013). Phase I trial of intravesical recombinant adenovirus mediated interferon- α 2b formulated in Syn3 for Bacillus Calmette-Guérin failures in nonmuscle invasive bladder cancer. *J. Urol.* 190: 850-856
30. U.S. National Library of Medicine. 1B Intravesical Administration of SCH 721015 (Ad-IFNa) in Admixture With SCH 209702 (Syn3) for The Treatment of BCG Refractory Superficial Bladder Cancer. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01162785> (bezocht: 24 september 2019)
31. U.S. National Library of Medicine. Intravesical Administration of rAd-IFN/Syn3 in Patients With BCG-Refractory or Relapsed Bladder Cancer. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01687244> (bezocht: 24 september 2019)
32. Shore ND *et al.* (2017). Intravesical rAd-IFNa/Syn3 for Patients With High-Grade, Bacillus Calmette-Guerin-Refractory or Relapsed Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer: A Phase II Randomized Study. *J. Clin. Oncol.* 35: 3410-3416
33. Sherman DH *et al.* (2007). A phase I clinical trial of single-dose intrapleural IFN-beta gene transfer for malignant pleural mesothelioma and metastatic pleural effusions: high rate of antitumor immune responses. *Clin. Cancer. Res.* 13: 4456-4466