

Profielwerkstuk 'Het oncologische gebruik van adenovirussen' - SAMENVATTING

Door: Lydia Bregman

In mijn profielwerkstuk, waarmee ik de Jan Kommandeurprijs 2020 heb gewonnen, heb ik gekeken naar wat adenovirussen nou eigenlijk zijn en hoe ze in elkaar zitten, gemaakt worden en gemodificeerd kunnen worden. Om vervolgens de toepassingen van adenovirussen in de oncologie en de werkzaamheid van adenovirussen als oncologisch middel te analyseren. Dit om een antwoord te vinden op mijn hoofdvraag; 'zijn adenovirussen een geschikte, potentievolle optie voor het gebruik als een therapeutisch middel in de oncologische gen- en virotherapie?'. Ik heb hierbij de nadruk gelegd op oncolytische adenovirussen. Dat zijn adenovirussen die in staat zijn om te repliceren, en dan wel selectief in tumorcellen. Om ten slotte te achterhalen hoe onderzoeken en ontwikkelingen in het veld van adenovirussen werkelijk in elkaar zitten en welke factoren er in de realiteit meespelen hierin, heb ik een interview afgenomen met de vooraanstaande onderzoeker prof. dr. V. W. van Beusechem.

Aangezien ik veel ben ingegaan op de theorie achter adenovirussen en vervolgens de resultaten van meerdere onderzoeken evalueer, bestaat mijn profielwerkstuk hoofdzakelijk uit een literatuuronderzoek en deskresearch. Met dan ten slotte een interview natuurlijk.

Het was vrij moeilijk voor mij om van tevoren een hypothese vast te stellen. Het vergt namelijk veel kennis over het onderwerp om hier iets over te kunnen zeggen, en het is niet bepaald een alledaags onderwerp. Gebaseerd op wat vooronderzoek heb ik als hypothese gesteld dat adenovirussen wel potentie tonen voor het gebruik als therapeutisch middel in oncologische gen- en virotherapie.

Er is een aanzienlijke hoeveelheid onderzoek naar ze te vinden. En hoewel ik betwijfel of ze een werkelijke universele behandeling voor kanker zouden kunnen vormen, aangezien ik zou aannemen dat ze dan wel algemeen bekender zouden zijn, denk ik toch dat ze zeker wel een degelijke werking zouden kunnen hebben en mogelijk als medicijn kunnen optreden tegen kanker.

Mijn deelvragen zijn opgedeeld in vier grote deelvragen, waaraan ik elk een hoofdstuk heb besteed; dit zijn respectievelijk;

- 'Wat zijn adenovirussen?'
- 'Hoe kunnen adenovirussen toegepast worden in de oncologie?'
- 'Welke resultaten worden behaald met oncolytische adenovirussen?'
- 'Hoe ziet onderzoek in dit veld er in de praktijk uit?'

Hieronder volgt een samenvatting van het profielwerkstuk, gerangschikt per hoofdstuk, waarbij elk hoofdstuk overeenkomt met van de hoofddeelvragen.

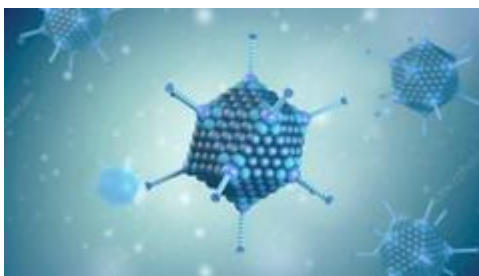


Fig. 43; adenovirus

Hoofdstuk 1: Adenovirussen (fig. 43) zijn dsDNA virussen met een genoom van 36 kB en een niet-omhulde icosaeëdere capside. Er bestaan zo'n 57 serotypes, waarvan Ad5 het meest voorkomend is, en onder supgroep C valt en gebruik maakt van de CAR receptor. Naast het binden van het vezeleiwit aan een celreceptor hebben adenovirussen integrines, in het specifiek het RGD motief, om cellen te betreden. Het adenovirale genoom bestaat uit de early en

late region, waarvan E1A het eerst getranscribeerd wordt en de verdere transcriptie beïnvloedt. In de jaren 80' is onderzoek naar Ad in genterapie opgekomen. Adenovirale vectoren zijn replicatie-incompetent en kunnen een transgen bevatten om naar een cel te brengen, en zijn op te delen in first-generation, second-generation en last-generation Ad, die verschillen in het aantal virale genen die uit het genoom zijn verwijderd. Ad zijn oncolytische virussen, wat inhoudt dat ze bij voorkeur kankercellen infecteren. Ze kunnen verder gemodificeerd worden om ze selectief in kankercellen te laten repliceren, wat CRAd's maakt. Dit kan met deleties, promotoren of zelfs miRNA. Adenovirussen hebben enkele voordelen, zoals dat ze tot een hoge titer geproduceerd kunnen worden, delende en niet-delende cellen kunnen infecteren, niet integreren in het genoom van de gastcel en dat er veel onderzoek naar ze is gedaan. Het doden van tumorcellen heet oncolyse. Ook conditioneel replicerende adenovirussen kunnen coderen voor een transgen.

Ad worden geproduceerd door ze in specifieke cellijnen te laten repliceren, wat met een bioreactor onder bepaalde omstandigheden wordt gedaan. Het inbrengen van transgenen in het Ad genoom gebeurt via homologe recombinatie tussen plasmiden, en deleties kunnen gemaakt worden door met genetische modificatie strategieën mutaties te maken of het gen uit te wisselen. Voor het maken van CRAd's kunnen deleties zoals in E1B, delta 24bp en deleties in gebieden die voor VA-RNA coderen gebruikt worden. Voor promotors valt te kiezen uit weefsel-specifieke of kankergerichte promotors, waar het E1A gen bijvoorbeeld onder wordt gezet om de replicatie te reguleren; een voorbeeld is de hTERT promotor. Met miRNA kan van RNAi gebruik gemaakt worden door een miRNA sequentie in de UTR van bijvoorbeeld E1A te plaatsen. Er kunnen modificaties gebruikt worden om Ad5 te verbeteren, aangezien veel mensen hier antilichaampjes voor hebben en het tropisme van CAR beperkt is. Dit kan bijvoorbeeld door de adenovirale capside met moleculen te modificeren, het RGD motief in de vezelknop te plaatsen of een chimeer adenovirus op te bouwen met het vezeleiwit van een ander serotype.

Hoofdstuk 2: Kanker is een verzamelnaam voor ongecontroleerde groeiende cellen. Bij een maligne tumor is sprake van ongereguleerde groei en deling; mutaties in tumorsuppressorgenen en proto-oncogenen maken dit mogelijk. Deze mutaties kunnen genetisch aangelegd zijn of veroorzaakt worden door buitenlichamelijke factoren zoals straling en kankerverwekkende stoffen. Vaak vindt er in plaats van een werkelijke verandering van het DNA een epigenetische mutatie plaats. Mutaties in kanker zijn op te delen in driving mutations en passenger mutations. Ook het cel metabolisme is bij tumorcellen anders, en de ernst van tumoren is op te delen in verschillende stadia. Het tumor microomgeving (TME) staat tumoren toe om te groeien door deze te voorzien van voedingsstoffen, het immuunsysteem te onderdrukken en stimuleert tot mutaties. De afbraak van de ECM staat tumoren toe om te verspreiden. Tumorstemcellen maken dat tumoren terug kunnen groeien.

Adenovirale vectoren en oncolytische adenovirussen kunnen toegepast worden in verschillende manieren. Therapie met een oncolytisch Ad heet ook wel (oncolytische) virotherapie, waarbij het virus ook met transgenen bewapend kan worden. Wanneer vector gebruikt wordt spreken we van genterapie. Afhankelijk van de manier waarop het Ad toegepast wordt of welke transgenen gebruikt worden zijn adenovirale therapieën op te delen in suicide genterapie, waarbij je gebruik maakt van prodrug-activerende genterapie om een prodrug met enzymen in tumoren om te zetten tot actief medicijn, toxine genterapie om met een gifstof kankercellen te doden, of een algemene stimulator van apoptose als p53. Bij oncolytische virotherapie wordt van het selectieve replicatie vermogen van CRAd's gebruik gemaakt om kankercellen via oncolyse te doden, welk effect versterkt wordt door de

immuunrespons op Ad, en een mogelijk transgen; zo kan je Ad bewapenen met o.a. anti-angiogene factoren, tumorsuppressorgenen of prodrug-converterende enzymen, wat een samensmelting met suïcide gentherapie oplevert. Echter kunnen ook andere transgenen, zoals voor ECM afbrekende enzymen, gebruikt worden om de werking te verbeteren. Wanneer een Ad als immuuntherapie gebruikt wordt, kan het toegepast worden als immunogentherapie of vaccinatie voor de behandeling van kanker. Hierbij wordt geprofiteerd van de inheemse immuunrespons op adenovirussen, wat versterkt kan worden door het Ad, wat overigens zowel een replicatie-incompetent of replicatie-competente vector kan zijn, te laten coderen voor de expressie van immuun-stimulerende transgenen als cytokinen, chemokinen en liganden; immunogentherapie. Bij vaccinatie wordt het immuunsysteem geactiveerd door DC's, dendritische cellen, te activeren. Ten slotte kan met corrigerende gen therapie gepoogd worden om gemuteerde pathways, die de celcyclus regelen of apoptose induceren, in tumorcellen te herstellen. Dit kan bijvoorbeeld met p53. Adenovirale therapieën kunnen gecombineerd worden met vormen van chemo-, radio- en immuuntherapie, en zijn aangetoond deze hier te kunnen complementeren en als combinatie therapie een verhoogd, synergetisch antitumoraal effect te hebben.

Hoofdstuk 3: Onderzoek naar de ontwikkeling van adenovirussen als kankertherapie duurt lang, meer dan 10 jaar, en kost bovendien veel. Het begint met preklinisch onderzoek, waar in vitro, in 'glas', en in vivo, in diermodellen, getest wordt. Veelgebruikte diermodellen zijn athymische muizen. In vitro en in vivo onderzoek hebben beide voor- en nadelen. Zo is in vitro onderzoek gemakkelijker en goedkoper, maar is in vivo onderzoek realistischer. Om in vitro onderzoek met kankercellijnen realistischer te maken kan i.p.v. van een 2D monolaag systeem, een 3D sferoïde systeem gebruikt worden. Het kweken van cellijnen gebeurt in bioreactoren. Bij in vivo experimenten plaatst men xenotransplantaten van menselijke of soms dierlijke kankercellijnen in het dier, om vervolgens een aantal factoren te meten. Dit gebeurt aan de hand van een aantal analysemethodes. Er vindt veel onderzoek plaats, in de verschillende types en stadia kanker met verschillend opgestelde adenovirale therapieën. Ik heb hierbij uitgebreid naar onderzoeken in hersenkanker, met name glioma en glioblastoma (graad 4 glioma), gekeken, en ook meer algemeen naar urologische kankers en alvleesklierkanker.

Glioma is een erg dodelijk kankertype, dat bovendien resistent is tegenover conventionele behandelingen. Het is een van de kankers waar het meest op getest is in klinische proeven met oncolytische Ad. Ik heb gekeken naar zes verschillende onderzoeken; deze maakten gebruik van verschillende oncolytische adenovirussen, die allemaal een 24 bp deletie hadden in E1A, en verder nog een aantal modificaties. Het RGD-motief in de vezelschacht kwam ook veel voor. Over het algemeen waren de resultaten positief, en op één studie na verlengde het adenovirus statistisch significant de overleving van de muizen, in vergelijking met geen behandeling én in vergelijking met andere adenovirussen. Enkele studies toonden een percentage lange termijn overlevenden, die complete tumorregressie toonden na behandeling met het oncolytische Ad. Bij urologische kankers en alvleesklierkanker worden er andere strategieën toegepast; in prostaatkanker zie je bijvoorbeeld suïcide gentherapie, terwijl er bij blaaskanker immunotherapie toegepast wordt omdat dit hier vatbaarder voor is. Alvleesklierkanker is vrij resistent tegen conventionele chemotherapie en immuuntherapie, hier wordt bijvoorbeeld suïcide gentherapie en combinatie therapie met chemo- en radiotherapie.

Klinische proeven worden in mensen gedaan, in het geval van kankeronderzoek zijn dit altijd patiënten. Het wordt opgedeeld in fase I, II, III en eventueel kan een fase IV onderzoek uitgevoerd worden. Het

aantal deelnemers neemt bij de oplopende fases toe, en de doelen zijn respectievelijk om de veiligheid en juiste dosis te bepalen, verdere toxiciteit en bijwerkingen op te merken en aan te tonen dat de behandeling werkelijk nut heeft, en het op grote schaal te testen om lange termijn veiligheid en werkzaamheid vast te stellen. Kankertypes waarin veel klinisch onderzoek met adenovirussen plaatsvindt zijn onder andere hersenkanker, alvleesklierkanker en blaaskanker. Er zijn momenteel met oncolytische adenovirussen 37 fase I, 17 fase II en twee fase III klinische studies op ClinicalTrials.gov te vinden, waarbij uit de voltooide proeven veiligheid, lage toxiciteit en een statistisch significante verbetering in gemedieerde overleving blijkt, met in enkele gevallen volledige tumorregressie. Obstakels in de ontwikkeling van Ad als medicijn bestaan uit o.a. toxiciteit, betrouwbaarheid, gebrekkige systemische toediening, immunologie, het moeilijk doordringen van de stroma en beperkte werkzaamheid doordat tumoren erg heterogeen zijn en adenovirussen geen perfecte infectiviteit hebben. Hoewel er veel preklinische ontwikkelingen gedaan worden en modificaties mogelijk te zijn om deze obstakels tegen te gaan, komen ze niet veel voor in klinische proeven. Naast algemene obstakels hebben adenovirussen wegens hun algemene biologie voor- en nadelen, waarmee ze te vergelijken zijn met andere oncolytische virussen en virale vectoren. Hieronder vallen vaccinovirussen, reovirussen en het herpes-simplexvirus type 1, waarvan het eerste oncolytische virus op de markt, T-VEC, gemaakt is.

Hoofdstuk 4: Voor dit hoofdstuk heb ik een interview gedaan met Victor van Beusechem, PI en het hoofd van een afdeling in het UMC, en eigenaar van zijn eigen bedrijf, ORCA therapeutics, dat het oncolytische adenovirus ORCA-010 ontwikkelt. ORCA-010 is gebaseerd op Delta-24-RGD en heeft een TI modificatie, die snellere replicatie toestaat. Het immunotherapeutische effect van het adenovirus wordt als een van de belangrijkste aspecten van de werking ervan beschouwd, naast het oncolytische effect dat het virus als CRA-d oplevert. Het ophalen van geld voor het onderzoek is door meerdere factoren lastig geweest voor Van Beusechem; zo heeft zijn bedrijf twee jaar lang stilgelegen, zoekend naar investeerders. Momenteel zitten ze in een fase I/II klinisch onderzoek, voor vroege, niet-uitgezaaide prostaat-kanker, dat plaatsvindt in Canada. Het eerste cohort is nu voltooid, en bij de eerste patiënt bleek een tumorregressie van zo'n 50%. Van Beusechem meent dat er fase II studies zijn die potentie tonen om tot fase III onderzoeken ontwikkeld te worden, waarbij de bottleneck van ontwikkeling het geld is. In de ontwikkeling van adenovirussen voor kanker meent hij dat het streven naar betere replicatie zo wel klaar is, maar dat het verspreiden binnen de tumor, en dat het ontwikkelen van een Ad dat systemisch toegediend kan worden een belangrijke stap naar een ideaal adenovirus zou zijn.

Onderzoekers in het laboratorium zijn ruw gesproken op te delen in analisten en academici, die verschillende taken hebben. De financiering voor de onderzoeken wordt verzorgd door Van Beusechem, die daarvoor subsidies moet aanvragen. In het doen van onderzoek is het interpreteren van data en resultaten is een cruciale stap, evenals het bijhouden van wat je doet.

De commerciële invloed op onderzoek is enorm. Als investeerders of subsidie-gevende fondsen niet geïntroduceerd zijn in je product of geen potentie zien, kan je dit niet (pre)klinisch testen. Als je onderzoekt voor het ontwikkelen van een medicijn dat uiteindelijk op de markt kan komen, moet je dus iets ontwerpen waar investeerders in alle stappen van het proces in geïnteresseerd zullen zijn. In onderzoeken mislukken 99 van 100 dingen die je probeert, en aangezien het ontwikkelen van een medicijn ongeveer een miljard en 10 jaar kost, als niet meer, moet je echt aan kunnen tonen dat jouw product potentie heeft voor een investeerder om er in geïnteresseerd te zijn. Door de fases van

klinische proeven heen zullen er overigens meerdere investeerders zijn, die jouw product of bedrijf opkopen en door de volgende fase heen trekken. Het begint bij kleine biotechnologische bedrijven, die de wat riskantere, vroege stadium onderzoeken doen, en eindigt bij grote farmaceuten die fase III onderzoek voltooien. Bij het aantrekken van investeerders spelen een aantal dingen een rol, zoals het hebben van een octrooi dat nog voor een redelijk lange tijd loopt, en wat je erin stopt; zo kan een investeerder alleen geïnteresseerd zijn in virussen met een hip transgen, maar moet je je ook realiseren, dat de ontwikkeling hierin erg snel is, en de ontwikkeling van een individueel virus sloom; als je over een aantal jaar in de volgende fase zit, kunnen investeerders zeggen dat je transgen achterhaald is, en dat ze niet meer geïnteresseerd zijn in het ontwikkelen van zo'n virus. Ten slotte speelt het kankertype en het stadium waarin je het ontwikkeld ook een rol; is er hier al veel competitie? Is er een groot aantal patiënten in deze groep, oftewel, kunnen we het eindproduct aan veel mensen verkopen? Hoe groot is de kans dat een adenovirus in dat type kanker slaagt? Victor van Beusechem ziet vooruitgang in de ontwikkeling van adenovirussen. In de werkelijkheid zal de toepassing van een adenovirale therapie waarschijnlijk in een vorm van combinatie therapie zijn, en adenovirussen zullen weliswaar niet in alle kankertypes, in alle stadia of bij alle patiënten werkzaam zijn, maar ze zullen hun niche vinden waar andere therapieën gefaald hebben en zo een nieuw puzzelstukje zijn in de genezing van kanker.