

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Waterstaat
Mr. drs. A.W.H. Bertram
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 27 juli 2026
KENMERK CGM/260727-01
ONDERWERP Advies Inschaling werkzaamheden met VEEV-replicons met HCV-E1E2-transgen

Geachte mevrouw Bertram,

Naar aanleiding van een adviesvraag getiteld 'Biomedisch onderzoek op het Stichting Amsterdam UMC' (IG 17-209_003), waarbij wordt verzocht om werkzaamheden met Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV) toe te voegen aan een eerder afgegeven vergunning (GGO IG 15-226_lk), deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van experimenten met replicons afgeleid van het Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV). In de replicons zijn enkele VEEV-genen verwijderd, zodat zij zich niet verder kunnen verspreiden. In plaats daarvan is een transgen opgenomen dat codeert voor het hepatitis C-virus (HCV) E1E2-eiwit, dat normaal betrokken is bij de infectie van cellen. Door verschillende aanpassingen is het E1E2-eiwit geïnactiveerd. De aanvrager verzoekt om werkzaamheden met de VEEV-HCV-E1E2 replicons in cellen en muizen uit te mogen voeren op respectievelijk inperkingsniveau ML-I en D-I.

De COGEM is van oordeel dat aangebrachte mutaties in E1E2 leiden tot een stabiel, niet-functioneel E1E2-eiwit, dat niet in staat is de verloren functie in het replicon te complementeren. Ook kunnen met het inactieve E1E2 geen verspreidende 'virus-like-vesicles' (VLV's) gevormd worden. In muizen kunnen endogene retrovirussen (ERV's) aanwezig zijn, die in theorie kunnen leiden tot VLV-vorming. Echter, het gebruikte repliconsysteem wordt al lange tijd onderzocht in muizen, waarbij geen aanwijzingen zijn gevonden voor verspreiding van ERV-afhankelijke VLV's. De COGEM is van oordeel dat de risico's voor mens en milieu bij uitvoering van de werkzaamheden op ML-I en D-I, met inachtneming van de voorgestelde aanvullende voorwaarden dat de gebruikte cellen en dieren zijn vrij van VEEV, HCV en verwante virussen, 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.

- Bureau ggo, Afdeling Gentechnologie en Biologische Veiligheid, RIVM
- Directie Omgevingsveiligheid en milieurisico's, DG Milieu en Internationaal, Ministerie van IenW

Met het oog op eventuele belangenverstrengeling zijn de COGEM-leden dr. A.T. Das en dr. N.P. van Til niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.

Advies Inschaling werkzaamheden met Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV)-replicons met geïnactiveerd E1E2-transgen van het hepatitis C-virus

COGEM-advies CGM/260727-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met een replicon afgeleid van Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV), met een aangepast Hepatitis C-virus (HCV-)gen dat codeert voor het E1E2-eiwit. Deze aanvraag (IG 17-209) betreft een uitbreiding op eerdere werkzaamheden met VEEV-replicons, en is afkomstig van de Stichting Amsterdam UMC. De aanvrager verzoekt om in vitro en in vivo werkzaamheden uit te voeren met de VEEV-replicons op respectievelijk ML-I en D-I. De COGEM is gevraagd of op basis van de aangeleverde informatie de kans op vorming van infectieuze 'virus-like vesicles' (VLV's) verwaarloosbaar klein is, en of zij kan instemmen met de voorgestelde inperkingsniveaus.

2. Achtergrondinformatie over VEEV

Het Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV; tegenwoordig *Alphavirus venezuelan*, familie *Togaviridae*)^{1,2} wordt aangetroffen in (sub)tropische regio's van Zuid- en Centraal-Amerika.^{3,4} VEEV heeft een positief enkelstrengs RNA-genoom van ongeveer 11,5 kb, dat codeert voor vier niet-structurele eiwitten die betrokken zijn bij de virale RNA-replicatie, en voor de structurele eiwitten (C, E1, E2, E3, en 6K).^{1,5,6} Het virale RNA wordt omgeven door het capsid-eiwit 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 onder andere infectie van de gastheercel.⁷

VEEV veroorzaakt bij onder andere paardachtigen en mensen milde tot ernstige ziekte, variërend van koorts tot ernstige hersenontsteking (encefalitis). Bij volwassenen veroorzaakt infectie doorgaans milde klachten, terwijl infectie bij jonge kinderen kan leiden tot encefalitis,^{8,9} met soms blijvende neurologische problemen. Het virus wordt voornamelijk verspreid via muggensoorten behorende tot het genus *Culex*, subgenus *Melanoconion*.¹⁰

3. Replicons afgeleid van alfavirussen

Virale RNA-replicons zijn zelf-replicerende ('self amplifying') RNA-constructen. VEEV wordt veel gebruikt voor de constructie van deze repliconsystemen. In zogenaamde 'naakte' replicons is het ORF dat codeert voor de structurele genen verwijderd, en wordt een eventueel transgen op de positie van het structurele ORF geïnsereerd. Bij de productie van replicondeeltjes ('viral replicon particles', 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. Er wordt onderscheid gemaakt tussen 'single-helper'-strategieën, waarbij de structurele genen op één helper-RNA worden aangeboden, en de 'split-helper-systemen' waarbij het C-gen en de genen coderend voor de glycoproteïnen op twee verschillende helper-RNA's liggen.¹¹

Naakte replicons en replicondeeltjes worden als biologisch ingeperkt beschouwd, omdat de structurele genen van het gebruikte alfavirus verwijderd zijn en daardoor verdere verspreiding naar

niet geïnfecteerde cellen niet mogelijk is. Wanneer in alfavirus-replicons de alfavirus-envelopeiwitten (glycoproteïnen E1 en E2) intact blijven en de deletie van de structurele genen dus gelimiteerd is tot het C-gen, kunnen bij werkzaamheden met dergelijke replicons 'virus-like vesicles' (VLV's) gevormd worden. Dit zijn afsnoeringen van het plasmamembraan van de geïnfecteerde cel, waar een replicatiecomplex in aanwezig is.¹² Dit resulteert erin dat het replicon-RNA omgeven wordt door een membraan waarin de envelopeiwitten verankerd zijn. Door de afwezigheid van de capsid-eiwitten zijn deze VLV's instabiel en zien zij er anders uit dan een virusdeeltje of VRP. Het ontstaan van VLV's is inefficiënter dan de productie van virusdeeltjes. Dergelijke VLV's zijn echter wel infectieus en in staat om andere cellen te infecteren.^{13,14}

Ook wanneer in alfavirus-replicons transgenen worden geïntroduceerd die coderen voor virale envelopeiwitten afkomstig van andere virusfamilies kunnen infectieuze VLV's gevormd worden.¹⁵ VLV's kunnen herhaaldelijk gepasseerd worden op cellijnen,^{12,16,17,18} waarbij mutaties in de niet-structurele genen kunnen ontstaan die leiden tot een efficiëntere productie en hogere titers van de VLV's.^{12,17}

4. Achtergrondinformatie over HCV

Het hepatitis C-virus (HCV; tegenwoordig *Orthohepacivirus hominis*) behoort tot de familie *Hepaciviridae*.¹ Het genoom van HCV bestaat uit een enkelstrengs positief RNA van circa 9,6 kb, dat codeert voor één polyproteïne. Door splitsing worden drie structurele eiwitten (C, E1 en E2) en minstens zes niet-structurele (NS-)eiwitten gevormd. Het nucleocapside bestaat uit het C-eiwit en omhult het RNA. De NS-eiwitten zijn betrokken bij de replicatie van het virus. De E1 en E2 eiwitten vormen een glycoproteïnecomplex (E1E2) op het virusmembraan, en zijn betrokken bij de infectie van de gastheercel.¹⁹ Van HCV zijn acht verschillende genotypen bekend. De genotypen verschillen ~30 tot 35% van elkaar, waardoor HCV erg heterogeen is.^{20,21,22,23}

HCV infecteert van nature alleen de mens, en repliceert in levercellen (hepatocyten) en mogelijk ook lymfocyten. Onder laboratoriumomstandigheden is ook besmetting van chimpansees en bepaalde boomspitsmuizen (*Tupaia belangeri*) mogelijk gebleken.^{20,24,25} Er wordt geschat dat er wereldwijd ongeveer 71 miljoen mensen chronisch geïnfecteerd zijn met HCV.²⁶ In Nederland wordt de prevalentie van HCV geschat op 0,22% van de bevolking.²⁷ Veel HCV-geïnfecteerden zijn zich echter niet bewust van hun infectiestatus, tot het virus de lever dusdanig beschadigt dat er leverziekte optreedt.

HCV wordt overgedragen via bloed-bloed contact. Het virus kan in zeldzame gevallen worden overgedragen door seksueel contact of via perinatale transmissie van moeder op kind.^{20,22} Verspreiding van HCV vindt hoofdzakelijk plaats door bloedtransfusie met niet-gecontroleerd bloed, door het gezamenlijke gebruik van naalden door drugsgebruikers, en door het hergebruik van onvoldoende gesteriliseerde naalden, spuiten of ander medische instrumenten.^{20,22}

5. Voorgenomen werkzaamheden

De onderhavige aanvraag betreft een aanvulling op een eerdere vergunning voor werkzaamheden met VEEV-afgeleide replicons. De huidige aanvraag omvat werkzaamheden waarbij VEEV-replicons met een geïnactiveerd HCV-glycoproteïne-transgen geproduceerd worden in cellen (DNA- of RNA-launched). De replicons zullen vervolgens ingepakt in lipid nanoparticles (LNP's) toegediend worden aan muizen als vaccin.

In het HCV-E1E2-glycoproteïne zijn verschillende mutaties aangebracht om het eiwit in de prefusie-conformatie te houden. De residuen in en rondom de (vermoede) geconserveerde fusie-peptide zijn vervangen door een flexibele linker. Daarnaast zijn stabiliserende mutaties in de E1- en E2-subunits geïntroduceerd. Ook zijn de twee transmembraandomeinen van E1E2 verwijderd, en wordt heterodimerisatie geïnduceerd door een inter-E1E2-disulfidebrug. Het construct is vervolgens gefuseerd aan het SARS-CoV-2 spike (S-) transmembraaneiwdomein (21 aminozuren lang) om expressie op het celoppervlak te bewerkstelligen. Het complete transgen (inclusief SARS-transmembraandomein) wordt C2P2-S2TMD genoemd.

Er zal gebruik gemaakt worden van het Trinidad donkey (TRD) VEEV-repliconsysteem, waarbij de structurele genen (C, E1-E3) compleet verwijderd zijn en vervangen worden door de C2P2-S2TMD RNA-sequentie. Het plasmide met de niet-structurele VEEV-genen en het C2P2-S2TMD wordt gelineariseerd en *in vitro* getranscribeerd met T7 RNA-polymerase. Het RNA wordt voorzien van een 5'-cap structuur en gezuiverd, en ingepakt in LNPs voor *in vivo* toediening aan muizen (Balb/c of C57BL/6).

Als gastheercellen worden al-dan-niet gg-primaire zoogdiercellen en cellijnen vergund op ML-I toegepast, met uitzondering van cellen afkomstig van paardachtigen. In de cellen zijn uitsluitend de volgende donorsequenties toegestaan: 1) gekarakteriseerde sequenties inclusief regulatoire sequenties van zoogdieren, land- en tuinbouwgewassen, *Arabidopsis thaliana*, organismen van Bijlage 2 lijst A1 van de Regeling ggo, vogels, vissen, *Danio rerio*, insecten, *Xenopus* en *Caenorhabditis elegans*, 2) marker- en reporter genen, 3) tag-sequenties van virale oorsprong afkomstig van virussen van pathogeniteitsklasse 2 en 3 in Bijlage 4 van de Regeling ggo, 4) recombinatiegenen en -sequenties, en 5) antibioticaresistentiegenen.

De aanvrager verzoekt de werkzaamheden uit te mogen voeren op ML-I (in vitro) en D-I (in vivo, in muizen). Het inschalingsvoorstel van BGGO voor de in vitro werkzaamheden op ML-I is als volgt:

- de gebruikte cellen zijn vrij van VEEV en andere verwante virussen;
- de gebruikte cellen zijn vrij van de uitgangsvirussen waarvan donorsequenties worden toegepast en hiervan verwante virussen.

Voor de in vivo werkzaamheden op D-I:

- de gebruikte dieren zijn vrij van VEEV en andere verwante virussen;
- de gebruikte dieren zijn vrij van de uitgangsvirussen waarvan donorsequenties worden toegepast en hiervan verwante virussen;
- afval dat mogelijk replicon materiaal bevat dient als DM-I afval verwerkt te worden.

6. Eerder COGEM-advies

De COGEM heeft VEEV ingeschaald in pathogeniteitsklasse 3, en HCV in pathogeniteitsklasse 2.²⁸ Daarnaast heeft de COGEM meerdere keren geadviseerd over replicons afgeleid van VEEV met verschillende donorsequenties.^{o.a. 29,30,31,32,33,34}

De COGEM heeft eerder geadviseerd over de generieke omlaagschaling van werkzaamheden met virale replicons afgeleid van alfa- en flavivirussen.^{15,35} Zij adviseerde dat laboratoriumwerkzaamheden met naakte replicons afgeleid van alfavirussen en flavivirussen, waaruit de structurele genen zijn

verwijderd, kunnen plaatsvinden op inperkingsniveau I. Hierbij heeft zij als algemene voorwaarden voor omlaagschaling van werkzaamheden met alfavirus-replicons gesteld dat:

- De gebruikte cellen vrij zijn van verwante alfavirussen;
- De gebruikte transgenen de verwijderde functies niet mogen complementeren;
- Werkzaamheden met alfavirus-replicons met (combinaties van) transgenen die het replicon de capaciteit geven om te verspreiden, uitgesloten zijn van generieke omlaagschaling.

Dit is geadviseerd omdat envelopeiwitten van andere virusfamilies mogelijk kunnen leiden tot (onbedoelde) vorming van infectieuze VLV's, en de risico's van de vorming van infectieuze VLV's nog onvoldoende in kaart zijn gebracht. Voorbeelden van transgenen die kunnen bijdragen aan de verspreiding van replicons, zijn virale structurele eiwitten met fusogene eigenschappen, inclusief die van endogene retrovirussen (ERV's), en combinaties van potentieel fusogene en immuunmodulerende eiwitten.

7. Overweging

De onderhavige vergunningaanvraag betreft werkzaamheden met een geïnactiveerd HCV-E1E2-glycoproteïne als transgen in TRD VEEV-replicons. Het gebruik van transgenen in alfavirus replicon-systemen die het replicon de capaciteit geven om te verspreiden (bijvoorbeeld virale structurele eiwitten met fusogene activiteit), is eerder uitgesloten voor generieke omlaagschaling vanwege de kans op vorming van infectieuze VLV's.^{15,35} De COGEM is door Bureau GGO gevraagd of het HCV transgen stabiel geïnactiveerd is (met betrekking tot de fusieactiviteit), of er bij de werkzaamheden risico's zijn met betrekking tot de vorming van VLV's, en of zij kan instemmen met inschaling van de beschreven werkzaamheden op ML-I en D-I.

7.1 Modificaties aan HCV-E1E2

De aanvrager heeft de verschillende aanpassingen die zijn gemaakt om het HCV-E1E2 te inactiveren, beschreven. Door het verwijderen en vervangen van verschillende onderdelen heeft het E1E2 geen fusieactiviteit meer. Ter onderbouwing verwijst de aanvrager naar (deels ongepubliceerde) resultaten van eerdere experimenten met retrovirale vectordeeltjes gepseudotypeerd met E1E2 waarin ook enkele van de beschreven aanpassingen zijn aangebracht en de vectordeeltjes niet-infectieus bleken.³⁶ De aanvrager stelt dat reversie van de gemaakte modificaties tijdens (intracellulaire) replicon-amplificatie onwaarschijnlijk is.

Op basis van de aangeleverde informatie over de vele aanpassingen die aan het glycoproteïne zijn gemaakt, acht de COGEM de kans op herstel van de fusie-activiteit van het geïnactiveerde HCV-E1E2 en op reversie verwaarloosbaar klein. De COGEM is van oordeel dat door de inactivatie van HCV-E1E2 de verloren functie van de VEEV-structurele eiwitten niet gecompenseerd kan worden.

7.2 Mogelijkheid tot vorming van VLV's bij de werkzaamheden

De VEEV-replicons met een geïnactiveerd HCV-E1E2 worden met behulp van een plasmide gelanceerd in al-dan-niet genetisch gemodificeerde primaire zoogdiercellen en cellijnen ingeschaald op ML-I. De vervaardigde VEEV-replicons zullen vervolgens door middel van LNP's toegediend worden aan muizen.

De aanvrager stelt dat de gebruikte cellen geen virussen of (donor)sequenties bevatten die kunnen leiden tot de productie van infectieuze VLV's, en dat het gebruikte transgen in het VEEV-replicon niet

kan leiden tot infectieuze VLV's. De muizen zullen ook vrij zijn van virussen of donorsequenties die kunnen leiden tot de productie van infectieuze VLV's. Wel merkt de aanvrager op dat muizen mogelijk endogene retrovirale glycoproteïnen tot expressie brengen.

Eerder is door de COGEM opgemerkt dat endogene retrovirussen (ERV's) aanwezig in (cellen van) verschillende diersoorten mogelijk bij kunnen dragen aan de verspreiding van replicons.^{35,15} De aanvrager stelt dat, ondanks het vele onderzoek naar VEEV-repliconsystemen in muizen, cel-naar-cel verspreiding bij deze experimenten niet beschreven is. Daarnaast acht de aanvrager recombinatie tussen het VEEV-replicon en endogene retrovirale sequenties onwaarschijnlijk omdat er beperkte sequentieovereenkomst is en het VEEV-replicon en retrovirussen in verschillende celcompartimenten repliceren – het alfavirus-replicon repliceert in het cytoplasma, replicatie van ERV's gebeurt via reverse transcriptie en integratie in de celkern – en verschillende moleculaire machinerie gebruiken. Vanwege de inactiviteit van het HCV-E1E2-eiwit, verwacht de aanvrager geen intracellulaire verspreiding van VEEV-replicons.

De COGEM is van oordeel dat door het ontbreken van de fusie-activiteit van het gemodificeerde E1E2, geen verspreidende VLV's gevormd kunnen worden met het HCV-glycoproteïne. Tevens zouden eventueel gevormde VLV's in de muizen door de immuunrespons tegen E1E2 geëlimineerd worden. De kans op recombinatie tussen het VEEV-repliconsysteem en aanwezige ERV's acht de COGEM verwaarloosbaar klein. Indien muizen veel actieve ERV's bevatten die veel retrovirale glycoproteïnen produceren, zou VLV-vorming door complementatie niet geheel uitgesloten kunnen worden. Omdat in muizenstudies waar dit repliconsysteem wordt toegepast, VLV-vorming door ERV's en overdracht van muis tot muis niet is gerapporteerd, is de COGEM van oordeel dat het risico van ERV-afhankelijke VLV's voor mens en milieu, verwaarloosbaar klein is.

8. Advies

De bovenstaande overwegingen in ogenschouw nemende, stemt de COGEM in met een inschaling van de voorgenomen werkzaamheden op ML-I en D-I, met inachtneming van de voorgestelde aanvullende voorwaarden dat de gebruikte cellen en dieren zijn vrij van VEEV en verwante virussen, en vrij zijn van de uitgangsvirussen waarvan donorsequenties worden toegepast en hiervan verwante virussen. De COGEM is van oordeel dat op deze inperkingsniveaus en met deze aanvullende voorwaarden, de risico's van de voorgenomen werkzaamheden voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Virus Taxonomy <https://ictv.global/taxonomy> (bezocht: 21 juli 2026)
2. Griffin DE (2013). Alphaviruses. In: Fields Virology, 6th edition. Edited by Knipe DM & Howley PM, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
3. Weaver SC et al. (2004). Venezuelan Equine Encephalitis. Annu. Rev. Entomol. 49: 141-174
4. Kumar B et al. (2018). Zoonotic viral Diseases of equines and their impact on human and animal health. Open Virol. J. 12: 80-98
5. Pietilä MK et al. (2017). Alphavirus polymerase and RNA replication. Virus Res. 234: 44-57
6. Rupp JC et al. (2015). Alphavirus RNA synthesis and non-structural protein functions. J. Gen. Virol. 96: 2483-2500
7. Jose J et al. (2009). A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. Future Microbiol. 4: 837-856
8. Griffin DE (2008). Togaviruses: Equine Encephalitic Viruses. In: Encyclopedia of Virology, third edition. Ed. Mahy BWJ & Van Regenmortel MHV, Elsevier Ltd.

9. Taylor KG & Paessler S (2013). Pathogenesis of Venezuelan equine encephalitis. *Vet. Microbiol.* 167: 145-150
10. Griffin DE (2013). Alphaviruses. In: *Fields Virology*, 6th edition. Edited by Knipe DM & Howley PM, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
11. 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
12. 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
13. Ruiz-Guillen, M et al. (2016). Capsid-deficient alphaviruses generate propagative infectious microvesicles at the plasma membrane. *Cell Mol. Life Sci.* 73: 3897-3916
14. Jia, F et al. (2017). Pseudo-typed Semliki Forest virus delivers EGFP into neurons. *J. Neurovirol.* 23: 205-215
15. COGEM (2025). Advies Aanscherping van te gebruiken transgenen in alfavirus-replicons die in aanmerking komen voor generieke omlaagschaling. COGEM-advies CGM/250430-01
16. 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
17. 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
18. Frolova EI et al. (2022). Acquisition of furin cleavage site and further SARS-CoV-2 evolution change the mechanisms of viral entry, infection spread, and cell signaling. *J. Virol.* 96: e00753
19. Torrents de la Peña A et al. (2022). Structure of the hepatitis C virus E1E2 glycoprotein complex. *Science.* 378: 263-269
20. Simmonds P et al. (2005). Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 42: 962-973
21. King AMQ et al. (2012). Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. In: ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. Elsevier Academic Press, Amsterdam 1014-1018
22. Ray SC et al. (2013). Hepatitis C Virus. In *Fields Virology*. Edited by Knipe DM & Howley PM Philadelphia: 795-824
23. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Classification and genotype / subtype assignments of hepatitis C virus https://ictv.global/sg_wiki/flaviviridae/hepacivirus (bezocht: 21 juli 2026)
24. Amako Y et al. (2010). Pathogenesis of Hepatitis C Virus infection in *Tupaia belangeri*. *J. Virol.* 84: 303-311
25. Burm R et al. (2018). Animal models to study hepatitis C virus infection. *Front. Immunol.* 9: 1032
26. Krekulova L et al. (2021). Viral hepatitis C pandemic: Challenges and threats to its elimination. *J. Viral Hepat.* 28: 694-698
27. Vriend HJ et al. (2013). Hepatitis C virus prevalence in The Netherlands: migrants account for most infections. *Epidemiol. Infect.* 141: 1310-1317
28. COGEM (2026). Actualisatie van het overzicht met pathogeniteitsklassen van DNA- en RNA-virussen en viriforms (2026). COGEM-advies CGM/260225-03
29. COGEM (2023). Inschaling van werkzaamheden met chimere Binjari en Palm Creek virussen (gg-BinJV en gg-PCV) en VEEV replicondeeltjes in muggen. COGEM-advies CGM/230828-01
30. COGEM (2017). Werkzaamheden met gg-VEEV en gg-SPDV replicons met aquatische donorsequenties. COGEM-advies CGM/171030-03
31. COGEM (2017). Werkzaamheden met gg-alphavirus-replicons (SFV, SINV en VEEV) met donorsequenties van griepvirussen, Human respiratory syncytial virus, en Marburg- en Ebolavirussen. COGEM-advies CGM/171024-01
32. COGEM (2017). Omlaagschaling van in vivo en in vitro werkzaamheden met Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV) replicons. COGEM-advies CGM/170224-01
33. COGEM (2023). Inschaling werkzaamheden met een Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV)-replicon met geïnactiveerd HIV Envelop als transgen. COGEM-advies CGM/231011-02
34. COGEM (2023). Inschaling werkzaamheden met VEEV-replicondeeltjes met structurele genen van retrovirussen BLV en FeLV. COGEM-advies CGM/231019-01
35. COGEM (2022). Generieke omlaagschaling van werkzaamheden met virale replicons afgeleid van alfavirussen en flavivirussen. COGEM-advies CGM/221223-01
36. Drummer HE & Pountourios P (2004). Hepatitis C Virus glycoprotein E2 contains a membrane-proximal heptad repeat sequence that is essential for E1E2 glycoprotein heterodimerization and viral entry. *J. Biol. Chem.* 279: 30066-30072