



COMMISSIE
COGEM
GENETISCHE
MODIFICATIE

COGEM ADVIES
CGM/221223-01

**GENERIEKE
OMLAAGSCHALING VAN
WERKZAAMHEDEN MET
VIRALE REPLICONS
AFGELEID VAN
ALFAVIRUSSEN EN
FLAVIVIRUSSEN**



Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Waterstaat
drs. V.L.W.A. Heijnen
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 23 december 2022
KENMERK CGM/221223-01
ONDERWERP Generiek advies over alfavirus en flavivirus replicons

Geachte mevrouw Heijnen,

Naar aanleiding van de uitkomsten van een in opdracht van de COGEM uitgevoerd onderzoeksproject naar virale repliconsystemen en hun bioveiligheidsaspecten, deelt de COGEM u het volgende mee.

SAMENVATTING:

Er wordt veel onderzoek gedaan naar de ontwikkeling en toepassing van zogenaamde 'virale replicons'. Virale replicons zijn afgeleid van virussen (virusvectoren) en worden onder meer gebruikt voor onderzoek naar vaccins en kanker. Replicons kunnen na infectie van een cel nog wel hun (virale) genoom repliceren, maar zijn niet in staat nieuwe virusdeeltjes te vormen en kunnen daardoor niet verder verspreiden. Hiervoor zijn één of meerdere genen die coderen voor eiwitten die het virusdeeltje vormen (de structurele eiwitten), verwijderd of vervangen door een transgen ('gene-of-interest').

De structurele eiwitten kunnen tijdens de productie van de replicons extern toegevoegd worden, waardoor ingepakte replicons, zogenaamde virale replicondeeltjes, worden gegenereerd. Deze replicondeeltjes kunnen eenmalig cellen infecteren, maar daarna geen nieuwe virusdeeltjes vormen, omdat de structurele genen niet in het genoom aanwezig zijn. Voorbeelden van replicons zijn de zogenoemde zelf-amplificerende mRNA-vaccins tegen COVID-19 en influenza, die thans in ontwikkeling zijn.

Gezien de toename van het aantal adviesvragen over inschaling van werkzaamheden met replicons heeft de COGEM een onderzoeksproject laten uitvoeren naar

de verschillende aspecten rond repliconsystemen. Mede op basis van de resultaten van het onderzoeksproject en teneinde de vergunningverleningsprocedures te stroomlijnen, heeft de COGEM een generiek advies over de inschaling van werkzaamheden met virale replicons opgesteld. Deze generieke milieurisicobeoordeling beperkt zich tot replicons afgeleid van alfavirussen (genus Alphavirus) en flavivirussen (genus Flavivirus).

De COGEM is van oordeel dat, gezien de eigenschappen van deze replicons en replicondeeltjes, generieke omlaagschaling mogelijk is. Afhankelijk van welke genen verwijderd zijn, adviseert de COGEM:

- Laboratoriumwerkzaamheden met 'naakte' alfa- en flavivirus replicons kunnen plaatsvinden op inperkingsniveau I, of op één niveau lager dan de pathogeniteitsklasse van het uitgangsvirus;
- Werkzaamheden met replicondeeltjes kunnen één niveau lager plaats vinden dan de pathogeniteitsklasse van het uitgangsvirus;
- Zowel voor werkzaamheden met naakte replicons als met replicondeeltjes zijn generieke voorwaarden van toepassing: de gebruikte cellen zijn vrij van verwante alfa- en flavivirussen, en de gebruikte transgenen mogen de verwijderde functies niet herstellen;
- Voor replicondeeltjes geldt daarnaast dat de preparaten vrij moeten zijn van – tijdens de productie ontstaan – virus dat in staat is zich te vermenigvuldigen en te verspreiden.

Wanneer aan de bovengenoemde voorwaarden voldaan wordt, acht de COGEM de milieurisico's van het uitvoeren van werkzaamheden met alfa- en flavivirus replicons op de aangegeven inperkingsniveaus, verwaarloosbaar klein.

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

Hoogachtend,



Prof. dr. ing. Sybe Schaap
Voorzitter COGEM

c.c. - Drs. Y. de Keulenaar, Hoofd Bureau ggo
- Ministerie van IenW, Directie Omgevingsveiligheid en Milieurisico's
DG Milieu en Internationaal



TABLE OF CONTENTS

1. Inleiding	5
1.1 Algemene informatie over virale replicons	5
1.2 Het onderzoeksrapport	6
1.3 De afbakening van dit advies	7
2. Replicons afgeleid van alfavirussen	7
2.1 Replicatie van alfavirussen en de opbouw van virusdeeltjes	7
2.2 Naakte replicons en VRP's afgeleid van alfavirussen	8
2.3 De recent beschreven 'self-amplifying' mRNA's zijn naakte alfavirus replicons	8
3. Replicons afgeleid van flavivirussen	9
3.1 Replicatie van flavivirussen en de opbouw van virusdeeltjes	9
3.2 Naakte replicons en VRP's afgeleid van flavivirussen	9
4. Overweging voor de omlaagschaling van replicons	10
4.1 Replicons kunnen niet verspreiden mits functionele structurele eiwitten afwezig zijn	11
4.1.1 Bij alfavirus replicons kunnen 'virus-like vesicles' (VLV's) ontstaan	11
4.1.2 In de flavivirus C-coderende sequentie liggen essentiële replicatie-signalen	12
4.2 Verspreiding door complementatie en recombinatie	12
4.2.1 Complementatie door transgenen in het replicon kan leiden tot verspreiding	12
4.2.2 Complementatie of recombinatie met verwante virussen kan leiden tot verspreiding	13
4.3 Tijdens de productie van VRP's kan replicatie-competent virus ontstaan	13
4.4 Met een RCV-test kan de aanwezigheid van replicatie-competent virus worden geanalyseerd	14
5. Advies: Onderzoek met alfavirus en flavivirus replicons kan omlaaggeschaald worden	15
5.1 Algemene voorwaarden voor omlaagschaling van alfa- en flavivirus replicons	15
5.2 Werkzaamheden met naakte alfa- en flavivirus replicons kunnen worden omlaaggeschaald	16
5.2.1 Inschaling van werkzaamheden met naakte alfavirus replicons	16
5.2.2 Inschaling van werkzaamheden met naakte flavivirus replicons	17
5.2.3 Werkzaamheden met alfavirus infectieuze VLV's dienen casusgewijs beoordeeld te worden	18
5.3 Omlaagschaling van werkzaamheden met alfa- en flavivirus VRP's	18
5.3.1 Alfavirus VRP's geproduceerd met split-helper systemen kunnen worden omlaaggeschaald	19
5.3.2 Flavivirus VRP's kunnen worden omlaaggeschaald	20
5.4 Voorwaarden met betrekking tot de RCV-test	21
5.4 Conclusie en samenvatting	21
6. Signalerende opmerking	23
Referenties	23



1

INLEIDING

Er is veel aandacht voor de ontwikkeling en toepassing van virale replicons, zowel als hulpmiddel in (fundamenteel) laboratoriumonderzoek, als bij medische toepassingen in het vaccin- en kankeronderzoek. Daaronder vallen ook de zogenaamde 'self-amplifying' mRNA-vaccins, die momenteel worden onderzocht als vaccin tegen COVID-19^{1,2,3,4,5} of influenza.⁶ Virale replicons zijn virusvectoren die nog wel het virale genoom kunnen repliceren in de geïnfecteerde cel, maar niet in staat zijn nieuwe virusdeeltjes te vormen en verder te verspreiden. Hiertoe zijn uit het virale genoom één of meerdere genen coderend voor essentiële structurele eiwitten verwijderd of vervangen door een (trans) gen, bijvoorbeeld een heteroloog viraal eiwit waartegen een immuunrespons wordt opgewekt. Door de structurele eiwitten apart (in trans) aan te bieden, kunnen virale replicondeeltjes ('viral replicon particles'; VRP's) worden gegenereerd die eenmalig cellen kunnen infecteren.

De COGEM heeft een onderzoek laten uitvoeren waarbij de huidige toegepaste en in ontwikkeling zijnde repliconsystemen en de bioveiligheidsaspecten die bij virale replicons komen kijken, zijn geïnventariseerd. Dit onderzoek is uitgevoerd door Dr. Karen van der Meulen en Dr. Patrick Rüdelsheim van Perseus en de resultaten van het onderzoek zijn beschreven in het rapport '*Viral replicon systems and their biosafety aspects – Inventory and description of viral replicon systems and characteristics relevant for risk assessment*' (CGM/2022-06). Op basis van de resultaten is het onderhavige advies opgesteld, waarin geadviseerd wordt werkzaamheden met virale replicons afgeleid van virussen uit de genera *Alphavirus* en *Flavivirus* generiek omlaag te schalen.

1.1 ALGEMENE INFORMATIE OVER VIRALE REPLICONS

Virale replicons zijn RNA- of DNA-moleculen die zelfstandig kunnen repliceren en afgeleid zijn van RNA- of DNA-virussen. In dit advies wordt alleen ingegaan op RNA-replicons afkomstig van positief-strengige RNA-virussen. Virale RNA-replicons kunnen op verschillende manieren worden toegepast, bijvoorbeeld bij onderzoek naar virale genoomrePLICATIE, als potentieel vaccin, of als mogelijke kankerimmuno- of genterapie.^{7,8,9} Bij de productie van replicons wordt onderscheid gemaakt tussen zogenaamde 'naakte' virale replicons en 'viral replicon particles' (VRP's).

Bij naakte virale replicons zijn uit het virale genoom één of meerdere essentiële structurele genen verwijderd. De niet-structurele genen en RNA-sequenties die noodzakelijk zijn voor genoomrePLICATIE, zoals bijvoorbeeld de 'untranslated regions' (UTR's) of 'non-coding regions' (NCR's), zijn nog wel aanwezig, wat maakt dat het replicon-RNA zelf-

standig kan repliceren. Omdat de structurele genen verwijderd zijn, kan de productie van virusdeeltjes niet plaatsvinden.

'Naakte' virale replicons kunnen als RNA-molecuul in de cel worden gebracht door middel van electroporatie of transfectie. Ook kan het naakte RNA ingepakt worden in niet-virale of synthetische deeltjes, zoals nanopartikels (Lipid nanoparticles: LNP's), die via endocytose door de cel opgenomen kunnen worden. Een andere manier van toedienen betreft de productie van een RNA-replicon vanaf een DNA-plasmide dat daartoe in de cel wordt gebracht, ook wel 'DNA-launched RNA replicon' (DREP) genoemd. Het plasmide wordt naar de nucleus getransporteerd, waar het replicon-RNA getranscribeerd wordt, met behulp van bijvoorbeeld een CMV-promotor op het plasmide. Translatie en replicatie van het replicon-RNA vinden plaats in het cytoplasma na transport van het RNA-molecuul vanuit de celkern. Wanneer het replicon ook een selectiegen bevat, zoals het gen dat codeert voor neomycine-resistentie, kan geselecteerd worden op stabiele replicon-cellijnen waarin het replicon-RNA in de cellen aanwezig blijft.

Men spreekt van VRP's als het naakte RNA ingepakt wordt door virale structurele eiwitten. Bij de productie van VRP's worden de ontbrekende structurele genen *in trans* aangeboden, bijvoorbeeld in een celtijn waarin deze eiwitten stabiel tot expressie komen, of met behulp van één of meerdere helper-RNA's of plasmiden. VRP's zijn in staat cellen te infecteren, maar door de afwezigheid van structurele genen in het replicon-RNA kunnen er geen nieuwe VRP's geproduceerd worden. Omdat infectie eenmalig plaatsvindt, wordt verdere verspreiding voorkomen.

1.2 HET ONDERZOEKSRAPPORT

Er is de laatste jaren veel onderzoek gedaan naar verschillende virale replicons afgeleid van virussen uit diverse families van RNA-virussen.⁹ Het onderzoeksrapport inventariseert en beschrijft de grote diversiteit aan virale repliconsystemen en de aspecten die van belang zijn voor de milieurisicobeoordeling die aan deze systemen gekoppeld zijn. Daarbij heeft het onderzoek zich gericht op het beschrijven van repliconsystemen afgeleid van positief- of negatief-strengs RNA-virussen. Er is onderscheid gemaakt tussen 'naakte' replicons en repliconsystemen waarbij VRP's worden geproduceerd. In het onderzoeksrapport zijn de eigenschappen van het transgen niet meegenomen, omdat hier andere risico-afwegingen voor gelden.

Uit het rapport blijkt dat ondanks de grote verscheidenheid aan repliconsystemen, een aantal gemeenschappelijke aspecten met betrekking tot eventuele milieurisico's geïdentificeerd kunnen worden. Het belangrijkste hierbij is de vorming van replicatie-competent virus (RCV) tijdens de productie van VRP's. Eveneens wordt de mogelijkheid besproken van het ontstaan van RCV, indien recombinitie plaatsvindt met eventuele in de gastheer(cellen) aanwezige verwante (wildtype) virussen. In het rapport worden verschillende strategieën beschreven om deze risico's in te perken. Tot slot is er een schema opgenomen dat als leidraad genomen kan worden bij mogelijke omlaagschaling van virale repliconsystemen.

1.3 DE AFBAKENING VAN DIT ADVIES

Op basis van de bevindingen van het onderzoek, ziet de COGEM mogelijkheden voor de generieke omlaagschaling van werkzaamheden met naakte replicons en VRP's afgeleid van virussen uit de genera *Alphavirus* en *Flavivirus*, onder Ingeperkt Gebruik. De eerste repliconsystemen afgeleid van alfa- en flavivirussen zijn al vele jaren geleden beschreven^{10,11,12,13,14,15,16} en worden veel gebruikt in het onderzoek, waaronder in klinische studies.^{17,18,19} Omdat de risico's van deze repliconsystemen goed in kaart zijn gebracht, is het mogelijk om deze replicons generiek te kunnen inschalen. Voor andere virale repliconsystemen lijkt vooralsnog onvoldoende informatie aanwezig te zijn om een generieke milieurisicobeoordeling en daarbij behorende inschaling van werkzaamheden te kunnen uitvoeren.

2

REPLICONS AFGELEID VAN ALFAVIRUSSEN

2.1 REPLICATIE VAN ALFAVIRUSSEN EN DE OPBOUW VAN VIRUSDEELTJES

Alfavirussen (genus *Alphavirus*; familie *Togaviridae*) hebben een breed gastheerbereik en kunnen onder andere vogels, zoogdieren, vissen en insecten infecteren.^{20,21} Alfavirussen kunnen verspreid worden via bloedzuigende insecten, met name muggen.²⁰ Het genus *Alphavirus* kent 32 species²¹, waaronder verscheidene soorten die ziekten veroorzaken bij mens en/of dier. Een aantal daarvan zijn *Chikungunya virus* (CHIKV), *Ross River virus* (RRV), *Semliki Forest virus* (SFV), *Sindbis virus* (SINV) en *Venezuelan equine encephalitis virus* (VEEV).²²

Alfavirusdeeltjes hebben een diameter van ongeveer 70 nm en bevatten een positief enkelstrengs RNA-genoom van 9,7 tot 11,8 kb.²¹ Replicatie van het virusgenoom vindt plaats in het cytoplasma van de gastheercel. Op het genoom liggen twee grote 'open reading frames' (ORF's). De niet-structurele eiwitten (nsP1 – nsP4) worden vanaf het ORF aan het 5'-uiteinde van het genoom afgelezen als een polyproteïne; na klieving door het virale protease in nsP2 worden de individuele eiwitten gevormd. Deze eiwitten zijn betrokken bij de replicatie van het virale RNA.^{22,23} Het ORF aan het 3'-uiteinde van het genoom codeert voor de structurele eiwitten. Dit ORF komt tot expressie vanaf een subgenomisch mRNA, dat getranscribeerd wordt vanaf een interne promotor, 26S, gelegen in het gebied tussen het structurele en niet-structurele ORF.^{20,23} Virale en cellulaire proteases klieven de structurele polyproteïnes in de individuele eiwitten (C, E3, E2, 6K en E1). In sommige gevallen leidt '(-1) frame-shifting' tijdens de translatie tot de productie van een extra eiwit, TF

genaamd.²⁴ Aan beide uiteinden van het genoom liggen de 'non-coding regions', en het virale RNA heeft een 5'-cap-structuur en een poly-A-staart aan het 3'-uiteinde.

Het RNA in het virusdeeltje wordt omgeven door het capsid-eiwit (C) en tezamen vormen deze het nucleocapsid. Om de eiwitmantel bevindt zich een lipidenmembraan met daarin de glycoproteïnen (envelopeiwitten, E1 en E2) die betrokken zijn bij de aanhechting en infectie van de gastheercel.²⁵ De glycoproteïnen zijn daarmee direct van invloed op het gastheerbereik.²¹ De assemblage en 'budding' van nieuwe virusdeeltjes vindt plaats op het plasmamembraan van de gastheercel.²⁶

2.2 NAAKTE REPLICONS EN VRP'S AFGELEID VAN ALFAVIRUSSEN

In naakte replicons afgeleid van alfavirussen is het ORF dat codeert voor de structurele genen verwijderd. Een eventueel transgen wordt op de positie van het structurele ORF geïnsereerd en komt tot expressie vanaf de subgenomische 26S-promoter. In sommige replicons is een tweede 26S-promoter in het replicongenoom aangebracht, zodat meerdere (trans)genen tot expressie gebracht kunnen worden. Vooral SFV, SINV en VEEV worden gebruikt voor de constructie van repliconsystemen.²⁷

Bij de productie van VRP's worden de structurele genen *in trans* aangeboden. Meestal vindt co-transfectie plaats van het replicon-RNA met één of meerdere helperconstructen, waarvan de structurele eiwitten getransleerd worden. Vaak zijn de helperconstructen eveneens afgeleid van alfavirussen, waaruit de coderende sequentie van de niet-structurele eiwitten verwijderd is. Er wordt onderscheid gemaakt tussen 'single-helper'-strategieën, waarbij de structurele genen op een enkel helper-RNA worden aangeboden, en de 'split-helper-systemen'. Bij die laatste productiesystemen liggen het C-gen en de genen coderend voor de glycoproteïnen op twee verschillende helper-RNA's.^{13,74} Productiesystemen waarbij de structurele genen vanaf plasmiden aangeboden worden zijn voor zover bij de COGEM bekend niet beschreven. Stabiele cellijnen die de structurele eiwitten produceren zijn beschreven, maar worden weinig gebruikt.²⁸

2.3 DE RECENT BESCHREVEN 'SELF-AMPLIFYING' mRNA'S ZIJN NAAKTE ALFAVIRUS REPLICONS

Recent zijn de resultaten bekend gemaakt van klinische studies met zogenaamde 'self-amplifying' (sa)mRNA-vaccins tegen COVID-19.^{1,2,3,5} Deze vaccins bestaan uit het naakte replicon-genoom van de VEEV vaccinstam TC-83 ingepakt in LNP-deeltjes. Op de positie van de structurele genen is het gen coderend voor het Spike-eiwit van SARS-CoV-2 geïnsereerd. Het voordeel van het gebruik van samRNA-vaccins t.o.v. reguliere mRNA-vaccins is dat er met een lagere dosis kan worden gevaccineerd, omdat het mRNA zichzelf in de gastheercellen kan vermeerderen. Een vergelijkbaar vaccin wordt onderzocht tegen influenza en is gebaseerd op het naakte replicon-genoom van SFV.⁶

3

REPLICONS AFGELEID VAN FLAVIVIRUSSEN

3.1 REPLICATIE VAN FLAVIVIRUSSEN EN DE OPBOUW VAN VIRUSDEELTJES

Flavivirussen (genus *Flavivirus*, familie *Flaviviridae*) zijn arbovirussen en kunnen via muggen (met name *Culex* spp. of *Aedes* spp.) en andere bloedzuigende geleedpotigen (o.a. teken) worden overgedragen. Zoogdieren en vogels zijn de primaire gastheren. Binnen het genus *Flavivirus* zijn 53 virussoorten ondergebracht,²⁹ waaronder soorten die ziekte kunnen veroorzaken bij mens of dier. De soorten met de grootste wereldwijde gezondheidsimplicaties voor de mens zijn *West Nile virus* (WNV), *Yellow fever virus* (YFV), *Japanese encephalitis virus* (JEV), *Dengue virus* (DENV), *Zika virus* (ZIKV) en *Tick-borne encephalitis virus* (TBEV).^{30,31} Met uitzondering van TBEV, dat wordt overgedragen door teken, verspreiden WNV, YFV, JEV, DENV en ZIKV via muggen naar de mens.

Flavivirussen hebben een positief enkelstrengs RNA genoom van circa 11 kb en zijn omhuld door een lipidemembraan.^{30,31,32} Replicatie van het virusgenoom vindt plaats in het cytoplasma van de gastheercel. Het RNA codeert voor één enkel polyproteïne, waarbij het ORF aan weerszijden wordt geflankeerd door een 'untranslated region' (UTR).³³ Door splitsing van het polyproteïne worden verschillende structurele eiwitten (C, (pr)M en E) en zeven niet-structurele eiwitten (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B en NS5) gevormd.^{29,32} Het nucleocapside (C) omhult het RNA. De structurele eiwitten (pr)M en E zijn envelopeiwitten, die zich in de lipidemembraan om de nucleocapside bevinden. (pr)M en E zijn betrokken bij de binding van het virus aan de cellulaire receptor, de fusie van het virale membraan (de 'envelop') met het membraan van de gastheercel, en de immuniteit tegen het virus.³² De NS-eiwitten hebben verschillende functies en zijn onder andere betrokken bij RNA-replicatie en de verwerking van het polyproteïne.³⁴ De assemblage van nieuwe virusdeeltjes vindt plaats in het endoplasmatisch reticulum (ER) van de gastheercel, waarbij 'budding' via het ER-membraan optreedt.³⁵

3.2 NAAKTE REPLICONS EN VRP's AFGELEID VAN FLAVIVIRUSSEN

In de literatuur zijn meerdere replicons beschreven die zijn afgeleid van verschillende flavivirussen. Deze replicons worden gebruikt voor het bestuderen van virale replicatie, het screenen van mogelijke antivirale middelen of om onderzoek naar pathogene virussen op een lager inperkingsniveau mogelijk te maken. Daarnaast zijn er ook klinische

studies waarbij flavivirus replicons worden onderzocht als vaccin tegen infectieziekten of als behandeling van kanker.

Naakte replicons afgeleid van flavivirussen uit het genus *Flavivirus* bezitten meestal een grote 'in-frame' deletie in het gebied van de structurele gensequenties (C-prM-E). Daarbij dient het 5'-deel van de coderende sequentie van het C-eiwit (tot ongeveer 40 codons) behouden te blijven vanwege de aanwezigheid van 'cis-acting' elementen die nodig zijn voor efficiënte RNA-replicatie.^{12,36,37} Tevens is een sequentie van 24 tot 30 codons aan het 3'-uiteinde van het E-gen nodig om de signaalsequentie voor het NS1-eiwit te behouden.^{12,38,39} Er zijn replicons beschreven waarin slechts een gedeelte van de structurele genen zijn verwijderd, zoals deleties in alleen C^{40,41}, prM en een groot deel van E^{11,42,43} of alleen een deel van het E-gen.⁴⁴

Transgenen, selectiegenen of reporter genen worden meestal geïnsereerd op de positie van de deletie. Dit kan in frame, waarbij het geproduceerde eiwit aan de C- of N-terminus gefuseerd is met de resterende delen van de flavivirus C- en E-eiwitten. Maar er zijn ook replicons geconstrueerd waarbij het transgen (of de niet-structurele genen) vanaf een 'internal ribosomal entry site' (IRES) tot expressie komt, of waarbij de activiteit van het 2A peptide van Foot-and-mouth disease virus⁴⁵ zorgdraagt voor het correcte N-terminus. Door gebruik te maken van een IRES of het 2A peptide kunnen vanaf deze positie ook meerdere transgenen tot expressie gebracht worden. Bij bicistronische replicons is een expressiecassette bestaande uit een IRES en een transgen in het replicongenoem geïnsereerd 'downstream' van de niet-structurele genen.^{12,46}

Net als bij alfavirus-replicons kunnen flavivirus VRP's worden geproduceerd door de verwijderde structurele genen *in trans* aan te bieden. Er zijn systemen beschreven waar gebruik gemaakt wordt van stabiele cellijnen die de structurele eiwitten produceren, plasmiden die de structurele genen bij zich dragen, of van alfavirus replicon-RNA's die de flavivirus structurele eiwitten tot expressie brengen.^{47,48,49}

4 OVERWEGING VOOR DE OMLAAGSCHALING VAN REPLICONS

Bij werkzaamheden met replicons bestaat het risico dat RCV ontstaat of dat replicons op een andere wijze kunnen verspreiden. Hieronder zal dieper worden ingegaan op deze risico's voor werkzaamheden met replicons afgeleid van virussen uit het genus *Alpha-virus* of *Flavivirus*.

4.1 REPLICONS KUNNEN NIET VERSPREIDEN MITS FUNCTIONELE STRUCTURELE EIWITTEN AFWEZIG ZIJN

In replicons zijn substantiële deleties aangebracht in de sequenties die coderen voor essentiële structurele eiwitten. Aangezien de niet-structurele genen en de replicatie-signalen nog aanwezig zijn op het replicon-genoom, kan het replicon-RNA wel gerepliceerd worden, maar nieuwe infectieuze virusdeeltjes kunnen niet meer gevormd worden.

Het C-eiwit en de envelopeiwitten zijn essentiële structurele eiwitten van alfa- en flavivirussen, die noodzakelijk zijn voor de vorming van infectieuze virusdeeltjes. Het C-eiwit is noodzakelijk voor de vorming van het nucleocapside, omdat het RNA-genoom ingepakt wordt door een complex van C-eiwitten.^{50,51} Door 'budding' aan gastheermembranen wordt het nucleocapside omgeven door de virale envelop waarin de virale envelopeiwitten zijn opgenomen.

Het alfavirus envelopeiwit E2 is verantwoordelijk voor de aanhechting van het virusdeeltje aan de gastheerreceptor, terwijl het envelopeiwit E1 een rol speelt bij de fusie van de virale envelop met het membraan van de gastheercel.⁵² Bij flavivirussen is het envelopeiwit E verantwoordelijk voor zowel de receptorbinding als de fusie met de membraan van de gastheercel.

PrM wordt beschouwd als chaperonne-eiwit voor de correcte vouwing van het E-eiwit, en samen met het E-eiwit initieert prM de budding aan de ER-membraan. Bij het verlaten van de cel, wordt prM gekliefd door een cellulaire protease waarbij infectieuze flavivirusdeeltjes gevormd worden. Het overgebleven M-eiwit is gepositioneerd onder het E-eiwit en komt vrijwel niet aan de oppervlakte van de virale envelop.⁵³

Bij zowel alfa- als flavivirussen bepalen de ectodomeinen van de envelopeiwitten de aanhechting en fusie van de virusdeeltjes aan de receptoren van de gastheer. Met het verwijderen van deze domeinen verliezen de virussen hun verspreidende vermogen.

Alfa- en flavivirus replicons waaruit alleen de sequenties van het C-eiwit zijn verwijderd, kunnen in veel gevallen nog spreiden. Alfavirus Δ C-replicons kunnen bijvoorbeeld via infectieuze 'virus-like vesicles' (VLV's) naar naburige cellen spreiden (zie paragraaf 4.1.1). Voor flavivirus replicons dient een deel van het C-eiwit behouden te blijven om het replicon te laten functioneren (zie paragraaf 4.1.2). Hierbij geldt dat de grootte van de aangebrachte deletie in het C-eiwit kan leiden tot verschillende fenotypen: Er zijn C-deleties beschreven die leiden tot attenuering van de flavivirussen en/of tot het ontstaan van compenserende mutaties.^{40,41,54,64}

Wanneer de sequenties van zowel het C-eiwit als van de ectodomeinen van de envelopeiwitten zijn verwijderd, kunnen replicons niet meer verspreiden en zijn ze biologisch ingeperkt.

4.1.1 BIJ ALFAVIRUS REPLICONS KUNNEN 'VIRUS-LIKE VESICLES' (VLV's) ONTSTAAN

Bij werkzaamheden met alfavirus replicons kunnen VLV's gevormd worden. VLV's zijn afsnoeringen van het plasmamembraan ('spherules'), waar een replicatiecomplex in terecht kan komen.⁵⁵ Deze VLV's zijn infectieus wanneer de deletie in de structurele

genen gelimiteerd is tot het C-gen, en de alfavirus envelop-eiwitten (glycoproteïnen E1 en E2) intact blijven. Het ontstaan van infectieuze VLV's is veel inefficiënter dan de productie van virusdeeltjes, echter deze VLV's zijn in beperkte mate in staat andere cellen te infecteren.^{56,57}

Wanneer envelopeiwit-donorsequenties afkomstig van alfavirussen, rhabdovirussen of retrovirussen toegepast worden in een alfavirus-repliconsysteem, kunnen ook infectieuze VLV's worden gevormd. Zo is beschreven dat expressie van het G-eiwit van het Vesicular stomatitis Indiana virus (VSIV, *Vesiculovirus Indiana*, uit de familie *Rhabdoviridae*) in een SFV-repliconsysteem waaruit alle structurele genen zijn verwijderd, leidt tot de vorming van infectieuze VLV's.^{55,58} Ook is de vorming van infectieuze VLV's beschreven in SFV- en VEEV-repliconsystemen, waarbij de structurele genen vervangen zijn door het glycoproteïne van het Rabiës virus (RABV-G; *Lyssavirus rabies*).^{59,60} De expressie van het envelopeiwit van Murine leukemia virus (MLV) in het SFV-replicon leidde eveneens tot de vorming van infectieuze VLV's.⁶¹

VLV's worden niet enkel gezien als ongewenst bijproduct. In dierstudies wordt onderzoek gedaan naar de toepassing van VLV's als vaccin tegen verschillende infectieziekten.^{59,60,62,63} Door herhaald passeren van VLV's in celculturen, kunnen mutaties in de niet-structurele genen opgenomen worden die leiden tot efficiëntere productie van de VLV's.⁵⁵

4.1.2 IN DE FLAVIVIRUS C-CODERENDE SEQUENTIE LIGGEN ESSENTIËLE REPLICATIE-SIGNALLEN

In het flavivirusgenoom zijn 'cis-acting' sequenties voor RNA-replicatie aanwezig in de eerste 18 tot ongeveer 40 codons van het C-gen. Dit heeft tot gevolg dat tot ongeveer 40% van het totale C-eiwit (dat uit ongeveer 100 aminozuren bestaat in de 'mature form') behouden moet blijven om efficiënte replicatie van het replicon mogelijk te kunnen maken. Om die reden is in alle functionele flavivirus replicons nog het 5'-deel van de C-coderende sequentie aanwezig. Voor de functie van het C-eiwit in het assembleren van virusdeeltjes, is het centrale hydrofobe domein essentieel.^{64,65,66} Door het verwijderen van minimaal 50% van de C-coderende sequentie, waaronder het deel dat codeert voor het centrale hydrofobe domein, wordt het C-eiwit geïnactiveerd, maar is replicatie van het genoom nog mogelijk.

4.2 VERSPREIDING DOOR COMPLEMENTATIE EN RECOMBINATIE

4.2.1 COMPLEMENTATIE DOOR TRANSGENEN IN HET REPLICON KAN LEIDEN TOT VERSPREIDING

Replicons worden veelvuldig ingezet voor de expressie van 'vreemde' genen, zoals selectiegenen, reporter genen en, in het geval van replicon-vaccins, antigenen van pathogene micro-organismen. Vaak worden transgenen geïnsereerd op de positie van de verwijderde structurele genen. Bij alfavirus replicons kunnen transgenen ook tot

expressie worden gebracht vanaf een tweede subgenomisch mRNA, indien een tweede 26S-promoter in het genoom is gekloneerd. In het geval dat transgenen coderen voor eiwitten die de verwijderde functies van het C-eiwit of de envelopeiwitten kunnen complementeren, zou verspreiding van het replicon kunnen optreden.

4.2.2 COMPLEMENTATIE OF RECOMBINATIE MET VERWANTE VIRUSSEN KAN LEIDEN TOT VERSPREIDING

Indien verwante alfa- of flavivirussen aanwezig zijn in de cellen of proefdieren, bestaat het risico dat de uit het replicon verwijderde functies worden hersteld door complementatie of recombinatie. Dit kan leiden tot onbedoelde verspreiding van het replicon of, bij recombinatie, tot het ontstaan van RCV. Dit risico is aanwezig zowel bij werkzaamheden met naakte replicons, als met VRP's.

Recombinatie kan plaatsvinden tussen overlappende sequenties van het replicon-RNA en het genoom van de verwante virussen. Dit kan leiden tot herstel van de aangebrachte deleties, maar zou ook tot het ontstaan van 'nieuwe' virussen kunnen leiden. Zowel bij alfavirussen als bij flavivirussen is recombinatie in de natuur beschreven en heeft dit in sommige gevallen tot het ontstaan van nieuwe soorten geleid.^{67,68,69}

Daarentegen is in vaccinatiestudies recombinatie tussen wildtype flavivirussen met verzwakte vaccinstammen niet waargenomen.⁷⁰ Recombinatie kan wel geïnduceerd worden onder laboratoriumcondities. In een experimentele setting leidde recombinatie met een lage frequentie tot het ontstaan van sterk verzwakte recombinante replicatie-competente flavivirussen.⁷¹

Tussen alfavirussen kan in zeldzame gevallen ook recombinatie over niet-homologe sequenties optreden.^{72,73} Om het ontstaan van replicatie-competente virussen tijdens werkzaamheden met replicons tegen te gaan, is het van belang te werken met cellijnen waarin geen verwante (alfa- of flavi)virussen aanwezig zijn.

4.3 TIJDENS DE PRODUCTIE VAN VRP'S KAN REPLICATIE-COMPETENT VIRUS ONTSTAAN

Bij de productie van VRP's worden de structurele eiwitten, waarvan de coderende sequenties uit het replicongenoom zijn verwijderd, *in trans* aangeboden zodat het replicon-RNA wordt ingepakt. Daarbij worden infectieuze deeltjes (VRP's) gevormd, die eenmalig cellen kunnen infecteren. Wanneer er overlappende sequenties aanwezig zijn tussen het replicongenoom en de constructen voor de expressie van de structurele eiwitten, kan door recombinatie RCV ontstaan.

Met name bij de productie van alfavirus VRP's is het ontstaan van RCV een risico, omdat meestal gebruik wordt gemaakt van co-replicerende alfavirus helper-RNA-constructen, hetgeen de kans op recombinatie vergroot. In de helper-RNA's zijn minimaal de sequenties die coderen voor de niet-structurele eiwitten nsP1-4 verwijderd. Daarmee zijn ook de packaging-signalen verwijderd. In veel gevallen wordt ook de 26S-promoter uit de helper-RNA's gedeleteerd. De 5'-UTR en het 3'-UTR van het alfavirus-genoom, met daarop

de signalen nodig voor het (co-)repliseren van de helper-RNA's, blijven echter aanwezig, waardoor homologe recombinatie met het replicon-genoom niet valt uit te sluiten.

Om de kans op het vormen van RCV als gevolg van recombinatie tijdens de productie van alfavirus VRP's te minimaliseren, worden verschillende strategieën toegepast. Zo bestaan er zogenoemde 'split helper' systemen waarbij het C-gen en de genen coderend voor de glycoproteïnen op twee verschillende helper-RNA's liggen.^{13,74,75} Bij het gebruik van 'split-helper' productiesystemen in laboratoria wordt het ontstaan van RCV sterk gereduceerd, omdat meerdere recombinatie-events zouden moeten optreden.^{13,74} Door de lengte van identieke sequenties tussen het replicon-RNA en de helperconstructen te verminderen, of door hercodering van overlappende sequenties, kan de kans op homologe recombinatie verder worden ingeperkt.¹³ Ook kunnen additionele mutaties in bijvoorbeeld de structurele genen op het helperconstruct ervoor zorgen dat eventueel ontstaan RCV minder virulent zal zijn dan het uitgangsvirus.^{13,74,76} Op eenzelfde manier kan het risico van eventueel gevormd RCV verminderd worden door het gebruik van structurele genen van een minder pathogeen alfavirus, mits het geattenuerde fenotype veroorzaakt wordt door de structurele genen.⁷⁷

Bij de productie van flavivirus VRP's is de kans op het ontstaan van RCV een stuk kleiner, omdat de structurele genen niet door co-repliserende (flavivirus) helper-RNA's worden aangeboden. De verwijderde structurele genen worden *in trans* gecomplementeerd door gebruik te maken van stabiele cellijnen die de structurele eiwitten produceren, of van plasmiden die de structurele genen bij zich dragen. Ook zijn er productiesystemen waarbij de flavivirus structurele eiwitten tot expressie worden gebracht vanaf alfavirus replicon-RNA's. Voor flavivirus replicons zijn geen split-helper-systemen beschreven. Het ontstaan van RCV bij de productie van flavivirus VRP's is voor zover bekend nooit gerapporteerd.⁷⁸ Er is echter nog weinig onderzoek gedaan naar de mogelijkheid tot vorming van RCV bij flavivirus-productiesystemen.

4.4 MET EEN RCV-TEST KAN DE AANWEZIGHEID VAN REPLICATIE-COMPETENT VIRUS WORDEN GEANALYSEERD

De aan- of afwezigheid van RCV in een geproduceerde batch VRP's kan worden aangetoond door middel van een RCV-test. In de literatuur zijn maar beperkt gegevens over de uitvoering en de validatie van RCV-testen te vinden voor alfa- en flavivirus replicons.

In de beschreven assays worden de geproduceerde VRP-preparaten getest door gevoelige cellen met de VRP's te infecteren; de aan- of afwezigheid van infectieus virus (RCV) in het preparaat wordt vervolgens geanalyseerd door microscopische analyse van de cellen (het ontstaan van cytopatisch effect (cpe) of syncytia), of door een plaque assay uit te voeren op het supernatant.^{13,74,78,79,80,81} In de beschreven assays worden 1×10^8 tot 4×10^8 VRP's getest per keer.^{13,74,79,81} Validatie van de assay vindt in sommige gevallen plaats door het includeren van infectieus virus als positieve controle.^{74,81} De afwezigheid van RCV kan

ook aannemelijk gemaakt worden door te observeren of injectie van VRP's in 'suckling mice' (babymuizen) leidt tot ziekte. Zo is beschreven dat de toediening van 5×10^5 tot 5×10^7 VRP 'infectious units' (IU)) niet leidde tot ziekte^{13,78}, in tegenstelling tot het toedienen van 1 'particle forming unit' van het uitgangsvirus.⁷⁸

Soms wordt een VRP-preparaat eerst één of twee keer gepasseerd op gevoelige cellen, alvorens op RCV wordt getest. Eén of meerdere passages op gevoelige cellen verhoogt de gevoeligheid van de assay, omdat er selectie op het replicerende RCV plaatsvindt en de mogelijk storende replicatie-incompetente VRP's worden uitverdund. Door de herhaalde passages kan tegelijkertijd onderscheid gemaakt worden tussen eventueel aanwezige VLV's en infectieus virus (RCV); VLV's worden namelijk veel minder efficiënt gevormd dan virusdeeltjes.⁵⁵

5

ADVIES: ONDERZOEK MET ALFAVIRUS EN FLAVIVIRUS REPLICONS KAN OMLAAGGESCHAALD WORDEN

Mede op basis van een in opdracht van de COGEM uitgevoerd onderzoeksproject naar de bioveiligheidsaspecten van repliconsystemen, heeft de COGEM in onderhavig advies de mogelijkheid tot een generieke inschaling van werkzaamheden met naakte replicons en VRP's onderzocht.

Replicons afgeleid van virussen uit de genera *Alphavirus* en *Flavivirus* worden al lange tijd in het laboratorium en in klinische studies gebruikt, en de milieurisico's van deze replicons zijn veelvuldig onderzocht. Om die reden is de COGEM van oordeel dat een generieke omlaagschaling van deze replicons mogelijk is onder bepaalde voorwaarden. Deze worden hieronder toegelicht.

5.1 ALGEMENE VOORWAARDEN VOOR OMLAAGSCHALING VAN ALFA- EN FLAVIVIRUS REPLICONS

Als algemene voorwaarde voor de omlaagschaling van werkzaamheden met alfa- en flavivirus replicons geldt dat de gebruikte cellen vrij moeten zijn van verwante alfa- of flavivirussen om te voorkomen dat verwijderde functies in de replicons kunnen wor-

den hersteld door complementatie of recombinatie. Ook geldt dat er geen transgenen mogen worden gebruikt die de verwijderde functies kunnen complementeren. Met betrekking tot alfavirus replicons wordt hieronder ook verstaan: sequenties die coderen voor de envelopeiwitten van virussen uit de families *Togaviridae*, *Rhabdoviridae* en *Retroviridae*, vanwege de vorming van infectieuze VLV's (zie paragraaf 5.2.3).

In sommige dierlijke cellen bevinden zich endogene retrovirussen (ERV's) in het genoom. Onder bepaalde laboratoriumcondities kunnen deze ERV's, of delen van deze ERV's, geactiveerd worden. Hierbij kunnen envelopeiwitten van de ERV's tot expressie komen, die mogelijk tot complementatie van de verwijderde envelop-eiwitten van de beschreven replicons kunnen leiden. Om die reden zijn cellijnen waarvan bekend is dat functionele endogene envelopeiwitten tot expressie brengen en die tot complementatie van replicons kunnen leiden van dit generiek advies uitgesloten.^a

5.2 WERKZAAMHEDEN MET NAAKTE ALFA-EN FLAVIVIRUS REPLICONS KUNNEN WORDEN OMLAAGGESCHAALD

Naakte replicons zijn biologisch ingeperkt en kunnen zich niet verder verspreiden, omdat de essentiële genetische informatie die nodig is voor de vorming van nieuwe virusdeeltjes ontbreekt. De COGEM is daarom van oordeel dat 'naakte' replicons afgeleid van virussen uit de genera *Alphavirus* en *Flavivirus* omlaag geschaald kunnen worden, mits aan enkele voorwaarden voldaan wordt om het risico op verspreiding van het replicon of het ontstaan van replicatie-competent virus in te perken.

De COGEM maakt voor de inschaling van werkzaamheden met naakte replicons onderscheid tussen replicons waaruit de coderende sequenties van zowel het C- als de envelopeiwitten zijn verwijderd en replicons waaruit alleen het C- of alleen de envelopeiwitten-coderende sequenties zijn verwijderd.

5.2.1 INSCHALING VAN WERKZAAMHEDEN MET NAAKTE ALFAVIRUS REPLICONS

De COGEM is van oordeel dat naakte alfavirus $\Delta C/\Delta E1/\Delta E2$ -replicons waarbij de essentiële structurele eiwitten niet meer functioneel zijn, generiek ingeschaald kunnen worden op inperkingsniveau I, omdat deze replicons biologisch ingeperkt zijn en zich niet verder kunnen verspreiden. Deze omlaagschaling geldt voor replicons afgeleid van alfavirussen uit zowel pathogeniteitsklasse 2 als 3. Om in aanmerking te komen voor de omlaagschaling dienen minstens 70% van de coderende sequentie van het C-eiwit, en minimaal de sequenties die coderen voor beide ectodomeinen van de E1- en E2-eiwitten verwijderd te zijn.

Bij werkzaamheden met alfavirus replicons waarin alleen het C-eiwit is geïnactiveerd door deletie van (een groot deel van) de C-coderende sequentie, ΔC -replicons, kunnen

^a De COGEM laat momenteel een literatuuronderzoek uitvoeren naar de aanwezige wetenschappelijke kennis over ERV's in menselijke en dierlijke cellen, teneinde meer inzicht te krijgen in mogelijke risico's voor mens en milieu die verbonden zijn aan de aanwezigheid, of het gebruik van deze endogene virale sequenties bij ggo-werkzaamheden.

infectieuze VLV's gevormd worden door de aanwezigheid van de genen die coderen voor de envelopeiwitten. Alfavirus Δ C-replicons zijn om die reden uitgesloten van dit generieke advies.

Alfavirus Δ E1/ Δ E2-replicons waarbij beide envelop-eiwitten niet meer functioneel zijn, zijn biologisch ingeperkt en kunnen niet verspreiden. Het replicon-RNA kan nog wel worden ingepakt in de C-eiwitten, echter door afwezigheid van functionele envelop-eiwitten is verspreiding naar andere cellen niet mogelijk.

Gezien de snelheid van de ontwikkelingen in het veld, en de daaruit voortkomende mogelijk nieuwe en onbekende constructen die voor het lanceren van alfavirus replicons gebruikt kunnen worden, adviseert de COGEM om werkzaamheden met Δ E1/ Δ E2-replicons vooralsnog één niveau lager in te schalen dan het niveau van het uitgangsvirus. Zo kunnen werkzaamheden met naakte Δ E1/ Δ E2-replicons afgeleid van alfavirussen uit pathogeniteitsklasse 3 uitgevoerd worden op ML-II, en werkzaamheden met replicons afgeleid van alfavirussen uit pathogeniteitsklasse 2 op ML-I. Om voor omlaagschaling van deze replicons in aanmerking te komen, geldt dat minimaal de sequenties die coderen voor beide ectodomeinen van de E1- en E2-eiwitten verwijderd dienen te zijn.

5.2.2 INSCHALING VAN WERKZAAMHEDEN MET NAAKTE FLAVIVIRUS REPLICONS

De COGEM is van oordeel dat naakte Δ C/ Δ (pr)M/ Δ E-replicons generiek ingeschaald kunnen worden op inperkingsniveau I. Deze replicons zijn biologisch ingeperkt en kunnen zich niet verder verspreiden, omdat de essentiële genetische informatie die nodig is voor de vorming van nieuwe virusdeeltjes ontbreekt. Deze omlaagschaling geldt voor replicons afgeleid van flavivirussen uit zowel pathogeniteitsklasse 2 als 3. Om voor omlaagschaling in aanmerking te komen dienen de flavivirus Δ C/ Δ (pr)M/ Δ E-replicons aan de volgende voorwaarden te voldoen:

- i. Alleen de C-sequenties die essentieel zijn voor replicatie van het replicon mogen behouden blijven, waarbij minstens 50% van de coderende sequentie verwijderd is, inclusief het centrale hydrofobe domein;
- ii. Tevens dienen minimaal de sequenties die coderen voor de ectodomeinen van de (pr)M- en E-eiwitten verwijderd zijn.

Met betrekking tot flavivirus Δ C-replicons, heeft de COGEM eerder opgemerkt (paragraaf 4.1), dat kleine tot middelgrote deleties in het C-eiwit van flavivirussen tot verschillende fenotypen kunnen leiden. Afhankelijk van de positie en de grootte van de deleties, kan (geattenuerd) virus gevormd worden, of kunnen compenserende mutaties ontstaan op andere posities in het C-gen. Deze mutaties kunnen de hydrofobe eigenschap van het eiwit herstellen, waarna eveneens infectieuze virusdeeltjes worden gevormd.^{40,54,64} Bij grotere deleties zal er geen verdere verspreiding van het replicon plaatsvinden.^{41,54}

Vanwege de aanwezigheid van replicatie-signalen in de coderende sequentie van het C-eiwit, is het niet mogelijk het gehele gen te verwijderen. Er zijn tal van verschillende replicon-constructen mogelijk met variaties in deleties in het C-eiwit. Op voorhand is

niet te voorspellen of er nog deeltjes gevormd kunnen worden, onder meer omdat vergelijkbare deleties bij verschillende flavivirussen kunnen leiden tot andere fenotypen. Om die reden is de COGEM van oordeel dat werkzaamheden met flavivirus Δ C-replicons vooralsnog casusgewijs dienen te worden beoordeeld en ingeschaald.

Δ (pr)M/ Δ E-replicons zijn biologisch ingeperkt als de ectodomeinen van de envelopeiwitten zijn verwijderd, en kunnen niet verder verspreiden. Het replicon-RNA kan nog wel worden ingepakt in de C-eiwitten, echter door afwezigheid van functionele envelop-eiwitten is verspreiding naar andere cellen niet mogelijk. Gezien de snelle ontwikkelingen in het veld en de daaruit voortkomende mogelijk nieuwe en onbekende constructen die nog ontwikkeld gaan worden, adviseert de COGEM om werkzaamheden met Δ (pr)M/ Δ E-replicons vooralsnog (generiek) één niveau lager in te schalen dan het niveau van het uitgangsvirus. Zo kunnen werkzaamheden met naakte Δ (pr)M/ Δ E-replicons afgeleid van flavivirussen uit pathogeniteitsklasse 3 uitgevoerd worden op ML-II, en werkzaamheden met replicons afgeleid van flavivirussen uit pathogeniteitsklasse 2 op ML-I. Om voor omlaagschaling in aanmerking te komen, dienen minimaal de sequenties die coderen voor de ectodomeinen van de (pr)M- en E-eiwitten verwijderd te zijn.

5.2.3 WERKZAAMHEDEN MET ALFAVIRUS INFECTIEUZE VLV's DIENEN CASUSGEWIJS BEOORDEELD TE WORDEN

Bij sommige werkzaamheden met alfavirus replicons kunnen infectieuze VLV's gevormd worden. Dit is het geval als het C-eiwit afwezig is, maar de envelopeiwitten nog wel tot expressie komen (zie paragraaf 5.2.1). Ook kunnen infectieuze VLV's ontstaan als er complementatie plaatsvindt door de aanwezigheid van envelopeiwitten van virussen uit de families *Togaviridae*, *Rhabdoviridae* en *Retroviridae*. VLV's zijn minder stabiel en de pathogeniteit is beperkt, maar ze zijn nog wel infectieus. Wanneer ze herhaald gepasseerd worden in celkweken, kan geselecteerd worden op mutaties die leiden tot efficiëntere productie van de VLV's.⁵⁵

De COGEM is van oordeel dat nader onderzoek en meer gegevens nodig zijn om werkzaamheden met replicons die kunnen leiden tot de vorming van infectieuze VLV's, generiek omlaag te kunnen schalen. Dat betekent onder andere dat er extra voorwaarden moeten worden gesteld aan de te gebruiken transgenen indien gewerkt wordt met replicons afgeleid van alfavirussen: werkzaamheden met alfavirus replicons met transgenen die coderen voor envelopeiwitten van virussen uit de families *Togaviridae*, *Rhabdoviridae* en *Retroviridae* dienen casusgewijs ingeschaald te worden (zie paragraaf 5.1).

5.3 OMLAAGSCHALING VAN WERKZAAMHEDEN MET ALFA- EN FLAVIVIRUS VRP's

Omdat tijdens de productie van VRP's sequenties die coderen voor de uit het replicon verwijderde structurele genen, *in trans* worden aangeboden, is er een risico op het ontstaan van RCV door recombinatie. RCV is infectieus en kan dezelfde of vergelijkbare eigenschappen hebben als het uitgangsvirus. Daarom dienen werkzaamheden met alfa-

of flavivirus VRP-preparaten waarin zich ook RCV bevindt of waarin zich RCV kan bevinden, uitgevoerd te worden op het niveau van inschaling van het uitgangsvirus.

5.3.1 ALFAVIRUS VRP's GEPRODUCEERD MET SPLIT-HELPER SYSTEMEN KUNNEN WORDEN OMLAAGGESCHAALD

Bij de productie van alfavirus VRP's is het ontstaan van RCV een risico. Om de kans op het ontstaan van RCV te reduceren, zijn er split-helper productiesystemen ontwikkeld, waarbij het C-gen en de envelop-genen gescheiden worden aangeboden via verschillende helper-RNA's. Aangezien er sequentiehomologie bestaat in de 5'- en 3'-UTRs van de drie co-replicerende RNA's (het replicon-RNA en de twee helper-RNA's), is recombinatie niet geheel uitgesloten. Door scheiding van de C- en envelopsequenties op de verschillende helper-RNA's, zijn er echter twee onafhankelijke recombinatie-events nodig voor het ontstaan van RCV. Door het aanbrengen van additionele mutaties in de helper-constructen, kan eventueel ontstaan RCV verder geattenuëerd worden. Hoewel deze mutaties de recombinatie-events niet geheel kunnen voorkomen, maken deze mutaties het VRP-productiesysteem veiliger.

In een aantal publicaties over split-helper systemen is beschreven dat er getest is op het ontstaan van RCV bij de productie van de alfavirus VRP's. Bij systemen waarbij de C- en de envelopsequenties strikt gescheiden op beide helpers aanwezig zijn, is nooit RCV aangetoond.^{13,74,75} Van een op VEEV-TC83 gebaseerd split-helper systeem waarover de COGEM heeft geadviseerd, zijn 2.060 batches getest op de aanwezigheid van RCV, waarbij in geen van de assays RCV werd gedetecteerd.⁸¹ Opgemerkt dient te worden dat bij een aantal van deze split-helper systemen één of meerdere additionele mutaties in de structurele genen zijn aangebracht om de productiesystemen veiliger te maken.^{13,74,81} Deze mutaties hebben geen invloed op de recombinatie-events, maar verzwakken of inactiveren een eventueel RCV dat na recombinatie kan ontstaan.⁷⁴

Indien de C- en de envelopsequenties niet strikt gescheiden op beide helper-RNA's liggen, kan in een incidenteel geval RCV ontstaan. Dit is bijvoorbeeld waargenomen bij het inpakken van een SIV-replicon met een split-helper systeem waarbij het envelop-helper-construct ook een deel van het C-gen van een verwant alfavirus bevatte.⁸²

De COGEM adviseert om werkzaamheden met alfavirus VRP's die zijn geproduceerd met een split-helper systeem, één niveau lager in te schalen dan het niveau van het uitgangsvirus. Zo kunnen werkzaamheden met VRP's afgeleid van alfavirussen uit pathogeniteitsklasse 3 uitgevoerd worden op ML-II, en werkzaamheden met replicons afgeleid van alfavirussen uit pathogeniteitsklasse 2 op ML-I. Daarbij gelden de volgende voorwaarden:

- Om recombinatie over overlappende sequenties tegen te gaan, dienen de sequenties coderend voor C, E1 en E2 volledig uit het replicon-genoom verwijderd te zijn;
- De VRP's dienen geproduceerd te worden met een split-helper-systeem waarbij er een strikte scheiding is van C- en de envelop-coderende sequenties op twee onafhankelijke helper-RNA's, waarbij geen onderling overlappende sequenties tussen de C- en envelopsequenties aanwezig zijn;

- Elk alfavirus split-helper productiesysteem dient tenminste één keer getest te worden in een RCV-test (zie paragraaf 5.4), waarbij geen RCV wordt aangetoond.

Met betrekking tot het hierboven vermelde split-helper systeem afgeleid van VEEV-TC83 waarover de COGEM eerder heeft geadviseerd^{81,83}, merkt de COGEM op dat het eerdere advies van kracht blijft en er geen RCV-test noodzakelijk is voor het uitvoeren van werkzaamheden op ML-I.

5.3.2 FLAVIVIRUS VRP's KUNNEN WORDEN OMLAAGGESCHAALD

De kans op het ontstaan van RCV door recombinatie over overlappende sequenties wordt bij de productie van flavivirus VRP's kleiner geacht dan bij alfavirus VRP's.⁸⁴ In twee studies is het ontstaan van RCV bij de productie van flavivirus VRP's bestudeerd, waarbij het replicon-RNA in packaging-cellijnen werd gebracht, die de structurele eiwitten tot expressie brengen. Bij beide studies werd geen RCV waargenomen na herhaaldelijk passeren in gevoelige cellen, ondanks de aanwezigheid van overlappende sequenties tussen het replicon-RNA en de mRNA's uit de packaging cellijn.^{78,84} Bij een productiesysteem waarbij de structurele genen via een alfavirus replicon werden aangeboden, werd eveneens geen recombinatie gezien.^{78,85} In dit systeem werden de C- en de (pr)M/E-sequenties gescheiden, vanaf verschillende 26S-promoters tot expressie gebracht.

De COGEM is van oordeel dat werkzaamheden met VRP's waarbij het $\Delta C/\Delta(\text{pr})M/\Delta E$ flavivirus replicon als RNA-molecuul wordt aangeboden, één niveau lager ingeschaald kunnen worden dan de pathogeniteitsklasse van het uitgangsvirus. De structurele eiwitten C, (pr)M en E kunnen via plasmiden, een alfavirus (naakt) replicon of in een stabiele cellijn tot expressie gebracht worden. Naast de algemene voorwaarden (paragraaf 5.1), gelden nog de volgende aanvullende voorwaarden:

- Om recombinatie over overlappende sequenties tegen te gaan, dienen de sequenties coderend voor de structurele genen zoveel als mogelijk uit het replicongenoom verwijderd te zijn. Dat betekent dat alleen C-sequenties behouden mogen blijven die essentieel zijn voor replicatie van het replicon, waarbij minstens 50% van de coderende sequentie verwijderd is, inclusief het centrale hydrofobe domein. De sequenties die coderen voor de (pr)M en E-eiwitten dienen volledig verwijderd zijn;
- Elk flavivirus-productiesysteem dient tenminste één keer getest te worden in een RCV-test (zie paragraaf 5.4), waarbij geen RCV is aangetoond.

De COGEM merkt op dat bij gebruik van een 'DNA-launched' repliconsysteem (DREP), waarbij co-transfectie van twee DNA plasmiden plaatsvindt om het replicon-RNA en de complementerende structurele eiwitten tot expressie te brengen, recombinatie tussen de plasmiden kan optreden. De deleties die aangebracht worden in het C-gen en de (pr)M- en E-genen van het replicon betreffen gedeeltelijke deleties, waardoor er overlappende sequenties aanwezig zijn tussen het replicon-plasmide en het helper-plasmide, die de volledige coderende sequentie van C-prM-E bevat. De kans dat bij een dergelijk productiesysteem recombinatie optreedt, is zeer waarschijnlijk. Derhalve is

de COGEM van oordeel dat een 'DNA-launched' flavivirus repliconsysteem in combinatie met helper-plasmiden uitgesloten is van het generieke advies, en zullen dergelijke aanvragen casusgewijs beoordeeld moeten worden.

5.4 VOORWAARDEN MET BETREKKING TOT DE RCV-TEST

De COGEM stelt als voorwaarde voor omlaagschaling van de werkzaamheden met alfa-flavivirus VRP's, dat in een geproduceerde VRP-preparaat de afwezigheid van RCV in een RCV-test wordt aangetoond (paragraaf 5.3.1 en 5.3.2). In de literatuur zijn verschillende methoden beschreven waarop een RCV-test kan worden uitgevoerd, waarbij een VRP-preparaat in veel gevallen een aantal keren gepasseerd wordt op gevoelige cellen voordat het getest wordt. Door het passeren wordt eventueel aanwezig RCV geselecteerd en zullen de replicatie-incompetente VRP's worden uitverdund. Ook bij één- of tweemaal passeren kan daarbij een grote gevoeligheid behaald worden, waarbij een enkel RCV in een preparaat van 1×10^8 tot 4×10^8 VRP's kan worden aangetoond.^{13,74,79,81}

De COGEM is van oordeel dat indien de RCV-test aan de volgende voorwaarden voldoet, de gevoeligheid voldoende is om eventueel aanwezig RCV in een preparaat aan te kunnen tonen:

- Het geproduceerde VRP-preparaat moet minimaal drie keer gepasseerd worden op gevoelige cellen. Het is niet nodig om het wildtype uitgangsvirus mee te nemen als positieve controle in de RCV-assay, aangezien voldoende gevoeligheid bereikt kan worden met het drie maal passeren op gevoelige cellen^b;
- Afhankelijk van de eigenschappen van het uitgangsvirus, kan RCV worden aangetoond door middel van een gevalideerde qPCR-test, of door gebruik te maken van microscopische analyse (cpe, syncytia-vorming), plaque assay, of antilichaamkleuring.

5.5 CONCLUSIE EN SAMENVATTING

Samenvattend is de COGEM van oordeel dat een generieke omlaagschaling van werkzaamheden met naakte replicons en VRP's afgeleid van virussen uit het genus *Alphavirus* of *Flavivirus* mogelijk is. Daarbij heeft zij een aantal voorwaarden opgesteld om het risico op verspreiding van het replicon of het ontstaan van replicatie-competent virus in te perken. Wanneer bij werkzaamheden met naakte replicons en VRP's afgeleid van virussen uit het genus *Alphavirus* of *Flavivirus* aan de eerdergenoemde voorwaarden voldaan wordt, acht de COGEM de milieurisico's van het uitvoeren van de werkzaamheden op de aangegeven inperkingsniveaus verwaarloosbaar klein. In tabel 1 en 2 wordt het advies van de COGEM met betrekking tot de inschaling van werkzaamheden met replicons afgeleid van virussen uit het genus *Alphavirus* en *Flavivirus*, samengevat.

^b Het valideren van de RCV-test en het bepalen van de detectiegrens is alleen mogelijk indien het uitgangsvirus als positieve controle wordt meegenomen. Validatie van de RCV-test zal moeten worden uitgevoerd op het inperkingsniveau van het uitgangsvirus.

Tabel 1. Inschaling van werkzaamheden met alfavirus replicons

Alfavirus	Deletie	Inschaling	Aanvullende voorwaarden*
Naakte replicons	$\Delta C, \Delta E1, \Delta E2$	ML-I	<ul style="list-style-type: none"> • Deletie van minimaal 70% van C en minimaal de ectodomeinen van E1 en E2
	$\Delta E1, \Delta E2$	1 niveau lager dan niveau uitgangsvirus	<ul style="list-style-type: none"> • Deletie van minimaal de ectodomeinen van E1 en E2
VRP's	$\Delta C, \Delta E1, \Delta E2$ (productie met split helper)**	1 niveau lager dan niveau uitgangsvirus	<ul style="list-style-type: none"> • Volledige deletie van C, E1 en E2 uit het replicongenoem, vanwege mogelijke recombinitie; • De C- en envelop-coderende sequenties dienen strikt gescheiden te zijn op de helper-RNA's, waarbij geen onderlinge overlappende sequenties aanwezig zijn; • Elk productiesysteem dient tenminste één keer getest te zijn in een RCV-test, waarbij RCV niet is aangetoond

* Naast de twee eerdergenoemde algemene voorwaarden onder paragraaf 5.1: de gebruikte cellen zijn vrij van verwante alfavirussen, en de gebruikte transgenen mogen de verwijderde functies niet complementeren (daaronder vallen ook sequenties die coderen voor de envelopeiwitten van virussen uit de families *Togaviridae*, *Rhabdoviridae* en *Retroviridae*)

** Productiesystemen waarbij geen gebruik wordt gemaakt van split-helpers dienen casusgewijs beoordeeld te worden en vallen buiten de scope van dit generieke advies

Tabel 2. Inschaling van werkzaamheden met flavivirus replicons

Flavivirus	Deletie	Inschaling	Aanvullende voorwaarden*
Naakte replicons	$\Delta C, \Delta(\text{pr})M, \Delta E$	ML-I	<ul style="list-style-type: none"> • Alleen C-sequenties die essentieel zijn voor replicatie van het replicon blijven behouden, waarbij minstens 50% van de coderende sequentie verwijderd is, inclusief het centrale hydrofobe domein • Deletie van minimaal de ectodomeinen van (pr)M en E
	$\Delta(\text{pr})M, \Delta E$	1 niveau lager dan niveau uitgangsvirus	<ul style="list-style-type: none"> • Deletie van minimaal de ectodomeinen van (pr)M en E
VRP's	$\Delta C, \Delta(\text{pr})M, \Delta E^{**}$	1 niveau lager dan niveau uitgangsvirus	<ul style="list-style-type: none"> • Alleen C-sequenties die essentieel zijn voor replicatie van het replicon blijven behouden in het replicongenoem, waarbij minstens 50% van de coderende sequentie verwijderd is, inclusief het centrale hydrofobe domein • Volledige deletie van (pr)M en E uit het replicongenoem • Elk productiesysteem dient tenminste één keer getest te zijn in een RCV-test, waarbij RCV niet is aangetoond

* Naast de twee eerder genoemde algemene voorwaarden onder paragraaf 5.1: de gebruikte cellen zijn vrij van verwante flavivirussen, en de gebruikte transgenen mogen de verwijderde functies niet complementeren

** Productiesystemen waarbij gebruik wordt gemaakt van een 'DNA-launched' flavivirus replicon in combinatie met helper-plasmiden, dienen casusgewijs beoordeeld te worden en vallen buiten de scope van dit generieke advies

6

SIGNALERENDE OPMERKING

Alfa- en flavivirus VRP's zijn biologisch ingeperkt en zullen niet verder verspreiden. De VRP's zijn in staat tot een eenmalige infectieronde bij laboratoriummedewerkers, waarbij mogelijk nadelige effecten kunnen optreden van de gebruikte transgenen. De COGEM signaleert derhalve dat vanuit Arbo-overwegingen eventueel aanvullende maatregelen, die toegesneden zijn op de specifieke besmettingsroute van het gebruikte uitgangsvirus, genomen moeten worden bij werkzaamheden met VRP's om besmetting van de medewerker te voorkomen.

REFERENTIES

1. Low JG *et al.* (2022). Low, J.G., de Alwis, R., Chen, S. *et al.* A phase I/II randomized, double-blinded, placebo-controlled trial of a self-amplifying Covid-19 mRNA vaccine. *npj Vaccines* 7: 161
2. Arcturus therapeutics. Arcturus Announces Self-amplifying COVID-19 mRNA Vaccine Candidate ARCT-154 Meets Primary Efficacy Endpoint in Phase 3 Study. <https://ir.arcturusrx.com/news-releases/news-release-details/arcturus-announces-self-amplifying-covid-19-mrna-vaccine> (bezoekt 16 december 2022)
3. Ong, EZ *et al.* (2022). Immune gene expression analysis indicates the potential of a self-amplifying Covid-19 mRNA vaccine. *npj Vaccines* 7: 154
4. Elliott T *et al.* (2022). Enhanced immune responses following heterologous vaccination with self-amplifying RNA and mRNA COVID-19 vaccines. *PLoS Pathog* 18: e1010885
5. Pollock KM *et al.* (2022). Safety and immunogenicity of a self-amplifying RNA vaccine against COVID-19: COVAC1, a phase I, dose-ranging trial. *eClinicalMedicine* 44: 101262 <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2021.101262>
6. Vogel AB *et al.* (2018). Self-Amplifying RNA Vaccines Give Equivalent Protection against Influenza to mRNA Vaccines but at Much Lower Doses. *Mol. Ther.* 26: 446-455
7. Yingzhong L *et al.* (2019). In vitro evolution of enhanced RNA replicons for immunotherapy. *Sci. Rep.* 9: 6932
8. Lundstrom K (2021). Self-replicating RNA viruses for vaccine development against infectious diseases and cancer. *Vaccines* 9: 1187
9. Hannemann H (2020). Viral replicons as valuable tools for drug discovery. *Drug Discov. Today.* 25: 1026–1033
10. Xiong C *et al.* (1989). Sindbis virus: an efficient, broad host range vector for gene expression in animal cells. *Science.* 243: 1188-1191
11. Bredenbeek PJ *et al.* (1993). Sindbis virus expression vectors: packaging of RNA replicons by using defective helper RNAs. *J. Virol.* 67: 6439-6446
12. Khromykh AA & Westaway EG (1997). Subgenomic replicons of the flavivirus Kunjin: construction and applications. *J. Virol.* 71:1497-505
13. Pushko P *et al.* (1997). Replicon-helper systems from attenuated Venezuelan equine encephalitis virus: expression of heterologous genes in vitro and immunization against heterologous pathogens in vivo. *Virology* 239: 389-401
14. Liljeström P & Garoff H. (1991). A new generation of animal cell expression vectors based on the Semliki Forest virus replicon. *Biotechnology (N Y).* 9: 1356-1361
15. Pang X *et al.* (2001). Development of Dengue virus type 2 replicons capable of prolonged expression in host cells. *BMC Microbiol.* 1: 18
16. Gherke R *et al.* (2003). Incorporation of tick-borne encephalitis virus replicons into virus-like particles by a packaging cell line. *J. Virol.* 77: 8924–8933
17. Komdeur FL *et al.* (2021). First-in-human phase I clinical Trial of an SFV-based RNA replicon cancer vaccine against HPV-induced cancers. *Mol. Ther.* 29: 611-625
18. Lundstrom K. (2018). Self-replicating RNA Viruses for RNA therapeutics. *Molecules.* 23: 3310 doi:10.3390/molecules23123310
19. Blakney AK *et al.* (2021). An update on Self-amplifying mRNA vaccine development. *Vaccines (Basel).* 9: 97. doi:10.3390/vaccines9020097

20. Griffin DE (2013). Alphaviruses. In: Fields Virology, 6th edition. Edited by Knipe DM & Howley PM, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
21. International Committee on Taxonomy of Viruses. Togaviridae. <https://ictv.global/report/chapter/togaviridae/togaviridae> (bezocht: 16 december 2022)
22. Pietilä MK *et al.* (2017). Alphavirus polymerase and RNA replication. *Virus Res.* 234: 44-57
23. Rupp JC *et al.* (2015). Alphavirus RNA synthesis and non-structural protein functions. *J. Gen. Virol.* 96: 2483–2500
24. Firth AE *et al.* (2008). Discovery of frameshifting in Alphavirus 6K resolves a 20-year enigma. *Viol J.* 5:108. doi: 10.1186/1743-422X-5-108
25. Jose J *et al.* (2009). A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. *Future Microbiol.* 4: 837–856
26. Elmasri Z *et al.* (2021). Alphavirus-induced membrane rearrangements during replication, assembly, and budding. *Pathogens* 10: 984. <https://doi.org/10.3390/pathogens10080984>
27. Lundstrom K (2020). Self-amplifying RNA viruses as RNA vaccines. *Int. J. Mol. Sci.* 21: 5130
28. Polo JM *et al.* (1999). Stable alphavirus packaging cell lines for Sindbis virus and Semliki Forest virus-derived vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96: 4598-4603
29. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Genus Flavivirus. <https://ictv.global/report/chapter/togaviridae/togaviridae> (bezocht: 16 december 2022)
30. Oliveira ERA *et al.* (2017). The flavivirus capsid protein: Structure, function and perspectives towards drug design. *Virus Res.* 227: 115-123
31. Laureti M *et al.* (2018). Flavivirus receptors: diversity, identity, and cell entry. *Front. Immunol.* 9: 2180
32. Pierson TC & Diamond MS (2013). Ch. 26. Flaviviruses. In: Fields Virology. Edited by Knipe DM & Howley PM. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
33. Matsuda M *et al.* (2018). High-throughput neutralization assay for multiple flaviviruses based on single-round infectious particles using dengue virus type 1 reporter replicon. *Sci. Rep.* 8: 16624
34. Simmonds P *et al.* (2012). Part II – The positive sense single stranded RNA viruses: Genus Flavivirus. In: Virus Taxonomy, ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. Ed. King AMQ *et al.*, Elsevier Academic Press, Amsterdam
35. Lindenbach BD *et al.* (2013). Ch. 25. Flaviviridae. In: Fields Virology. Edited by Knipe DM & Howley PM. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
36. Ng WC *et al.* (2017). The 5' and 3' untranslated regions of the flaviviral genome. *Viruses* 9: 137. doi: 10.3390/v9060137
37. Corver J *et al.* (2003). Fine mapping of a cis-acting sequence element in yellow fever virus RNA that is required for RNA replication and cyclization. *J. Virol.* 77: 2265–2270
38. Jones CT *et al.* (2005). Construction and applications of yellow fever virus replicons. *Virology* 331:247–259
39. Falgout, B *et al.* (1989). Proper processing of dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 requires the N-terminal hydrophobic signal sequence and the downstream nonstructural protein NS2a. *J. Virol.* 63: 1852-1860.
40. Kofler RM *et al.* (2004). Mimicking live flavivirus immunization with a noninfectious RNA vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101: 1951-1956
41. He Y *et al.* (2020). The role of capsid in the flaviviral life cycle and perspectives for vaccine development. *Vaccine* 38: 6872-6881
42. Li SH *et al.* (2013). Development and characterization of the replicon system of Japanese encephalitis live vaccine virus SA14-14-2. *Viol. J.* 10: 64
43. Gehrke R *et al.* (2005). Heterologous gene expression by infectious and replicon vectors derived from tick-borne encephalitis virus and direct comparison of this flavivirus system with an alphavirus replicon. *J. Gen. Virol.* 86: 1045-1053
44. Leardkamolkarn V & Sirigulpanit W (2012). Establishment of a stable cell line coexpressing dengue virus-2 and green fluorescent protein for screening of antiviral compounds. *J. Biomol. Screen.* 17: 283-292
45. Ryan MD & Drew J (1994). Foot-and-mouth disease virus 2A oligopeptide mediated cleavage of an artificial polyprotein. *EMBO J.* 13: 928-933
46. Xie X *et al.* (2016). Zika virus replicons for drug discovery. *EBioMedicine* 12: 156-160
47. Patkar CG *et al.* (2009). Identification of inhibitors of yellow fever virus replication using a replicon-based high-throughput assay. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53: 4103-4114
48. Jones CT *et al.* (2005). Construction and applications of yellow fever virus replicons. *Virology* 331: 247-259
49. Pijlman GP *et al.* (2006). Kunjin virus replicons: an RNA-based, non-cytopathic viral vector system for protein production, vaccine and gene therapy applications. *Expert Opin. Biol. Ther.* 6: 135-145
50. Mendes A & Kuhn RJ (2018). Alphavirus nucleocapsid packaging and assembly. *Viruses.* 10: 138
51. Barnard TR *et al.* (2021). Molecular determinants of Flavivirus virion assembly. *Trends Biochem. Sci.* 46: 378-390
52. Holmes AC *et al.* (2020). A molecular understanding of alphavirus entry. *PLoS Pathog.* 16: e1008876
53. Stiasny K *et al.* (2022). Impact of structural dynamics on biological functions of flaviviruses. *FEBS J. Mar 5.* doi: 10.1111/febs.16419
54. Roby, JA *et al.* (2011). Nucleic Acid-Based Infectious and Pseudo-Infectious Flavivirus Vaccines. In: Replicating Vaccines. Birkhäuser Advances in Infectious Diseases. Edited by Dormitzer P *et al.* Springer, Basel.

55. Rose NF *et al.* (2014). In vitro evolution of high-titer, virus-like vesicles containing a single structural protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 111: 16866–16871
56. Ruiz-Guillen, M *et al.* (2016). Capsid-deficient alphaviruses generate propagative infectious microvesicles at the plasma membrane. *Cell Mol. Life Sci.* 73: 3897-3916
57. Jia, F *et al.* (2017). Pseudo-typed Semliki Forest virus delivers EGFP into neurons. *J. Neurovirol.* 23: 205–215
58. Rolls MM *et al.* (1994). Novel infectious particles generated by expression of the vesicular stomatitis virus glycoprotein from a self-replicating RNA. *Cell* 79: 497-506
59. Zhang C *et al.* (2021). Virus-like vesicles based on Semliki forest virus-containing rabies virus glycoprotein make a safe and efficacious rabies vaccine candidate in a mouse model. *J. Virol* 95: e0079021
60. Zhang YN *et al.* (2020). A novel rabies vaccine based on infectious propagating particles derived from hybrid VEEV-Rabies replicon. *EBioMedicine* 56: 102819
61. Lebedeva I *et al.* (1997). Infectious particles derived from Semliki Forest virus vectors encoding murine leukemia virus envelopes. *J. Virol.* 71: 7061–7067
62. Schell JB *et al.* (2011). Significant protection against high-dose simian immunodeficiency virus challenge conferred by a new prime-boost vaccine regimen. *J. Virol.* 85: 5764–5772
63. Rose NF *et al.* (2008). Hybrid alphavirus-rhabdovirus propagating replicon particles are versatile and potent vaccine vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105: 5839-5843
64. Kofler RM *et al.* (2003). Spontaneous mutations restore the viability of tick-borne encephalitis virus mutants with large deletions in protein C. *J. Virol.* 77: 443-451
65. He Y *et al.* (2021). Replication/assembly defective avian flavivirus with internal deletions in the capsid can be used as an approach for living attenuated vaccine. *Front Immunol.* 12: 694959
66. Patkar CG *et al.* (2007). Functional requirements of the yellow fever virus capsid protein. *J Virol.* 81:6471-6481
67. Twiddy SS & Holmes EC (2003). The extent of homologous recombination in members of the genus *Flavivirus*. *J. Gen. Virol.* 84: 429-440
68. Bertrand Y *et al.* (2012). First dating of a recombination event in mammalian tick-borne flaviviruses. *PLoS One* 7: e31981
69. Hahn CS *et al.* (1988). Western equine encephalitis virus is a recombinant virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 5997-6001
70. Monath TM *et al.* (2005). Recombination and flavivirus vaccines: a commentary. *Vaccine* 23: 2956-2958
71. Taucher C *et al.* (2010). A trans-complementing recombination trap demonstrates a low propensity of flaviviruses for intermolecular recombination. *J. Virol.* 84: 599-611
72. Weiss BG & Schlesinger S (1991). Recombination between Sindbis virus RNAs. *J. Virol.* 65: 4017-4025
73. McGee CE *et al.* (2011). Stability of yellow fever virus under recombinatory pressure as compared with chikungunya virus. *PLoS One.* 6: e23247
74. Smerdou C & Liljeström P (1999). Two-helper RNA system for production of recombinant Semliki forest virus particles. *J. Virol.* 73: 1092-1098
75. Frolov I *et al.* (1997). Sindbis virus replicons and Sindbis virus: assembly of chimeras and of particles deficient in virus RNA. *J. Virol.* 71: 2819-2829
76. Davis NL *et al.* (2000). Vaccination of macaques against pathogenic simian immunodeficiency virus with Venezuelan equine encephalitis virus replicon particles. *J. Virol.* 74: 371-378
77. Perri S *et al.* (2003). An alphavirus replicon particle chimera derived from Venezuelan equine encephalitis and sindbis viruses is a potent gene-based vaccine delivery vector. *J. Virol.* 77: 10394-10403
78. Harvey TJ *et al.* (2004). Tetracycline-inducible packaging cell line for production of flavivirus replicon particles. *J. Virol.* 78: 531-538
79. Jorritsma-Smit A *et al.* (2020). GMP manufacturing of Vvax001, a therapeutic anti-HPV vaccine based on recombinant viral particles. *Eur. J. Pharm. Sci.* 143: 105096
80. Kamrud KI *et al.* (2007). Alphavirus replicon approach to promoterless analysis of IRES elements. *Virology* 360: 376-387
81. COGEM (2017). Omlaagschaling van in vivo en in vitro werkzaamheden met Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV) replicons. COGEM advies CGM/170224-01
82. Hyvärinen A *et al.* (2013). Recombination of replicon and helper RNAs and the emergence of propagation-competent vectors upon Sindbis virus vector production. *Int. J. Mol. Med.* 32: 410-422
83. COGEM (2017). Vervolgadviesvraag VEEV replicons en noodzaak RCV test. COGEM-advies CGM/170322
84. Gehrke R *et al.* (2003). Incorporation of tick-borne encephalitis virus replicons into virus-like particles by a packaging cell line. *J. Virol.* 77: 8924-33
85. Khromykh, AA *et al.* (1998). Encapsidation of the flavivirus Kunjin replicon RNA by using a complementation system providing Kunjin virus structural proteins in trans. *J. Virol.* 72: 5967-5977



Colofon

Ontwerp: Avant la lettre, Utrecht

© COGEM 2022

Delen uit deze publicatie mogen voor niet-commerciële doeleinden worden overgenomen op voorwaarde van bronvermelding: Commissie Genetische Modificatie (COGEM), 2020. Generieke omlaagschaling van werkzaamheden met virale replicons afgeleid van alfavirussen en flavivirussen. COGEM advies CGM/221223-01

De COGEM heeft tot taak de regering te adviseren over de risicoaspecten van genetisch gemodificeerde organismen en te signaleren over ethische en maatschappelijke aspecten van genetische modificatie (Wet milieubeheer §2.3).